

EKSPERIMENTINIAI TYRIMAI

Elektrochemoterapijos vaidmuo didinant vaistų nuo vėžio veiksmingumą

Jūratė Labanauskienė, Janina Didžiapetrienė, Eduardas Aleknavičius
Vilniaus universiteto Onkologijos institutas

Raktažodžiai: elektrochemoterapija, bleomicinas, ciklofosfamidai, karboplatina.

Santrauka. Veikiant naviką elektriniais impulsais navikinės ląstelės membranoje vyksta destabilizacija, dėl to pagerėja medžiagų pernaša į ląstelės vidų, padidėja vaistų nuo vėžio selektyvumas. Taigi vartojant mažesnes citostatikų dozes, galima pasiekti geresnę gydomąją poveikį bei sumažinti citostatinės terapijos nepageidaujamą poveikį organizmui. Šis chemoterapijos derinys su elektriniais impulsais vadinamas elektrochemoterapija.

Šio darbo tikslas – atliekant tyrimus su eksperimentiniais gyvūnais, įvertinti vienkartinės ir pakartotinės (5 dienu) elektrochemoterapijos efektyvumą vartojant skirtingoms klasėms priklausančius vaistus nuo vėžio (ciklofosfamidą, karboplatiną bei bleomiciną).

Nustatyta, kad, pasirinkus vienkartinę elektrochemoterapijos poveikį, optimaliausias gydymo rezultatas gautas vartojant bleomiciną. Skyrus penkių dienų elektrochemoterapijos gydomąjį kursą, padidėja gydomasis poveikis ne tik bleomicino, bet ir ciklofosfamido bei karboplatinės, palyginus su šių citostatikų poveikiu be elektroporacijos. Pažymėtina, kad ir šiuo atveju bleomicino priešnavikinis veiksmingumas yra ryškiausias: po penkių dienų gydymo kurso priešnavikinis veiksmingumas siekė apie 99 proc., o navikų progresavimo nepastebėta apie 30 dienų.

Įvadas

Piktybinių navikų chemoterapija yra kompleksinio gydymo metodas, tačiau atskirais atvejais naudojamas ir kaip atskiras gydymo metodas. Chemoterapijos galimybės, gydant ligonius, sergančius onkologinėmis ligomis, dar labiau išsiplėčia skiriant priešnavikinių vaistų derinius, taikant priešnavikinius vaistus didelėmis dozėmis bei derinant su kitais piktybinių navikų gydymo būdais (chirurgija, radioterapija). Deja, atskirais atvejais susiduriama su problema, kai pagal veikimo mechanizmą ar citotoksiškumą priešnavikinis vaistas turėtų būti veiksmingas gydant tam tikrų lokalizacijų navikus, tačiau dėl savo biologinių savybių (hidrofilškumo, didelės molekulinės masės) vaistas blogai prasiskverbia pro navikinės ląstelės membraną. Dėl to, siekiant norimo poveikio, šio vaisto turi būti skiriama didelėmis toksinėmis dozėmis – dėl to pasireiškia vaisto nepageidaujamas poveikis.

Vienas iš daugelio būdų, siekiant padidinti priešnavikinių vaistų selektyvumą, yra elektrinių impulsų derinimas su vaistais nuo vėžio. Šis metodų derinys pavadintas elektrochemoterapija. Elektriniai impulsai sukelia pokyčių ląstelės membranoje: vyksta jos desta-

bilizacija, formuojasi laikinos „poros“ (elektroporacija), dėl to padidėja membranos pralaidumas jos išorėje esančioms medžiagoms, ir vaistas, kuris normaliomis sąlygomis sunkiai prasiskverbia į ląstelės vidų, lengvai pasiekia taikinį.

