

UNIVERZA V LJUBLJANI
BIOTEHNIŠKA FAKULTETA
ŠTUDIJ MOLEKULSKE IN FUNKCIONALNE BIOLOGIJE

Tjaša POTOČNIK

**UČINEK ELEKTROKEMOTERAPIJE V
KOMBINACIJI Z INHIBITORJI BRAF PRI
MELANOMSKIH CELICAH *IN VITRO***

MAGISTRSKO DELO

Magistrski študij - 2. stopnja

Ljubljana, 2016

UNIVERZA V LJUBLJANI
BIOTEHNIŠKA FAKULTETA
ŠTUDIJ MOLEKULSKE IN FUNKCIONALNE BIOLOGIJE

Tjaša POTOČNIK

**UČINEK ELEKTROKEMOTERAPIJE V KOMBINACIJI Z
INHIBITORJI BRAF PRI MELANOMSKIH CELICAH *IN VITRO***

MAGISTRSKO DELO

Magistrski študij - 2. stopnja

**EFFECT OF ELECTROCHEMOTHERAPY IN COMBINATION
WITH BRAF INHIBITORS ON MELANOMA CELL LINES *IN VITRO***

M. SC. THESIS

Master Study Programmes

Ljubljana, 2016

Magistrsko delo je zaključek Magistrskega študijskega programa 2. stopnje Molekulske in funkcionalne biologije.

Delo sem opravljala na Onkološkem inštitutu v Ljubljani, na Oddelku za eksperimentalno onkologijo.

Po sklepu Komisije za študij 1. in 2. stopnje oziroma Senata oddelka je bil dne 20. 2. 2015 za mentorja imenovan prof. dr. Gregor Serša za recenzentko pa prof. dr. Maja Čemažar.

Komisija za oceno in zagovor:

Predsednica: doc. dr. Jerneja AMBROŽIČ AVGUŠTIN
Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Oddelek za biologijo

Član: prof. dr. Gregor SERŠA
Onkološki inštitut, Oddelek za eksperimentalno onkologijo

Članica: prof. dr. Maja ČEMAŽAR
Onkološki inštitut, Oddelek za eksperimentalno onkologijo

Datum zagovora: 13.10.2016

Podpisana izjavljam, da je magistrsko delo rezultat lastnega raziskovalnega dela. Izjavljam, da je elektronski izvod identičen tiskanemu. Na univerzo neodplačno, neizključno, prostorsko in časovno neomejeno prenašam pravici shranitve avtorskega dela v elektronski obliki in reproduciranja ter pravico omogočanja javnega dostopa do avtorskega dela na svetovnem spletu preko Digitalne knjižnice Biotehniške fakultete.

Tjaša Potočnik

KLJUČNA DOKUMENTACIJSKA INFORMACIJA

- ŠD Du2
- DK UDK 6:616(043.2)=163.6
- KG elektrokemoterapija/bleomicin/ BRAF inhibitorji/vemurafenib/melanom
- AV POTOČNIK, Tjaša, diplomirana biologinja (UN)
- SA SERŠA, Gregor (mentor)
- KZ SI-1000 Ljubljana, Jamnikarjeva 101
- ZA Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Študij molekulske in funkcionalne biologije
- LI 2016
- IN UČINEK ELEKTROKEMOTERAPIJE V KOMBINACIJI Z INHIBITORJI BRAF PRI MELANOMSKIH CELICAH *IN VITRO*
- TD Magistrsko delo (Magistrski študij molekulska in funkcionalna biologija - 2. stopnja)
- OP XII, 47 str., 2 pregl., 12 sl., 60 vir.
- IJ sl
- JI sl/en
- AI Elektrokemoterapija je vse bolj uveljavljena terapija kožnih tumorjev različnih histologij. Med novejšimi pristopi zdravljenja melanoma so tudi tarčna zdravila, ki imajo za tarčo mutiran BRAF. Cilj naše raziskave je bil ugotoviti ali je občutljivost melanomskih celic na elektrokemoterapijo z bleomicinom enaka pri celicah z ali brez *braf* mutacije. Elektrokemoterapija bi se lahko uporabljala pri bolnikih, ki so že prejeli ali prejemajo terapijo s tarčnimi zdravili za mutiran protein BRAF, zato smo preverili ali je elektrokemoterapija z bleomicinom učinkovita tudi pri kombiniranem zdravljenju z BRAF inhibitorjem vemurafenibom. Elektrokemoterapiji z bleomicinom smo izpostavili dve celični liniji, z (SK-MEL 28) in brez (CHL-1) V600E mutacije v genu *braf*. Celično preživetje smo določili s testom klonogenosti. Ocenili smo učinkovitosti elektrokemoterapije z bleomicinom na celicah z ali brez mutacije *braf*. Prav tako smo preverili učinkovitost elektrokemoterapije z bleomicinom ob sočasni izpostavitvi celične linije SK-MEL 28 vemurafenibu. Ugotovili smo, da je bilo ob izpostavitvi elektrokemoterapiji z bleomicinom preživetje celic z mutacijo v genu *braf* nižje od preživetja celic brez mutacije. Opazili smo sinergističen učinek med elektrokemoterapijo z bleomicinom in izpostavitvijo vemurafenibu pri melanomskih celicah z mutacijo v genu *braf*. Učinkovitost elektrokemoterapije z bleomicinom na melanomskih celicah z *braf* mutacijo in potencial za učinkovitost le te med zdravljenjem z vemurafenibom *in vitro* nakazuje na možnost klinične uporabe elektrokemoterapije z bleomicinom sočasno z zdravljenjem z vemurafenibom ob prisotnosti *braf* mutacije pri bolnikih z melanomom.

