

## Elektrokemoterapija: učinki na žilje tumorja

Gregor Serša, Maja Čemažar in Marko Snoj

### Povzetek

Terapevtska učinkovitost zdravljenj, ki delujejo na žilje tumorja, je sedaj splošno priznana. Odkrivajo se vedno nova zdravila in pristopi, ki ciljajo žilje tumorja, zato jih imenujemo žilno ciljana zdravljenja (vascular targeted therapies). Poznamo dve vrsti tega zdravljenja, in sicer antiangiogeno (anti-angiogenic therapies) in žilno razdiralno (vascular-disrupting therapies). Ločita se po fizioloških tarčah, primernosti za zdravljenje glede na obseg bolezni in režimu zdravljenja. Zadnja odkritja kažejo, da ima elektrokemoterapija poleg neposrednega citotoksičnega delovanja tudi žilno razdiralni učinek, ker na endotelne celice tumorskega žilja deluje citotoksično. Zaradi odmiranja teh celic prihaja do trajnih ustavitve pretoka krvi in do ishemičnega propada tumorskih celic v poškodovanih delih tumorja. Zaradi žilno razdiralnega učinka je elektrokemoterapija učinkovita tudi pri zdravljenju krvavečih tumorskih lezij, kar se kaže v takojšnji ustavitvi krvavitve in v poznejšem zmanjšanju tumorske lezije.

Raziskave je podprla ARRS.

### Uvod

Delitev tumorskih celic je odvisna od primerne dostave hraniv in kisika. Do nekaj milimetrov velike tumorske mase je rast možna z difuzijo hraniv in kisika iz obstoječih žil, zato je rast brez neoangiogeneze onemogočena in take tumorske mase ostanejo dormantne. Ko se sproži angiogeneza (angiogeni prekop), je omogočena hitra rast tumorja in zasevkov. S sproščanjem angiogenih faktorjev, kot sta vaskularni endotelni rastni faktor (vascular endothelial growth factor, VEGF) in epidermalni rastni faktor (epidermal growth factor, EGF), tumorske celice spodbudijo nastanek novih žil, potrebnih za njihovo rast [1–3].

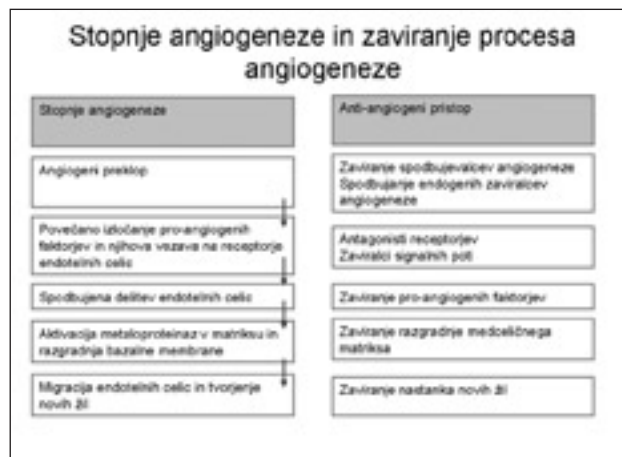
Novonastalo tumorsko žilje je drugačno od žilja v normalnih neprizadetih tkivih in organih. Nove žile imajo tanjše stene, so bolj prepustne, predvsem pa so slabo organizirane in tudi pretok krvi je slabši. Endotelne celice v tumorskem žilju so drugačne od endotelnih celic v normalnih tkivih: razlikujejo se po prisotnosti nekaterih molekularnih označevalcev in po hitrejši celični delitvi. Zato je tumorsko žilje glede na svoje specifične fiziološke in molekularne lastnosti primerna tarča za zdravljenje. Prednost terapevtskega ciljanja tumorskega žilja je, da so endotelne celice genetsko stabilnejše kot tumorske, v katerih stalno srečujemo nove mutacije, poleg tega pa ne postanejo odporne proti zdravljenju [2, 4].