Siekdami patvirtinti elektroporacijos efektyvumą, derinant ją su priešnavikinius vaistais, pasirinkti trys preparatai, priklausantys skirtingoms vaistų nuo vėžio grupėms – tai karboplatina, ciklofosfamidai bei bleomicinas. Ciklofosfamidai priklauso alkilinančiųjų preparatų grupei. Šiai grupei priklausančios medžiagos pasižymi gebėjimu sukelti citotoksinį poveikį formuodamos kovalentines jungtis tarp reaktyvios alkilinančios grupės ir DNR. Ciklofosfamido metabolizmo procese susidaro šeši skirtingos cheminės struktūros junginiai, iš kurių trys pasižymi dideliu priešnavikiniu poveikiu. Karboplatina priklauso alkilinančiųjų platinos junginių grupei. Šios grupės preparatai į ląstelės vidų patenka lėtai pasyvios difuzijos būdu. Ląstelės viduje vyksta tarpinės reakcijos, kurių metu formuojasi platinos kompleksai. Toliau šie platinos kompleksai reaguoja su DNR formuodami tarp grandinių skersinius ryšius, o tai sąlygoja DNR replikaciją bei trans-

kripcijos inhibicija, dėl to įvyksta ląstelės žūtis. Bleomicinas (bleomicino sulfatas) priskiriamas priešnavikinių antibiotikų grupei. Bleomicinas slopina timidino įsitraukimą į DNR grandinę bei sutrikdo DNR struktūrą. *In vitro* gauti tyrimų rezultatai, panaudojus DC-3F ląstelių kultūrą, parodė, jog pakanka apie 500 bleomicino molekulių ląstelės viduje, kad ši ląstelė žūtų. Manoma, kad viena bleomicino molekulė gali dalyvauti suardant 8–10 DNR grandinių (1).

Šio darbo tikslas – atliekant tyrimus su eksperimentiniais gyvūnais, įvertinti vienkartinio ir pakartotinio (5 dienų) elektrochemoterapijos kursų efektyvumą skyrus skirtingoms priešnavikinių preparatų klasėms priklausančius vaistus (ciklofosfamidą, karboplatiną bei bleomiciną).

Tyrimo medžiaga ir metodai

Tyrimams naudotos C57Bl linijos pelės, kurioms įskiepyta epidermoidinė plaučių karcinoma (angl. *Lewis lung carcinoma* – LLC). Pradedant eksperimentą, pelės suskirstytos į grupes (po šešias peles grupėje): kontrolinę grupę sudarė gyvūnai, kuriems netaikytas joks poveikis; gydomąsias grupes: gyvūnai, kurie gydyti priešnavikiniais vaistais bei priešnavikiniais vaistais kartu su elektroporacija. Atliktos dvi serijos eksperimentų. Priešnavikiniai vaistai švirkšti tokiomis dozėmis: ciklofosfamidas – 200 mg/kg į pilvo ertmę; karboplatina – 20 mg/kg bei bleomicinas – 10 mg/kg į veną – tai suminės gydamosios dozės. Grupėje, kur vaistai nuo vėžio derinti su elektroporacija, gydymas skirtas tokia tvarka: gyvūnams sušvirkšti priešnavikiniai vaistai, o po 5 minučių atlikta navikų elektroporacija 1300 V/cm intensyvumu, 0,1 ms trukme, 1 Hz dažniu bei 8 impulsų pasikartojimu. Pakartotinio gydymo kurso metu skirtos tokios priešnavikinių vaistų dozės: ciklofosfamido – 100 mg/kg į pilvo ertmę ir karboplatinos – 10 mg/kg bei bleomicino – 5 mg/kg į veną. Šios dozės pasirinktos kaip vienkartinės gydamosios. Grupėje, kur skirta elektroporacija, šie vaistai tokiomis pat dozėmis derinti su elektriniais impulsais ir gydymas kartotas penkių dienų kursu. Gydymo poveikiui įvertinti navikų augimo stabdymas apskaičiuotas pagal formulę:

$$V=a \times b \times c \times 3,14/6,$$

kur: a – naviko ilgis, b – plotis, c – aukštis.

Elektrochemoterapijos efektyvumo įvertinimui pasirinkta 14-oji diena nuo gydymo pradžios. Ši diena pasirinkta kaip optimaliausia, nes jau šią dieną kontrolinės grupės gyvūnai, kuriems neskirta jokio gydymo, dėl navikų progresavimo bei metastazių pradeda žūti.

Rezultatai ir jų aptarimas

Siekiant palyginti elektrochemoterapijos efektyvumą, priklausomai nuo gydomojo kurso trukmės, atliktos dvi serijos eksperimentų.