KEY WORDS DOCUMENTATION

ND Du2
 DC UDC 6:616(043.2)=163.6
 CX electrochemotherapy/bleomycin/BRAF inhibitors/vemurafenib/melanoma
 AU POTOČNIK, Tjaša
 AA SERŠA, Gregor (supervisor)
 PP SI-1000 Ljubljana, Jamnikarjeva 101
 PB University of Ljubljana, Biotechnical Faculty, Master Study Programmes in Molecular and Functional Biology
 PY 2016
 TY EFFECT OF ELECTROCHEMOTHERAPY IN COMBINATION WITH BRAF INHIBITORS ON MELANOMA CELL LINES *IN VITRO*
 DT M. Sc. Thesis (Master Study Programmes – Molecular and Functional Biology)
 NO XII, 47 p., 2 tab., 12 fig., 60 ref.
 LA sl
 Al sl/en
 AB Electrochemotherapy is increasingly being used as a therapy for skin tumors of various histological origins. Among the newest treatment approaches for melanoma are target drugs that target mutated BRAF. The aim of our study was to assess if effectiveness of electrochemotherapy with bleomycin is the same on BRAF mutated and non-mutated melanoma cells. Electrochemotherapy could be used in patients who have already received or are receiving therapy with drugs that target mutated BRAF gene, so we verified whether electrochemotherapy with bleomycin is also effective during the treatment of melanoma patients with BRAF inhibitor vemurafenib. Electrochemotherapy with bleomycin was performed on two human melanoma cell lines, with (SK-MEL-28) or without (CHL-1) BRAF V600E mutation. Cell survival was determined using clonogenic assay to determine the effectiveness of electrochemotherapy with bleomycin in melanoma cells of different mutation status. Furthermore, the effectiveness of electrochemotherapy with bleomycin in concomitant treatment with BRAF inhibitor vemurafenib was also determined in BRAF mutated cells SK-MEL-28 with clonogenic assay. The survival of BRAF V600E mutated melanoma cells after treatment with electrochemotherapy with bleomycin was even lower than non-mutated cells, Furthermore, the synergistic interaction between vemurafenib and electrochemotherapy with bleomycin was demonstrated in the BRAF V600E mutated melanoma cells. The effectiveness of electrochemotherapy with bleomycin in BRAF mutated melanoma cells as well as potentiation of its effectiveness during the treatment with vemurafenib *in vitro* implies on clinical applicability of electrochemotherapy with bleomycin in melanoma patients with BRAF mutation and/or during the treatment with BRAF inhibitors.

KAZALO VSEBINE

| | str. |
|--|-------------|
| KLJUČNA DOKUMENTACIJSKA INFORMACIJA | III |
| KEY WORDS DOCUMENTATION | IV |
| KAZALO VSEBINE | V |
| KAZALO PREGLEDNIC | VIII |
| KAZALO SLIK | IX |
| OKRAJŠAVE IN SIMBOLI | XI |
| | |
| 1 UVOD | 1 |
| 1.1 OPREDELITEV PROBLEMA | 1 |
| 1.2 CILJ MAGISTRSKEGA DELA | 2 |
| 1.3 DELOVNI HIPOTEZI | 2 |
| 2 PREGLED OBJAV | 3 |
| 2.1 MELANOM | 3 |
| 2.2 GENETSKI DEJAVNIKI | 3 |
| 2.2.1 Gen <i>braf</i>..... | 4 |
| 2.3 NAČINI ZDRAVLJENJA MELANOMA..... | 6 |
| 2.3.1 Tarčna zdravila | 7 |
| 2.3.2 Male molekule..... | 7 |
| 2.3.2.1 Vemurafenib..... | 8 |
| 2.3.3 Bleomicin..... | 10 |
| 2.3.4 Elektroporacija..... | 10 |
| 2.3.5 Elektrokemoterapija | 11 |
| 2.3.6 Protokol zdravljenja ESOPE | 12 |
| 3 MATERIAL IN METODE..... | 14 |
| 3.1 MATERIAL | 14 |
| 3.1.1 Oprema..... | 14 |

| | | |
|--------------|---|-----------|
| 3.1.2 | Gojišče in dodatki..... | 14 |
| 3.1.3 | Ostali reagenti in raztopine | 14 |
| 3.1.4 | Celični liniji..... | 15 |
| 3.2 | METODE | 15 |
| 3.2.1 | Gojenje celičnih linij | 15 |
| 3.2.2 | Določanje rasti krivulj celičnih linij CHL-1 in SK-MEL 28 s testom Presto Blue | 16 |
| 3.2.3 | Protitumorske učinkovine | 16 |
| 3.2.3.1 | Bleomicin | 16 |
| 3.2.3.2 | Vemurafenib..... | 17 |
| 3.2.4 | Testiranje citotoksičnosti elektrokemoterapije z bleomicinom | 17 |
| 3.2.4.1 | Elektrokemoterapija | 17 |
| 3.2.4.2 | Test klonogenosti | 18 |
| 3.2.4.3 | Barvanje z barvilom kristal vijolično | 20 |
| 3.2.4.4 | Štetje kolonij | 20 |
| 3.2.5 | Testiranje citotoksičnosti različnih koncentracij vemurafeniba..... | 22 |
| 3.2.6 | Testiranje kombiniranega tretiranja celic z vemurafenibom in elektrokemoterapijo z bleomicinom | 22 |
| 3.2.7 | Računanje vrednosti IC₉₀ | 23 |
| 3.2.8 | Določanje interakcije med bleomicinom in vemurafenibom..... | 23 |
| 3.2.9 | Statistična analiza..... | 24 |
| 4 | REZULTATI | 26 |
| 4.1 | DOLOČANJE RASTNIH KRIVULJ CELIČNIH LINIJ CHL-1 IN SK-MEL 28..... | 26 |
| 4.2 | TESTIRANJE CITOTOKSIČNOSTI ELEKTROKEMOTERAPIJE Z BLEOMICINOM | 27 |
| 4.3 | TESTIRANJE CITOTOKSIČNOSTI RAZLIČNIH KONCENTRACIJ VEMURAFENIBA | 29 |
| 4.4 | TESTIRANJE KOMBINIRANEGA TRETIRANJA CELIC Z VEMURAFENIBOM IN ELEKTROKEMOTERAPIJO Z BLEOMICINOM | 31 |
| 4.4.1 | Določanje interakcije med bleomicinom in vemurafenibom..... | 33 |
| 5 | RAZPRAVA | 34 |

| | | |
|----------|----------------------|-----------|
| 6 | SKLEPI | 39 |
| 7 | POVZETEK..... | 40 |
| 8 | VIRI..... | 42 |

ZAHVALA

KAZALO PREGLEDNIC

| | str. |
|--|------|
| Pregl 1: Število nasajenih celic celičnih linij SK-MEL 28 in CHL-1 pri različnih koncentracijah bleomicina brez (BLM) in ob elektrokemoterapiji (EP + BLM)..... | 19 |
| Pregl 2: Število nasajenih celic celične linije SK-MEL 28 pri različnih koncentracijah bleomicina brez (BLM + VMF) in ob elektrokemoterapiji (EP + BLM + VMF) in tretiranju z vemurafenibom..... | 23 |