Prvi način žilno ciljanega zdravljenja sta bili ligacija žil in transkateterska arterijska embolizacija. Obe sta invazivni in povezani z več omejitvami, med drugim tudi z neselektivnostjo, kar vodi v poškodbe normalnih tkiv. Dognanja v fiziologiji in biologiji tumorjev so privedla do razvoja učinkov in žilno ciljanem delovanjem, ki delujejo selektivno in jih lahko razde-

limo v dve skupini. Z antiangiogenim zdravljenjem zavremo delovanje ključnih dejavnikov, ki so udeleženi pri nastajanju novih žil, torej zaviramo rast novih žil v tumorju, pri žilno razdiralnem zdravljenju pa izkoriščamo značilne fiziološke in molekularne razlike med žiljem tumorja in normalnih tkiv ter toksično delujemo na obstoječe žilje tumorja [4]. Ker se razvijajo vedno novi žilno ciljani terapevtski načini, moramo razumeti razliko v delovanju teh dveh vrst zdravljenja. Samo tako jih lahko glede na stadij bolezni in glede na pričakovani izid zdravljenja pravilno uporabljamo. Čeprav je delovanje obeh vrst zdravljenja različno, se njuni učinki tudi prepletajo; antiangiogeno zdravljenje učinkuje tudi na obstoječe žilje tumorja, žilno razdiralno pa preprečujejo rast novih žil [2, 4].

### Antiangiogeno zdravljenje

Nastajanje novih žil je zelo kompleksen proces in temelji na zelo občutljivem ravnotežju biokemičnih signalov in receptorjev. Precej je že raziskan, a premalo, da bi bilo povsem jasno, na katerih stopnjah bi lahko najučinkoviteje posegli in preprečili nastanek novih žil v tumorju (slika 1). Antiangiogeno zdravljenje je klinično torej drugačno od klasičnega citotoksičnega zdravljenja s citostatiki, saj napredovanje bolezni predvsem zavira. [3, 4].



Slika 1. Angiogeneza je večstopenjski proces. Z antiangiogenim zdravljenjem lahko protitumorsko delujemo na vseh stopnjah.

V tumorjih je VEGF verjetno najpomembnejši med angiogenimi faktorji. Vpliva na delitev endotelnih celic, indukcijo prepustnosti žilja in je tudi signal preživetja endotelnih celic v novih žilah tumorja. Izločajo ga tumorske celice, kar spodbujajo hipoksija v tumorju, izguba funkcije tumorskih supresorskih genov in aktivacija onkogenov. Zato je zaviranje

VEGF ali njegovih receptorjev pri antiangiogenem zdravljenju ključno [1–3]. Uporabljajo se tarčna zdravila, kot so monoklonska protitelesa proti VEGF ali njegovemu receptorju in male molekule, ki interferirajo z njegovimi intracelularnimi tirozin kinaznimi signalnimi potmi. Široko klinično uporabo imata bevacizumab, humanizirano monoklonsko protitelo, usmerjeno proti VEGF, in cetuximab, himerno monoklonsko protitelo, usmerjeno proti receptorju za EGF.

### Žilno razdiralno zdravljenje

Namen žilno razdiralnega zdravljenja je onesposobiti žilje tumorja in s tem posredno, zaradi nastanka ishemije, povzročiti kaskado umiranja tumorskih celic, ki ležijo ob poškodovanih žilah. V nasprotju z antiangiogenim zdravljenjem je namenjeno uničenju tumorjev in preprečitvi napredovanja bolezni, zato je posebno učinkovito, ko zdravimo večje tumorske mase, posebno tiste, ki so odporne proti standardnim citostatikom [4–6].

V zadnjem času je znanih že več žilno razdiralnih terapevtikov, ki na žilje tumorja delujejo selektivno. Med njimi so tisti, ki se specifično vežejo na tubulinske komponente citoskeleta endotelnih celic. To so kombrestatini, med katerimi sta CA4P in AVE8062 že v klinični fazi preizkušanja [4, 6]. Znani so tudi analogi flavonske očetne kisline – 5,6-dimetilksantenon-4-očetna kislina (DMXAA), ki povzroča apoptozo endotelnih celic in je tudi že v klinični študiji [6]. Učinek žilno razdiralnega zdravljenja na tumorje se razlikuje od učinka antiangiogenega zdravljenja (slika 2). Žilno razdiralno povzroči centralno nekrozo tumorjev zaradi okluzije žil, zato je primerno predvsem za zdravljenje večjih tumorskih mas. Ostane tudi značilen viabilen tumorski rob, ker ga s kisikom in hranivi oskrbujejo žile v neprizadetem normalnem tkivu. Zato je to zdravljenje, podobno kot antiangiogeno, najučinkovitejše v kombinaciji z drugimi citotoksičnimi zdravljenji [2, 6].