Kaip jau minėta, gydymo rezultatai įvertinti 14-ąją eksperimento dieną. Ši diena optimali vertinant navikų atsaką į gydymą, nes vėliau kontrolinėje grupėje pelės žūva dėl negydyto naviko progresavimo bei metastazių.

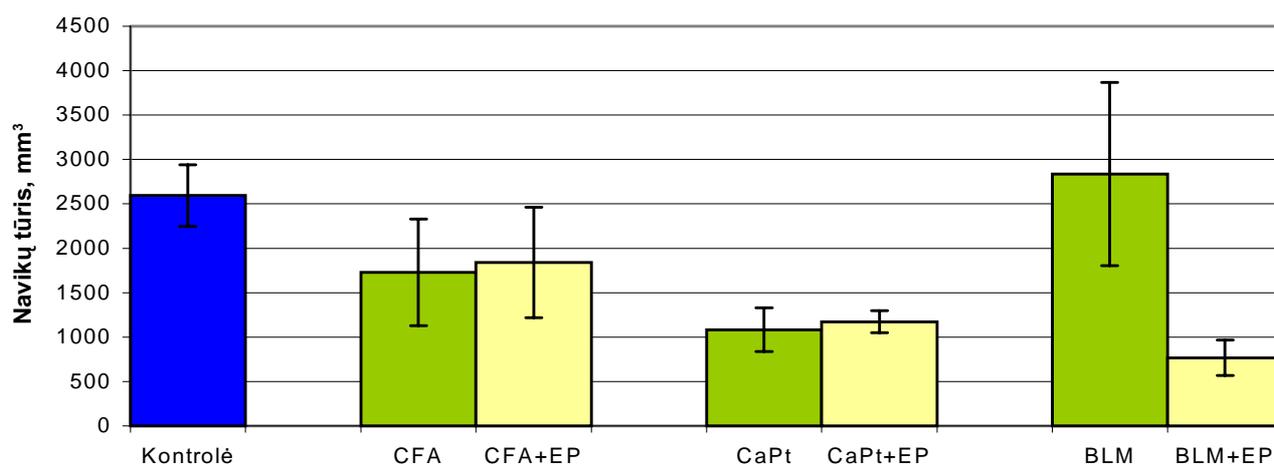
Pirmame paveiksle pateiktais duomenimis, kontrolinės grupės gyvūnams, kuriems neskirta jokio gydymo, navikų tūris siekė 2595 mm³, o grupės gyvūnams, kuriems sušvirkšta tik ciklofosfamido, navikų tūris buvo 1728 mm³ (p≤0,05), tai yra navikų atsakas į gydymą sudarė 33 proc. (apskaičiuota pagal formulę: T%=(K–B)/K×100, kur: K – kontrolė, B – bandymas). Taigi duomenys rodo, jog ciklofosfamidas švirkščiamas gyvūnams vieną kartą 200 mg/kg doze slopino navikų augimą. Pažymėtina, kad taikyta navikų elektroporacija, praėjus 5 min. po ciklofosfamido injekcijos, šio vaisto veiksmingumui įtakos neturėjo – navikų augimas sustabdytas 29 proc. Statistiškai reikšmingo skirtumo tarp elektrochemoterapijos ir citostatiniko poveikio nenustatyta.

Tiriant kito vaisto nuo vėžio – karboplatinos poveikį navikų augimui, nustatytas ryškus plaučių epidermoidinės karcinomos augimo stabdymas – apie 58 proc. Tačiau ir šiuo atveju elektroporacija neturėjo didesnės įtakos priešnavikinio vaisto veiksmingumui – gydymo atsakas – 55 proc.

Mažiausias gydymo poveikis nustatytas gydant epidermoidinę plaučių karcinomą tik bleomicinu. Navikų augimas, gydant bleomicinu, buvo panašus į kontrolinės grupės navikų augimą, o taikant navikų elektroporaciją po bleomicino injekcijos, nustatytas ryškus navikų tūrio sumažėjimas – 70 proc. palyginus su navikų tūriais kontrolinės bei tik bleomicinu gydytos grupės gyvūnais.