KAZALO SLIK

| | str. |
|--|------|
| SI 1: A) Potek MAPK signalne poti z nemutiranim BRAF. B) Potek MAPK signalne poti ob prisotnosti mutiranega BRAF. C) Inhibicija mutiranega BRAF z vemurafenibom | 5 |
| SI 2: Strukturna formula vemurafeniba | 8 |
| SI 3: Shematski prikaz vezave vemurafeniba v aktivno mesto BRAF z mutacijo V600E | 9 |
| SI 4: Fotografija kolonije celic celične linije CHL-1. | 21 |
| SI 5: Fotografija kolonije celic celične linije SK-MEL 28. | 21 |
| SI 6: Rastna krivulja celične linije CHL-1. | 26 |
| SI 7: Rastna krivulja celične linije SK-MEL 28. | 27 |
| SI 8: Primerjava citotoksičnosti samega bleomicina (BLM) in bleomicina v kombinaciji z elektrokemoterapijo (EP) na celični liniji SK MEL-28, ki ima izražen mutiran gen <i>braf</i> (V600E) in celični liniji CHL-1, ki ima izražen divji tip gena <i>braf</i> | 28 |
| SI 9: Prikaz citotoksičnosti različnih koncentracij vemurafeniba (VMF) na celično linijo CHL-1 ki ima divji tip gena <i>braf</i> | 29 |
| SI 10: Prikaz citotoksičnosti različnih koncentracij vemurafeniba (VMF) na celično linijo SK-MEL 28, ki ima mutacijo V600E v genu <i>braf</i> | 30 |
| SI 11: Primerjava citotoksičnosti izpostavitve celične linije SK MEL-28, ki ima izražen mutiran gen <i>braf</i> (V600E) bleomicinu in vemurafenibu (BLM + VMF) in elektrokemoterapiji z bleomicinim v kombinaciji s tretiranjem z vemurafenibom (BLM + EP + VMF). | 31 |
| SI 12: Primerjava citotoksičnosti izpostavitve celične linije SK-MEL 28 , ki ima izražen mutiran gen <i>braf</i> (V600E) bleomicinu (BLM), elektrokemoterapiji z bleomicinim (BLM + EP), bleomicinu in vemurafenibu (BLM + VMF) in | |

| | |
|---|----|
| elektrokemoterapiji z bleomicinim v kombinaciji s tretiranjem z vemurafenibom (BLM + EP + VMF)..... | 32 |
|---|----|

OKRAJŠAVE IN SIMBOLI

| Okrajšava | Pomen |
|---------------------------------|--|
| A | adenin |
| AMEM | napredni minimalni esencialni medij |
| ATP | adenozin trifosfat |
| BLM | bleomicin |
| BRIM | BRAF inhibitorji pri melanomu |
| C | citozin |
| CDK | od ciklina odvisna kinaza |
| D | asparaginska kislina |
| dH ₂ O | destilirana voda |
| DMSO | dimetilsulfoksid |
| DNA | deoksiribonukleinska kislina |
| E | glutaminska kislina |
| EDTA | etilendiaminotetraetanojska kislina |
| EF | faktor izboljšave učinka |
| EGFR | receptor za epidermalni rastni faktor |
| EP | elektroporacija |
| ERK | z zunajceličnim signalom regulirana kinaza |
| ESOPE | evropski standardni postopki za elektrokemoterapijo |
| FBS | serum govejega zarodka |
| FDA | Administracija za hrano in zdravila |
| G | gvanin |
| GDP | gvanozin-difosfat |
| GTP | gvanozin-trifosfat |
| HIF | hipoksija inducibilni faktor |
| IC ₉₀ | koncentracija, ki povzroči 90 % inhibicijo rasti celic |
| K | lizin |
| K ₂ HPO ₄ | dikalijev hidrogenfosfat |
| MAPK/Mek | z mitogenom aktivirana proteinska kinaza |

| | |
|-------|---|
| mRNK | informacijska ribonukleinska kislina |
| PBS | fiziološka raztopina v fosfatnem pufri |
| PDGFR | receptor za iz trombocitov izhajajoči rastni dejavnik |
| PE | uspešnost nasaditve |
| RNK | ribonukleinska kislina |
| RPMI | Roswell Park Memorial inštitut |
| rRNK | ribosomska ribonukleinska kislina |
| RTK | receptorska tirozinska kinaza |
| SF | faktor preživetja |
| T | timin |
| tRNK | prenašalna ribonukleinska kislina |
| UV | ultravijolična svetloba |
| V | valin |
| VEGF | vaskularni endotelijski rastni faktor |
| VMF | vemurafenib |

1 UVOD

Melanom spada med eno od najbolj agresivnih in na zdravljenje neobčutljivih vrst rakavih obolenj. Ob napredovanju melanoma se manjšajo možnosti za uspešno zdravljenje. Dosedanja opažanja so pokazala, da monoterapija pri zdravljenju melanoma ne doseže želenega učinka. Večji uspeh je dosežen s kombiniranim, zdravljenjem, ki vključuje različne strategije. V zadnjih letih je razumevanje molekulskih mehanizmov nastanka bolezni omogočilo razvoj novih načinov zdravljenja. En od teh načinov je tarčno zdravljenje. Pri tarčnem zdravljenju specifično ciljamo določene tarče, ki so izražene v rakavih celicah. Tudi tarčno zdravljenje deluje najbolje v kombinaciji. Ta lahko vključuje več tarčnih zdravil skupaj ali pa tarčno zdravilo in klasično kemoterapijo (Snoj in Čufer, 2009). Pri zdravljenju rakavih obolenj je pogosto problem tudi v dostavi zdravil do njihovih tarč v celicah. Mnoga zdravila slabo prehajajo čez celične membrane, posledično je njihov učinek majhen ali pa so za zdravljenje potrebe visoke koncentracije, ki povzročajo več stranskih učinkov. Prehod zdravil čez celično membrano se lahko znatno poveča z uporabo elektrokemoterapije (Serša in sod. 2011). Najboljše rezultate pri zdravljenju malignega melanoma dosežemo z multidisciplinarnim pristopom. Kombinacija tarčnega zdravila (BRAF inhibitorja) in izboljššan prehod zdravil v celice (elektrokemoterapija), bi lahko omogočila večji uspeh pri zdravljenju malignega melanoma.