Slika 2. Žilno ciljano zdravljenje glede na način delovanja.

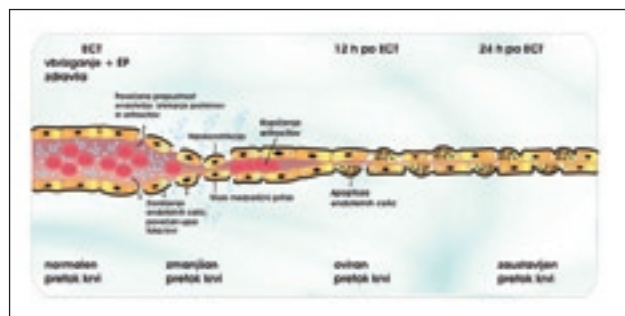
Novejše raziskave so pokazale, da k žilno razdiralnemu zdravljenju spadajo tudi mnoge vrste zdravljenja, katerih primarni mehanizem delovanja je citotoksičnost za tumorske celice. Znano je, da imajo fotodinamsko zdravljenje in hipertermija ter nekateri kemoterapevtiki žilno razdiralni učinek [4]. Podobno lahko trdimo za elektrokemoterapijo, pri kateri opažamo predvsem dva mehanizma delovanja, neposredni citotoksični učinek na tumorske celice in žilno razdiralni učinek zaradi citotoksičnega delovanja na endotelne celice. Tega smo v zadnjem času natančno preučili in potrdili opažanja, da je elektrokemoterapija učinkovita pri zdravljenju krvavečih

tumorskih lezij ravno zaradi tega mehanizma delovanja [7].

### Žilno razdiralni učinek elektrokemoterapije

Pri elektrokemoterapiji kombiniramo aplikacijo visokonapetostnih električnih pulzov za povečanje prepustnosti celične membrane in kemoterapijo [7]. Izvajamo jo na tumorjih, kjer z elektroporacijo povečamo vstopanje citostatikov, ki težko dobro prehajajo skozi membrano. Uporabljata se dva citostatika, cisplatin in bleomicin; njuna citotoksičnost se poveča za 70- do 1000-krat. Celična membrana večine celic v tkivu, ki je izpostavljeno električnim pulzom, postane prepustna, ne glede na to, ali so celice tumorske, stromalne ali endotelne. Aplikacija električnih pulzov na tumor brez citostatika povzroči prehodne spremembe v pretoku krvi v tumorju. V nekaj minutah po aplikaciji električnih pulzov se pretok krvi skoraj popolnoma ustavi oz. zmanjša na približno 20 %, a se kmalu začne obnovljati, na izhodiščno vrednost pa se v celoti povrne v 24 urah [8]. Razlog za to je v spremembi prepustnosti žil; endotelne celice postanejo nabrekle, kar povzroči večjo prepustnost žil, ekstravazacijo plazme in eritrocitov ter zvišan medcelični tlak, zaradi česar žile niso več pretočne [9]. Ker te spremembe ne povzročijo odmiranja endotelnih celic, je proces reverzibilen.

Če je v žili citostatik (elektrokemoterapija), lahko zaradi aplikacije električnih pulzov vstopa tudi v endotelne celice. V začetni fazi so spremembe v žilah enake kot samo po aplikaciji električnih pulzov, vendar se endotelne celice ne povrnejo v prvotno obliko in položaj, ampak zaradi znotrajceličnega citostatika vstopajo v apoptozo (slika 3). Zaradi tega prihaja do strdkov in dolgotrajnega zastoja v pretoku krvi, ki povzroča hipoksična območja okrog prizadetih žil. Dolgotrajnejša hipoksija povzroči tudi umiranje tistih tumorskih celic, ki morda niso bile prizadete zaradi neposrednega citotoksičnega delovanja citostatikov [9]. Raziskav o tem, kolikšen je delež žilno razdiralnega učinka elektrokemoterapije pri celotnem protitumorskem učinku elektrokemoterapije, še nismo opravili, menimo pa, da je delež približno 20-odstoten.