Pateiktais duomenimis, elektroporaciją tikslinga derinti su bleomicinu, nes vienas bleomicinas neveiksmingas, o, taikant elektrinius impulsus, bleomicino veiksmingumas gerokai padidėjo. Tai įrodyta ir daugelio tyrėjų tyrimų duomenimis, nustatytais atlikus tyrimus su gyvūnais (2–6) bei patvirtinta klinikiniais tyrimais (7–9).

Tai, kad navikų elektroporacija gali padidinti kai kurių priešnavikinių vaistų veiksmingumą (didelės molekulinės masės, hidrofiliškų) įrodymais pagrįstų duomenų jau pakanka, tačiau nėra pakankamai duomenų apie elektroporacijos įtaką priešnavikinių vaistų veiksmingumui pakartotinio elektrochemoterapijos kurso metu.



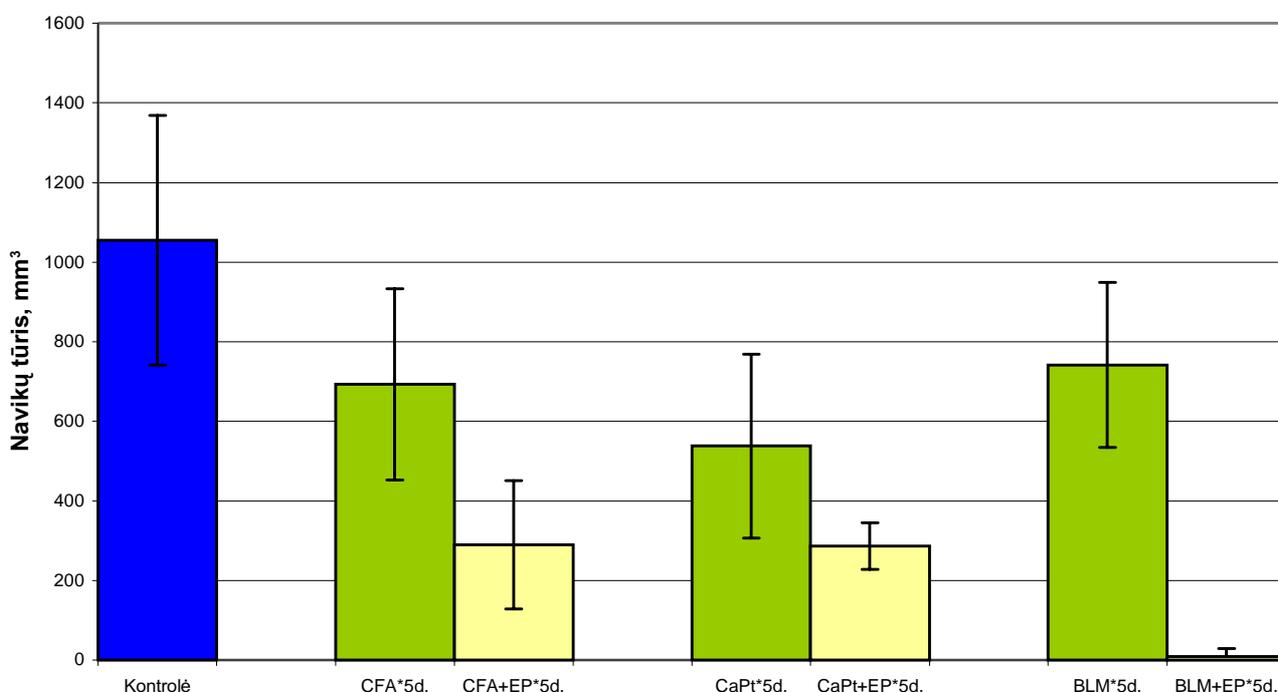
1 pav. Priešnavikinių vaistų bei jų derinio su elektroporacija priešnavikinis veiksmingumas gydant plaučių epidermoidinę karcinomą taikant vienkartinę elektrochemoterapijos poveikį

Ciklofosfamido (CFA) švirkšta 200 mg/kg, karboplatinos (CaPt) – 20 mg/kg, bleomicino (BLM) – 10 mg/kg, elektroporacija (EP) taikyta 1300 V/cm intensyvumu, 0,1 ms trukme, 1 Hz dažniu ir 8 impulsų pasikartojimu.