1.1 OPREDELITEV PROBLEMA

Elektrokemoterapija je vse bolj uveljavljena terapija kožnih tumorjev različnih histologij. Uveljavljena je v več kot 140 onkoloških centrih po Evropi, predvsem pa se uveljavlja pri zdravljenju kožnih metastaz malignega melanoma. Med novejšimi pristopi zdravljenja malignega melanoma so tudi tarčna zdravila, ki imajo za tarčo mutiran protein BRAF. Vemurafenib je inhibitor mutiranega BRAF, ki se uporablja za zdravljenje bolnikov, ki imajo potrjeno mutacijo V600E v genu *braf*. Celice malignega melanoma z mutacijo *braf* se hitreje delijo in so pogosto neodzivne na standardno zdravljenje. Zato bi bilo potrebno najti nove učinkovitejše načine zdravljenja takih bolnikov. Eden od takih načinov bi lahko bila elektrokemoterapija z bleomicinom v kombinaciji z BRAF inhibitorjem vemurafenibom. Elektrokemoterapija z bleomicinom bi se lahko uporabljala pri bolnikih, ki so že prejeli ali prejema terapijo s tarčnimi zdravili za mutiran BRAF.

1.2 CILJ MAGISTRSKEGA DELA

Cilj magistrskega dela je ugotoviti morebitne razlike v učinkovitosti elektrokemoterapije na celicah malignega melanoma z ali brez mutacije v genu *braf*. Želimo ugotoviti citotoksičnost elektrokemoterapije z bleomicinom *in vitro* na celicah malignega melanoma, ki imajo prisotno V600E mutacijo v genu *braf*, in izražajo mutiran protein BRAF, in celicah, ki nimajo mutacije V600E v genu *braf*. Zanima nas tudi učinkovitost elektrokemoterapije z bleomicinom na celicah malignega melanoma z mutacijo v genu *braf* ob sočasni izpostavitvi inhibitorju mutiranega BRAF proteina vemurafenibu.

1.3 DELOVNI HIPOTEZI

Pričakujemo, da so celice z mutacijo v genu *braf*, ki imajo izraženo mutirano obliko BRAF proteina, enako občutljive na elektrokemoterapijo z bleomicinom kot celice z divjim tipom gena *braf*.

Predvidevamo, da sočasno zdravljenje z inhibitorjem mutiranega proteina BRAF vemurafenibom, ne vpliva na občutljivost melanomskih celic na elektrokemoterapijo z bleomicinom.

2 PREGLED OBJAV

2.1 MELANOM

Tri najpogostejše oblike kožnega raka so bazalno celični karcinom, ploščato celični karcinom in melanom. Melanom ja najagresivnejša oblika kožnega raka. Nastane kot posledica maligne transformacije pigmentnih celic, melanocitov. To so celice v koži, ki proizvajajo kožni pigment melanin. V zgodnji radialni fazi se melanociti razraščajo horizontalno, v naslednji vertikalni fazi pa se tumor prične vraščati v dermis. Poveže se s krvnimi žilami, kar mu omogoči metastaziranje v oddaljena tkiva; kožo, podkožje, bezgavke, pljuča, možgane in jetra (Miller in Mihim, 2006). Najpogosteje se razvije na soncu izpostavljeni koži, redkeje pa že iz predhodnih benignih melanocitnih proliferacij. Večkrat se pojavlja pri ljudeh bele rase, predvsem tistih z občutljivo, svetlo kožo, ki težko porjavi. V Sloveniji se melanom pogosteje pojavlja pri ženskah, pri obeh spolih pa se incidenca veča s starostjo. Pri moških se melanom najpogosteje pojavlja na koži trupa pri ženskah pa na spodnjih okončinah (Žakelj in sod., 2007).

Melanom je najmanj pogosta oblika kožnega raka, a je zaradi svoje sposobnosti metastaziranja vzrok za približno 80 % vseh smrti, ki so posledica kožnega raka (Strickland in sod., 2015). Incidenca melanoma v zadnjih desetletjih postopno in vztrajno narašča. V nekaterih predelih Evrope so opazili tudi desetkratno povečanje. Vzroki porasta incidence še niso znani, verjetno pa imajo vpliv povečana izpostavljenost UV žarkom, genetska predispozicija, izboljššan nadzor in zgodnejše odkrivanje obolenj. Izpostavljenost UV žarkom je eden največjih dejavnikov tveganja za nastanek melanoma. UV žarki povzročijo genske mutacije, nastanek pirimidinskih dimerov (ciklobutan, 6,4- fotoadukti), zmanjšano odpornost in povzročijo oksidativni stres (Simões in sod., 2015).

2.2 GENETSKI DEJAVNIKI

Rakava obolenja se razvijejo kot posledica kopičenja mutacij v genih, ki spremenijo normalno delovanje celice. Celično homeostazo omogoča usklajenost štirih ključnih celičnih procesov. To so celična delitev, diferenciacija, staranje in apoptoza (Davies in sod., 2002). Za rakava obolenja je značilna nenormalna, nekontrolirana in neusklajena celična rast. Glavni geni vključeni pri celičnih spremembah in nastanku rakavih obolenj se delijo na onkogene in tumor supresorske gene (Polsky in Cordon-Cardo, 2003).

Protoonkogeni so geni, ki omogočajo celično delitev in rast. Med njih sodijo geni, ki nosijo zapis za različne rastne dejavnike, receptorje, signalne prenašalce in jedrne transkripcijske faktorje. Z mutacijo iz protoonkogen nastane onkogen. Točkovna mutacija, pomnožitev, translokacija ali vstavitev ne evkariontskega zaporedja lahko povzroči povečano ali

neprestano aktivacijo onkogenov (Polsky in Cordon-Cardo, 2003). Na stopnjo izražanja onkogenov pomembno vpliva tudi stopnja metilacije. Pretvorbo protoonkogenov v onkogeni večinoma povzroči sprememba v promotorski regiji gena. Izražanje onkogenov je dominantno, tako da je za aktivacijo onkogenov dovolj samo en mutiran alel. Mutacije v protoonkogenih so pogosto povezane s sporadičnimi oblikami rakavih obolenj. Najpogostejši onkogeni so *ras*, *myc*, *src* in *raf* (Novaković in sod. 2009).