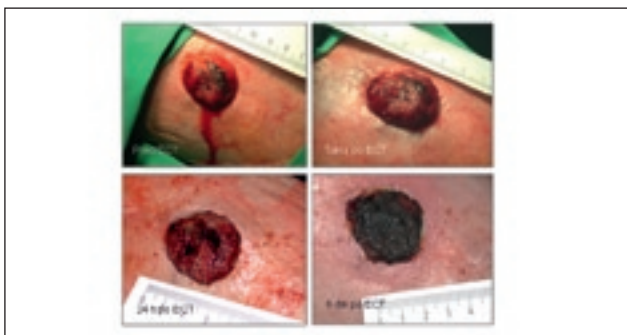
Slika 3. Shematični prikaz sprememb v žilju po elektrokemoterapiji.

### Elektrokemoterapije pri zdravljenju krvavečih tumorskih nodulih

Učinkovitost elektrokemoterapije na kožnih in podkožnih tumorskih nodulih različnih vrst tumorjev je že dokazana. Vse do sedaj objavljene klinične študije so pokazale, da lahko z elektrokemoterapijo dobimo okrog 80 % objektivnih odgovorov na zdravljenje, od tega 70 % popolnih odgovorov brez ponovne izrasti zdravljenih nodulov [10–12]. Opisani so tudi primeri 7-letne remisije po elektrokemoterapiji [13]. Trenutno se elektrokemoterapija uporablja za zdravljenje

kožnih in podkožnih zasevkov različnih tumorjev, predvsem melanoma. Pričakujemo, da se bo z razvojem novih tehnoloških pristopov uporabljala tudi pri zdravljenju tumorjev v notranjih organih. Pripravljajo se klinične študije za zdravljenje jetrnih zasevkov ter tudi karcinoma prostate in raka dojke pri starejših bolnicah, kjer standardni postopki zdravljenja niso več primerni.

Klinični problem so tudi krvaveči kožni zasevki. Nekaj primerov uspešnega zdravljenja z elektrokemoterapijo je že opisanih. Kubota s sod. je prva opisala uspešno zdravljenje krvavečih kožnih zasevkov raka mehurja [14]. Opisuje zdravljenje devetih krvavečih nodulov na prsnem košu; takoj po zdravljenju je prišlo do zaustavitve krvavitve in vsi noduli so po zdravljenju popolnoma izginiti. Tudi Gehl s sod. opisuje dva primera uspešnega zdravljenja krvavečih kožnih zasevkov melanoma [15, 16]. Opisan je enak učinek – prenehanje krvavitve in popoln odgovor na zdravljenje z elektrokemoterapijo osmih zasevkov na glavi in lasišču, razen enega. Naše izkušnje so enake kot v obeh opisanih primerih. Nekaj je še neopisanih primerov, Snoj in sod. [17] pa opisujemo uspešno zdravljenje večjega (3,5 x 3 cm) krvavečega kožnega zasevka melanoma na goleni. Zaradi mnogih vrst predhodnega zdravljenja in bolnikove starosti so bile izčrpane vse možnosti nadaljnega zdravljenja, razen amputacije noge. Po enkratnem zdravljenju z elektrokemoterapijo z bleomicinom se je krvavitev zasevka ustavila. Po nekaj dneh je nastala krasta, ki je odpadla po nekaj tednih (slika 4). Velikost tumorja se je zelo zmanjšala in v 21 tednih opazovanja smo zagotovo delni odgovor na zdravljenje. Bolnik je takrat umrl zaradi napredovanja bolezni v pljuča. Ocenjujemo, da je bila elektrokemoterapija uspešna, saj je imela dober paliativni učinek in smo z njo ustavili krvavitev lezije ter ohranili funkcijo noge, s tem pa kakovost bolnikovega življenja.



**Slika 4.** Žilno razdiralni učinek elektrokemoterapije. Takoj po zdravljenju kožnega zasevka melanoma z elektrokemoterapijo se je krvavitev ustavila in potem je nastala krasta.