Todėl atlikome tyrimus, siekdami įvertinti pakartotinės elektrochemoterapijos įtaką priešnavikinių vaistų veiksmingumui.

Antrame paveiksle pateiktais duomenimis, derinant elektroporaciją su ciklofosfamidu (100 mg/kg doze) ir pakartotinio penkių dienų gydymo kurso metu, plaučių epidermoidinės karcinomos augimas slopi-

namas 73 proc., o gydant navikus tik ciklofosfamidu penkis dienas, gydymasis atsakas siekė 34 proc. ($p \leq 0,05$). Matyt, atliekant pakartotinę elektroporaciją, į ląstelės vidų patenka jau aktyvūs ciklofosfamido metabolitai, pasižymintys pagrindiniu citotoksinio poveikiu navikinėms ląstelėms, dėl to didesnis antinavikinis efektyvumas pastebėtas taikant navikų elektro-



2 pav. Priešnavikinių vaistų bei jų derinio su elektroporacija priešnavikinis veiksmingumas gydant plaučių epidermoidinę karcinomą 5 dienų gydymo kurso metu

Ciklofosfamido (CFA) švirkšta 100 mg/kg, karboplatinos (CaPt) – 10 mg/kg, bleomicino (BLM) – 5 mg/kg, elektroporacija (EP) taikyta 1300 V/cm intensyvumu, 0,1 ms trukme, 1 Hz dažniu ir 8 impulsų pasikartojimu.

poraciją.

Penkių dienų gydymo kurso metu karboplatinosis (dozė 10 mg/kg) poveikis navikų augimui buvo ryškus: 49 proc. palyginti su kontrolinės grupės navikų augimo stabdymu. Pažymėtina, kad, taikant navikų elektroporaciją, nustatytas navikų augimo sustabdymas apie 73 proc. Manoma, kad pakartotinė elektroporacija sąlygoja didesnę karboplatinosis patekimą į navikines ląsteles ir dėl to didėja karboplatinosis priešnavikinis veiksmingumas.

Derinant elektroporaciją su bleomicinu (dozė – 5 mg/kg) ir skiriant penkių dienų gydymo kursą, poveikis navikų augimui buvo didžiausias. Jei vienas bleomicinas, skirtas gyvūnams penkių dienų gydymo kurso metu, labai nežymiai stabdė navikų augimą (tik 30 proc.), tai, taikant navikų elektroporaciją, jau ketvirtą gydymo kurso dieną pastebėtas ryškus navikų atsakas į gydymą – 99 proc. atvejų užfiksuota navikų regresija. Derinant bleomiciną su elektroporacija, navikų augimo nenustatyta beveik 30 dienų, tačiau kitose grupėse dėl tolesnio navikų progresavimo gyvūnai pradėjo žūti jau 12-ąją dieną nuo eksperimento pradžios.

Kitų tyrėjų duomenimis, *in vitro* elektroporacija turi įtakos įvairių priešnavikinių vaistų – cisplatinosis, aktinomicinosis D, metotreksato, vinkristinosis, vinblastinosis

citotoksiškumas padidėja nuo 1 iki 12 kartų, tačiau didžiausias citotoksiškumo padidėjimas, taikant elektroporaciją, užfiksuotas bleomicinosis atveju – net iki 300–700 kartų (2, 10).

Geriausias atsakas į gydymą, taikant elektroporaciją, užfiksuotas skiriant bleomiciną, paaiškinamas tuo, jog bleomicinas pagal savo struktūrą yra didelės molekulinės masės cheminis junginys, įprastinėmis sąlygomis sunkiai prasiskverbiantis per navikinės ląstelės membranos barjerą. Todėl elektriniai impulsai, siekiant padidinti bleomicinosis poveikį, yra tikslingiausias ir optimaliausias būdas.

Išvados

Siekiant įvertinti ir palyginti elektroporacijos įtaką skirtingų priešnavikinių grupių vaistų: ciklofosfamido, karboplatinosis ir bleomicinosis veiksmingumui vienkartinio ir penkių dienų gydymo kurso metu, nustatyta, kad vienkartinis elektroporacijos poveikis navikinių ląstelių membranoms labiausiai didina bleomicinosis citostatiniį poveikį. Taikant elektrochemoterapiją gydymo kurso metu, priešnavikinis efektyvumas padidėjo visiems trimis tirtiems citostatikams.