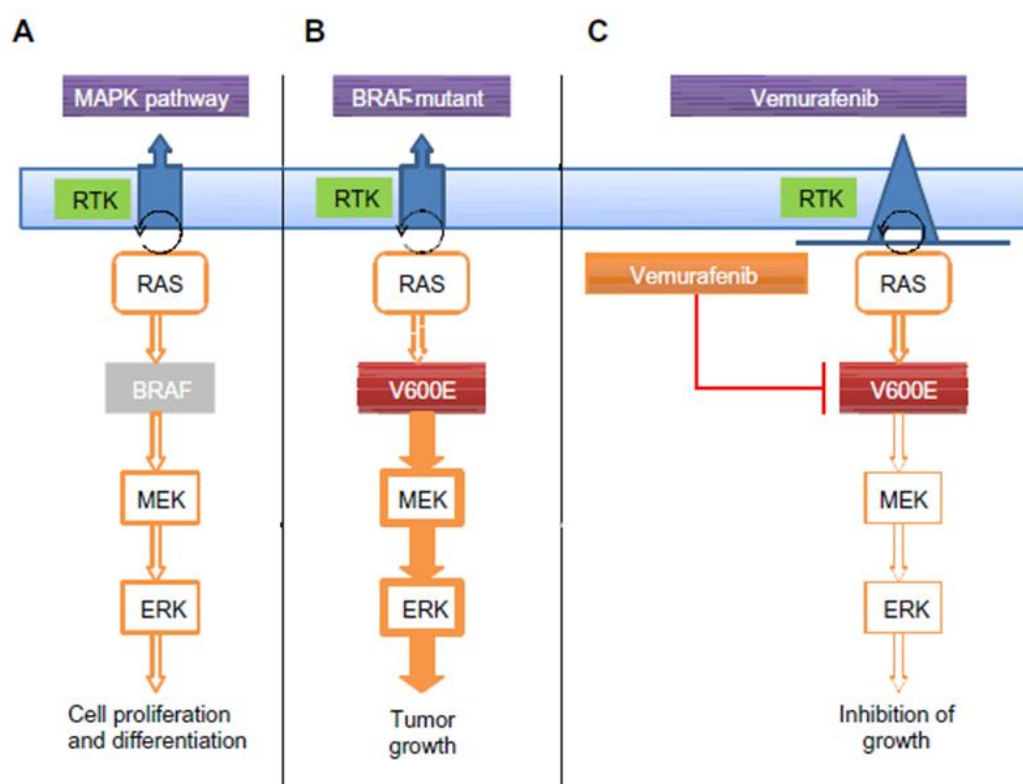
Tumor supresorski geni sodelujejo pri upočasnitvi celičnih delitev, popravilu napak v DNA in regulirajo apoptozo. Zmanjšano izražanje ali utišanje tumor supresorskega gena lahko vodi v nastanek rakavega obolenja. Največkrat je za izgubo delovanja kriva mutacija v delu gena, ki nosi zapis za strukturo proteina. Vzrok je lahko tudi hipermetilacija regulatorne regije. Izražanje tumor supresorskih genov je recesivno. Mutacije v tumor supresorskih genih so pogosto prisotne pri dednih oblikah rakavih obolenj. V tem primeru je mutacija enega alela podedovana, za nedelovanje drugega alela pa je večinoma kriva hipermetilacija regulatorne regije. Med tumor supresorske gene spadajo geni, ki nosijo zapis za od zaviralcev od ciklina odvisnih kinaz (CDK), regulatorni geni pri delitvi celic in DNA, geni, ki regulirajo apoptozo in geni, ki preprečujejo nekontrolirane delitve (Novaković in sod. 2009).

Povečano izražanje onkogenov in zmanjšano izražanje tumor supresorskih genov vodi do nenadzorovanih celičnih delitev in lahko povzroči spremembo melanocitov v melanomske celice (Polsky in Cordon-Cardo, 2003).

2.2.1 Gen *braf*

Povezava med mutacijo gena *braf* in malignostjo je bila prvič zabeležena leta 2002. Mutacije v genu *braf* najdemo pri različnih vrstah raka, kot so maligni melanom, metastatski rak debelega črevesa in danke, papilarni rak ščitnice, rak ledvic, hepatocelularni karcinom, nedrobnocelični pljučni karcinom in serozni rak jajčnikov. Ta mutacija je prisotna pri približno 50 % melanomov. Gen *braf* nosi zapis za serin/treonin kinazo iz družine RAF-kinaz, ki sodeluje pri z mitogenom aktivirani protein kinazni signalni poti MAPK (mitogen-activated protein kinases). Pri večini (90 %) *braf* mutacij gre za zamenjavo valina na mestu 600 najpogosteje z glutaminsko kislino (V600E: nukleotid 1799 T v A; kodon GTG v GAG). 5-6 % mutacij na mestu 600 predstavlja zamenjava valina z lizinom, mutacija V600K. Mutacijo V600D pa povzroči zamenjava valina z asparaginsko kislino in se pojavlja v manj kot 5 %. Mutacije na mestu V600E bistveno povečajo kinazno aktivnost BRAF in vodijo do neprestane aktivacije MAPK signalne poti, ki spodbuja nenadzorovano celično delitev (Ascierto in sod., 2012; Bucheita in Davies, 2014). Onkogeno mutacija gena *braf* povzroči hitrejše napredovanje raka in zmanjšano občutljivost na kemoterapijo pri različnih rakavih obolenjih (Tsai in sod., 2008).

Normalno pride do aktivacije MAPK signalne poti ob vezavi rastnega faktorja, citokina ali hormona na transmembranske receptorske tirozin-kinaze (RTK). Zunanji signal (vezava rastnega faktorja na RTK) povzroči aktivacijo proteina RAS na plazemski membrani s fosforilacijo vezanega GDP in s tem nastanek GTP. RAS z vezanim GTP-jem se veže na N-konec RAF in tako prekine njegovo avtoinhibicijo (v odsotnosti zunanjega signala so RAF-kinaze v neaktivni obliki, saj N-konec blokira katalitično domeno na C-koncu. Družino proteinov RAF sestavljajo serin/treonin-kinaze ARAF, BRAF in CRAF. RAF proteini ob aktivaciji tvorijo homo- ali heterodimere z A, B ali CRAF izooblikami. RAF proteini fosforilirajo in s tem aktivirajo MEK1 in MEK2, ki nato fosforilirata in aktivirata ERK1 in ERK2 (extracellular signal-regulated kinase). Tako se sproži aktivacija transkripcijskih faktorjev, ki regulirajo celične delitve, preživetje in diferenciacijo (Slika 1A). Aktivacija ERK je nadzorovana s kompleksnim omrežjem negativnih povratnih zank. Te delujejo tako, da ERK fosforilira komponente RTK-RAS-MAPK kaskade in z aktivacijo genov, ki zavirajo aktivnost MAPK signalne poti (Bucheit in Davies, 2014).