### Sklep

Elektrokemoterapija je učinkovita zaradi povečanja propustnosti celične membrane za citostatike, kot sta bleomicin in cisplatin, ki sta skozi membrano brez elektroporacije slabo prehodna. Ker električnim pulzom niso izpostavljene samo tumorske celice, ampak tudi stromalne, vključno z endotelnimi, elektrokemoterapija učinkuje tudi na te. Učinek je žilno razdiralen in delno pripomore k skupni učinkovitosti elektrokemoterapije. Žilno razdiralni učinek je mogoče izkoristiti tudi pri zdravljenju krvavečih tumorskih mas, kar dokazujejo naše izkušnje in tudi objavljena literatura.

### Viri

1. Neri D, Bicknell R. Tumour vascular targeting. *Nat Rev Cancer* 2005; 5: 436–46.
2. Patterson DM, Rustin GJS. Vascular damaging agents. *Clin Oncol* 2007; 19: 443–56.
3. Ellis LM, Hicklin DJ. VEGF-targeted therapy: mechanism of anti-tumor activity. *Nat Rev Cancer* 2008; 8: 579–91.
4. Siemann DW, Bibby MC, Dark GG, Dicker AP, Eskens FALM, Horsman MR, Marme D, LoRusso PM. Differentiation and definition of vascular-targeted Therapies. *Clin Cancer Res* 2005; 11: 416–20.
5. Hinnen P, Eskens FALM. Vascular disrupting agents in clinical development. *Brit J Cancer* 2007; 96: 1159–65.
6. Tozer GM, Kanou C, Baguley BC. Disrupting tumour blood vessels. *Nat Rev Cancer* 2005; 5: 423–35.
7. Sersa G, Miklavcic D, Cemazar M, Rudolf Z, Pucihar G, Snoj M. Electrochemotherapy in treatment of tumors. *EJSO* 2008; 34: 232–40.
8. Sersa G, Cemazar M, Parkins CS, Chaplin DJ. Tumour blood flow changes induced by application of electric pulses. *Eur J Cancer* 1999; 35: 672–7.
9. Sersa G, Jarm T, Kotnik T, Coer A, Podkrajsek M, Sentjurc M, Miklavcic D, Kadivec M, Kranjc S, Secerov A, Cemazar M. Vascular disrupting action of electroporation and electrochemotherapy with bleomycin in murine sarcoma. *Brit J Cancer* 2008; 98: 388–98.
10. Marty M, Sersa G, Garbay JR, Gehl J, Collins CG, Snoj M, Billard V, Geertsen PF, Larkin JO, Miklavcic D, Pavlovic I, Paulin-Kosir SM, Cemazar M, Morsli N, Soden DM, Rudolf Z, Robert C, O'Sullivan GC, Mir LM. Electrochemotherapy – 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* 2006; 4 (Suppl): S3–13.
11. Byrne CM, Thompson JF. Role of electrochemotherapy in the treatment of metastatic melanoma and other metastatic and primary skin tumors. *Expert Rev Anticancer Ther* 2006; 6: 671–8.
12. Heller R, Jaroszeski MJ, Reintgen DS, Puleo CA, DeConti RC, Gilbert RA, Glass LF. Treatment of cutaneous and subcutaneous tumors with electrochemotherapy using intralesional bleomycin. *Cancer* 1998; 83: 148–57.
13. Snoj M, Rudolf Z, Paulin-Kosir S, Cemazar M, Snoj R, Sersa G. Long lasting complete response in melanoma treated by electrochemotherapy. *Eur J Cancer* 2006; 4 (Suppl): S26–8.
14. Kubota Y, Mir LM, Nakada T, Sasagawa I, Suzuki H, Aoyama N. Successful treatment of metastatic skin lesions with electrochemotherapy. *J Urol* 1998; 160: 1426.
15. Gehl J, Geertsen PF. Efficient palliation of haemorrhaging malignant melanoma skin metastases by electrochemotherapy. *Melanoma Res* 2000; 10: 585–9.
16. Gehl J, Geertsen PF. Palliation of haemorrhaging and ulcerated malignant cutaneous tumors using electrochemotherapy. *Eur J Cancer* 2006; 4 (Suppl): S35–7.
17. Snoj M, Cemazar M, Srnovrnik T, Paulin-Kosir S, Sersa G. Limb sparing treatment of bleeding melanoma recurrence by electrochemotherapy. *Tumori* 2008; v tisku.