Siekiant padidinti priešnavikinį elektrochemoterapijos efektyvumą, pakartotinis gydymo kursas lėmė ryškų bleomicinosis citotoksiškumo padidėjimą.

The role of electroporation in increasing the effectiveness of anticancer drugs

Jūratė Labanauskienė, Janina Didžiapetrienė, Eduardas Aleknavičius

Institute of Oncology, Vilnius University, Lithuania

Key words: electrochemotherapy, bleomycin, cyclophosphamide, carboplatinum.

Summary. By applying electric pulses to tumor the membrane of tumor cells undergoes destabilization that enables the drug molecules to enter into the cells more freely and selectivity of anticancer drugs increases. Thus, administering smaller doses of anticancer drugs it might be possible to achieve a better therapeutic effect and to reduce side effects of cytostatic therapy. Such combination of chemotherapy with electric pulses is called electrochemotherapy.

The aim of this study was to evaluate the anticancer effectiveness of single and repeated courses of electrochemotherapy with three different anticancer agents (cyclophosphamide, carboplatinum and bleomycin) using experimental animals.

It was established that electrochemotherapy used as a single treatment the best increases cytotoxicity of bleomycin. While applying the electrochemotherapy course for 5 days all investigated anticancer drugs showed higher cytotoxicity as compared to the effect of these cytostatics without electroporation. It is notable that in this case antitumor effect of bleomycin was the highest – 99% of treated tumors showed a high response rate and no recurrence was observed for 30 days.

Correspondence to J. Labanauskienė, Institute of Oncology, Vilnius University, Santariškių 1, 08660 Vilnius, Lithuania
E-mail: labajura@takas.lt

Literatūra

1. Heller R, Jaroszeski M, Leo-Messina J, et al. Treatment of B16 melanoma with combination of electroporation and chemotherapy. *Bioelectrochem Bioenerg* 1995;36:83-7.
2. Gehl J, Skovsgaard T, Mir L. Enhancement of cytotoxicity by electropermeabilization: an improved method for screening drugs. *Anti-Cancer Drugs* 1998;9:319-25.
3. Pron G, Mahrour N, Orłowski S, et al. Internalisation of the bleomycin molecules responsible for bleomycin toxicity: a receptor-mediated endocytosis mechanism. *Biochemical Pharmacol* 1999;57:45-56.
4. Rabussay D, Nanda G, Goldfarb P. Enhancing the effectiveness of drug-based cancer therapy by electroporation (electropermeabilization). *Techn Cancer Res Treat* 2002;1:71-82.
5. Labanauskienė J, Šatkauskas S. Elektrochemoterapijos efektyvumo tyrimai panaudojus ciklofosfamidą. (Evaluation of electrochemotherapy effectiveness with cyclophosphamide.) *Medicina (Kaunas)* 1999;35(3):114-8.
6. Labanauskienė J, Šatkauskas S. Elektrochemoterapija: antinavikinių vaistų efektyvumo padidinimas naudojant juos su elektriniais impulsais. (Electrochemotherapy: increase of anticancer drugs effectiveness by applying electric pulses.) *Medicina (Kaunas)* 2000;36(8):890-4.
7. Domenge C, Orłowski S, Luboinski B, et al. Antitumor electrochemotherapy: new advances in the clinical protocol. *Cancer* 1996;77(5):956-63.
8. Jaroszeski M, Gilbert R, Heller R. Electrochemotherapy: an emerging drug delivery method for the treatment of cancer. *Adv Dr Deliv Rev* 1997;26:185-97.
9. Gothelf A, Mir L, Gehl J. Electrochemotherapy: results of cancer treatment using enhanced delivery of bleomycin by electroporation. *Cancer Treat Rev* 2003;29(5):371-87.
10. Jaroszeski M, Dang V, Pottinger C, et al. Toxicity of anticancer agents mediated by electroporation in vitro. *Anti-Cancer Drugs* 2000;11:201-8.

Straipsnis gautas 2005 11 07, priimtas 2006 01 14

Received 7 November 2005, accepted 14 January 2006