Slika 1: A) Potek MAPK signalne poti z nemutiranim BRAF. B) Potek MAPK signalne poti ob prisotnosti mutiranega BRAF (V600E). C) Inhibicija mutiranega BRAF (V600E) z vemurafenibom (Swaika in sod., 2014).

BRAF proteini z mutacijo V600E so aktivni v monomerni obliki, neodvisno od signala ob vezavi rastnega faktorja, citokina ali hormona. Celice z mutiranim BRAF imajo povečano ERK signaliziranje in posledično povečano aktivnost transkripcijskih faktorjev, ki jih aktivira ERK (Slika 1B). Povečano je tudi število komponent, ki sodelujejo v negativni povratni zanki. Te delujejo na več stopnjah in povzročijo znižano izražanje RAS v BRAF mutiranih celicah. Posledično so BRAF izomeri večinoma v obliki monomerov, ki za aktivacijo ne potrebujejo RAS z vezanim GTP-jem. Poleg tega postopno oslabi tudi ERK negativna povratna zanka. V600E mutacija sodeluje pri različnih mehanizmih, ki omogočajo napredovanje melanoma. Predvsem z aktivacijo MAPK signalne poti, izogibanjem staranju in apoptozi, nekontrolirano sposobnostjo delitve, angiogenezo (z od MEK-a odvisno aktivacijo HIF-1 α in VEGF), invazijo v tkiva, metastaziranjem in izogibanjem imunskemu sistemu (Spagnolo in sod., 2014).

2.3 NAČINI ZDRAVLJENJA MELANOMA

Za zdravljenje primarnih tumorjev in zasevkov v bezgavkah ali na koži se najpogosteje uporablja kirurška odstranitev. Priporoča se radikalna odstranitev tumorja s širokim varnostnim robom, ki je odvisen od debeline primarnega tumorja. Priporočen varnostni rob mora biti dosežen tako v širino kot tudi v globino. Za povečanje učinkovitosti se lahko ob kirurški odstranitvi uporabi tudi lokalno obsevanje (Simões in sod., 2015). Zdravljenje lokalnih metastaz poteka vedno kirurško. Opravi se lokalna limfadenektomija bezgavčnih lož na vratu, v dimljah ali pod pazduho. Tudi tokrat lahko zdravljenje dopolnimo z obsevanjem (Novaković in sod. 2009). Bolniki, ki imajo sistemsko razširjen melanom imajo zelo slabo prognozo pri kateri je petletno preživetje manjše od 5 %. Standardna kemoterapija doseže popolne odgovore pri manj kot 5 % bolnikov, delne odgovore pa pri 25 % bolnikov (Rudolf in sod., 2004). Sistemsko zdravljenje vključuje kemoterapijo, imunoterapijo ali kombinacijo obeh. Pri standardni kemoterapiji se najpogosteje uporablja citostatik dakarbazin v monoterapiji, pogosto pa se mu doda interferon- α . Ta spodbudi delovanje imunskega sistema in s tem pripomore k odstranitvi malignih celic, ki niso bile kirurško odstranjene. Najboljši možni izid za bolnika tako predstavlja multidisciplinarni pristop k zdravljenju. Nova odkritja o nastanku in napredovanju malignosti so omogočila razvoj novih, posameznemu bolniku prilagojenih zdravil. Med te spadajo tarčna zdravila (vemurafenib, dabrafenib) in imunomodulatorna zdravila (ipilimumab), ki so v kliničnih raziskavah pokazala boljše odgovore na zdravljenje in podaljšano preživetje bolnikov v primerjavi s standardno kemoterapijo (Ocvirk, 2013; Boc in sod., 2013).

2.3.1 Tarčna zdravila

Najhitrejši razvoj v zdravljenju raka v zadnjem času poteka na področju bioloških zdravil. Med biološka zdravila prištevamo imunoterapijo (vaccine in citokine) ter tarčna zdravila. Odkritje sprememb, ki povzročijo transformacijo zdrave celice v maligno, je prineslo nove možnosti zdravljenja. Maligne celice lahko zdravimo tako, da ciljamo tiste procese, ki so spremenjeni in tako značilni za maligno celico. Če lahko pri določeni vrsti tumorja vplivamo samo na te, zanj značilne spremembe, na molekularni ravni ciljamo pravo in za tumorsko rast odgovorno tarčo. Čeprav tarčno zdravljenje cilja maligne celice pa še vedno ni popolnoma specifično. Tarče, ki so cilj zdravila so večinoma izražene v malignih celicah, skoraj vse pa so v manjši meri izražene tudi v zdravih celicah. Posledično je pri takem zdravljenju manj stranskih učinkov ali pa so ti blažji v primerjavi s kemoterapijo (Snoj in Čufer, 2009).

Po mehanizmu delovanja ločimo monoklonska protitelesa in male molekule. Glede na tarčo na katero delujejo pa tarčna zdravila razdelimo na inhibitorje angiogeneze, zdravila, ki delujejo na zunajcelično komponento družine receptorjev EGFR, zdravila, ki delujejo na tirozin-kinazno komponento družine receptorjev EGFR in večtarčna zdravila, ki delujejo na več ravneh oziroma imajo svoje prijemališče na različnih korakih signalnih poti (Snoj in Čufer, 2009).

2.3.2 Male molekule

Te delujejo na signalne poti znotraj celice. So v obliki tablet, zato so bolnikom prijazne, vendar pa je s tem manj nadzorovana njihova resorpcija. Zdravila v obliki malih molekul delujejo kot zaviralci tirozinskih kinaz in tako ustavijo signalne poti v celici, ki spodbujajo nekontrolirane celične delitve (Snoj in Čufer, 2009).

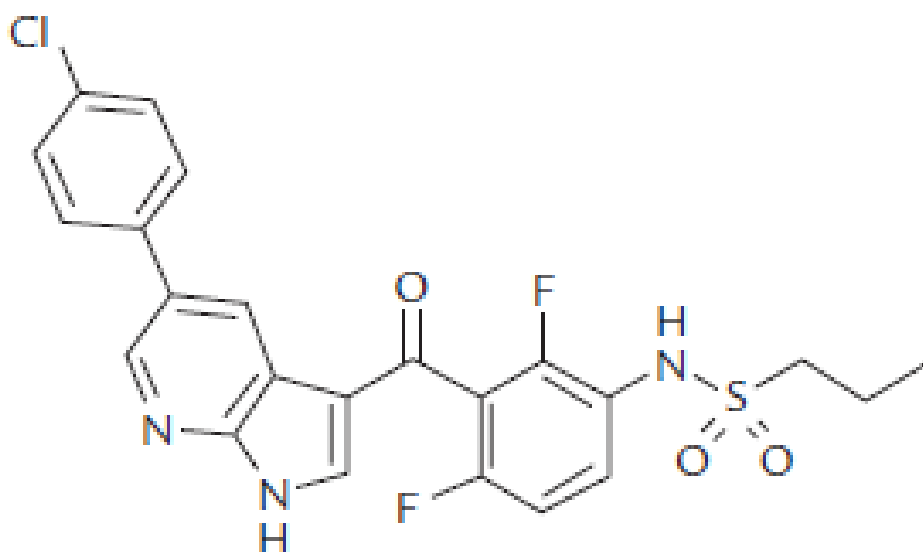
Identifikacija mutacije *braf* in potrditev njene prisotnosti pri približno 50 % melanomov je spodbudila razvoj malih molekularnih inhibitorjev, ki ciljajo mutirane BRAF proteine. Eden prvih je bil sorafenib, ki pa se je po kliničnih raziskavah izkazal za neustreznega, saj zavira tudi aktivnost drugih kinaz (VEGFR, PDGFR, Flt-3, c-Kit in FGFR-1) (Tsao in sod., 2012).

Veliko obetavnejši rezultati so bili pridobljeni pri kliničnih raziskavah z inhibitorji, ki specifično ciljajo mutirani BRAF (Johansson in Brage, 2014). BRAF inhibitorja vemurafenib in dabrafenib sta v primerjavi s kemoterapijo dosegla podaljšano celokupno preživetje pri bolnikih z melanomom in bila odobrena za zdravljenje (Spagnolo in sod., 2014).

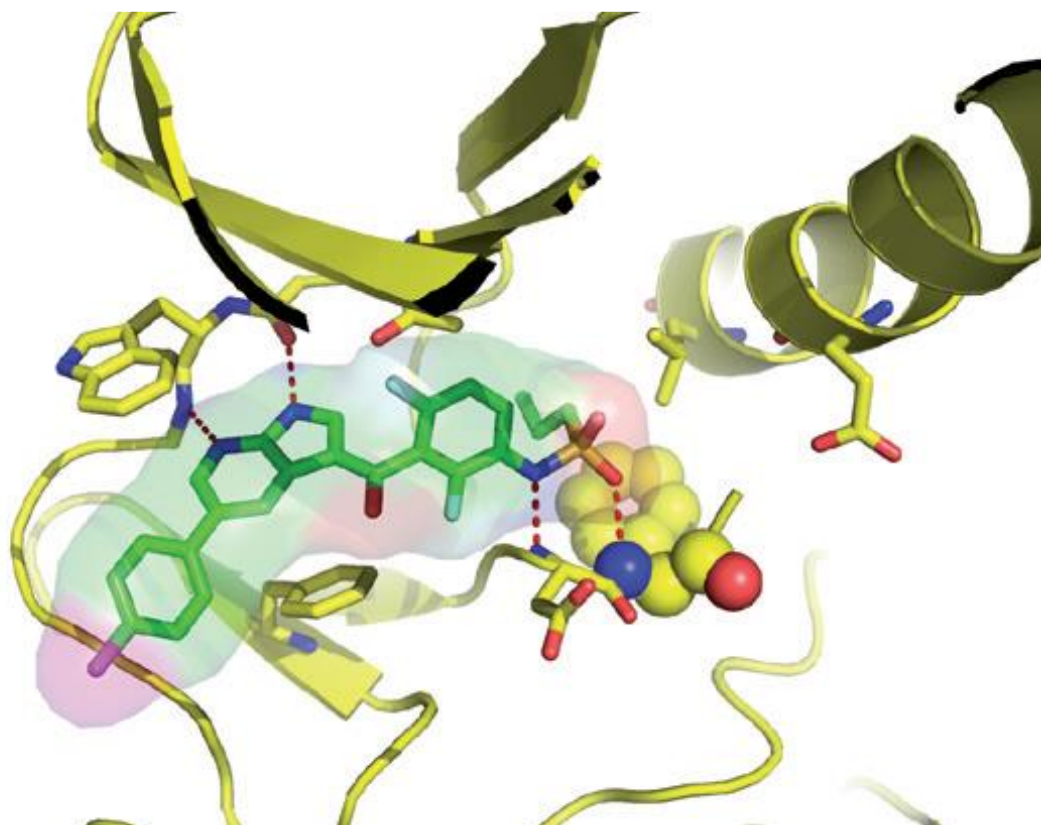
2.3.2.1 Vemurafenib

Vemurafenib je selektivni kinazni inhibitor, ki je na voljo v obliki tablet za oralno uporabo. Leta 2011 je bil skupaj s testom Cobas 4800 BRAF V600 s strani FDA odobren za uporabo pri zdravljenju melanoma s prisotno mutacijo V600E v genu *braf*. Klinične raziskave so pokazale, da ima zdravljenje z vemurafenibom trajni klinični odziv, ugoden varnostni profil in sprejemljivo stopnjo prenašanja (Ravnan in Matalka, 2012).

Vemurafenib ima unikatno molekulsko zgradbo, ki mu omogoča selektivno vezavo na mutirane BRAF proteine, ne pa tudi na ostale kinaze (Slika 3). Tako so citotoksični učinki, ki se kažejo kot zaustavitev celičnega cikla in apoptoza, vezani le na celice z *braf* mutacijo. Posledično pride do upočasnjene rasti in regresije tumorjev (Tsai in sod., 2008). Predklinične raziskave so pokazale učinkovitost vemurafeniba pri selektivnem zaviranju MAPK signalne poti z mutiranim BRAF in posledično regresijo ksenograftov na živalskih modelih. Vemurafenib se selektivno veže na ATP vezavno mesto mutiranega monomera BRAF in tako onemogoči njegovo aktivacijo (Bucheita in Davies, 2014).



Slika 2: Strukturna formula vemurafeniba (Ravnan in Matalka, 2012)



Slika 3: Shematski prikaz vezave vemurafeniba v aktivno mesto BRAF z mutacijo V600E (Bollag in sod., 2012)

V globalni, randomizirani, multicentrični klinični raziskavi faze III BRIM3 so primerjali učinkovitost zdravljenja z vemurafenibom v primerjavi s klasično kemoterapijo z dakarbazinom. V raziskavo je bilo vključenih 675 bolnikov s predhodno nezdravljenim V600E mutiranim napredujočim ali metastatskim melanomom. Po 6 mesecih opazovanja je bilo celokupno preživetje v skupini zdravljeni z vemurafenibom 84 %, v skupini zdravljeni s klasično kemoterapijo pa 64 %. Stopnja odgovora (dokazano zmanjšanje tumorja) je bila v skupini bolnikov, ki so prejeli vemurafenib 48 % oziroma skoraj 9 krat višja kot v skupini zdravljeni z dakarbazinom (Chapman in sod., 2011). Pogosti nezaželeni učinki povezani z vemurafenibom so bili bolečine v sklepih, izpuščaji, omotičnost, izpadanje las (alopecija), epidermalni tumor (keratoakantom) ali ploščatocelični karcinom, občutljivost na svetlobo, slabost in driska (Swaika in sod., 2014; Johansson in Brage, 2014).

Vemurafenib je primeren za zdravljenje bolnikov, ki jim tumorja ali metastaz kirurško ni mogoče odstraniti in imajo potrjeno *braf* mutacijo. Zaradi možnosti nekaterih resnih stranskih učinkov pa morajo biti bolniki, ki uživajo vemurafenib pod rednim zdravniškim nadzorom (Shelledy in Roman, 2015).

2.3.3 Bleomicin

Bleomicin je generično ime za skupino antibiotikov, ki jih proizvaja *Streptomyces verticillus* (Blum in sod., 1973). Gre za vodotopne glikopeptide, ki kažejo protitumorski in antibakterijski učinek. Bleomicin se veže na eno- ali dvovertično DNA, povzroči njeno denaturacijo in prelome enojnih in dvojnih verig. (Suzuki in sod., 1969). Za razgradnjo DNA bleomicin potrebuje kovinske ione (Fe^{2+} , Cu^{+}) in molekularni kisik. Bleomicin se na DNA veže večinoma na področjih malega žleba, ki so bogata z GC in GT baznimi pari. Domena, ki veže kovinski ion in kisik povzroči nastanek superoksidnih in hidroksilnih prostih radikalov, ki povzročijo prelome verig DNA. (Hecht, 2000).

Ocenjeno je, da lahko ena molekula bleomicina povzroči 8 do 10 prelomov DNA. Če je v celici nekaj tisoč molekul bleomicina se proces celične delitve zaustavi. Celica postane povečana, vidni sta dve veliki jedri. Celična smrt poteka počasi, lahko tudi več dni. Ko je v celici več milijonov molekul bleomicina ta odmre v nekaj minutah. To kaže na veliko citotoksično sposobnost bleomicina, ki pa ima zaradi svoje hidrofilnosti zelo omejeno sposobnost prehajanja skozi celično membrano. Z elektroporacijo lahko njegovo citotoksičnost povečamo za več tisočkrat (Gothelf in sod., 2003).

Stranski učinki bleomicina so pljučna fibroza in oslABLJENO delovanje pljuč, kožni izpuščaji, povišana telesna temperatura, slabost in bruhanje (Blum in sod., 1973).

2.3.4 Elektroporacija

Proces pri katerem celico ali tkivo izpostavimo kratkotrajnemu visokonapetostnemu električnemu pulzu, ki povzroči nastanek strukturnih sprememb v membrani, imenujemo elektroporacija. Strukturne spremembe oziroma pore, ki nastanejo pri elektroporaciji povečajo prepustnost celične membrane in omogočijo prehod ionom, majhnim molekulam, zdravilom in makromolekulam (protitelesa, encimi, nukleinske kisline, nekatera zdravila) za katere je celična membrana drugače neprehodna (Maček-Lebar in sod., 1989). Prepustnost membrane se nato postopno zniža na začetno stanje, celična membrana se ponovno organizira v prvotno strukturo (reverzibilna elektroporacija). Če celico izpostavimo previsokemu električnemu polju so nastale strukturne spremembe na membrani ireverzibilne in celica odmre (ireverzibilna elektroporacija) (Weaver, 1993).

Prednosti reverzibilne elektroporacije pred drugimi metodami vnosa so v tem, da jo lahko uporabimo na vsaki celici in povzroči le minimalne motnje membranskih funkcij. Te lastnosti omogočajo njeno široko uporabo na različnih področjih. V molekularni biologiji se uporablja za vnos genskega materiala v celico, omogoča elektrogensko zdravljenje, vnašanje beljakovin v membrano, dostavo antibiotikov v krvne celice, vnašanje zdravil

preko kože. Omogoča preučevanje delovanja encimov in celičnega signaliziranja. Elektroporacija se uporablja tudi pri vnosu zdravil, ki drugače ne prehajajo celične membrane (elektrokemoterapija) (Maček-Lebar in sod., 1989; Cadossi in sod., 2014)

2.3.5 Elektrokemoterapija

Po kirurški odstranitvi primarnega tumorja s časom 5-10 % bolnikov z melanomom razvije kožne ali podkožne metastaze. Te močno zmanjšajo bolnikovo kvaliteto življenja. Večinoma se jih zdravi s kirurško odstranitvijo, če ta ni mogoča pa je potrebno razmisliti o drugih možnostih zdravljenja. Na voljo je več lokalnih in lokalno regionalnih zdravljenj, med njimi so elektrokemoterapija, radiofrekvenčna ablacija in regionalna kemoterapija (Queirolo in sod., 2014).

Učinkovitost zdravila, ki deluje na znotrajcelične tarče je določena z njegovo sposobnostjo prehajanja celične membrane. Med zelo učinkovitimi citotoksičnimi kemoterapevtiki obstajajo nekateri, ki oteženo prehajajo celično membrano, zato potrebujemo visoko koncentracijo v bližini celice. Visoke koncentracije kemoterapevtika v telesu pa lahko povzročijo hude stranske učinke. Večinoma gre za hidrofilna zdravila, ki nimajo transportnih sistemov za prehod čez membrano (bleomicin, cisplatin). Ti so primerna za uporabo pri elektrokemoterapiji (Serša in sod., 2011).

Elektrokemoterapija je protitumorska terapija pri kateri administraciji kemoterapevtika sledi lokalna aplikacija električnih pulzov. Elektroporacija povzroči nastanek začasnih por v celični membrani in tako omogoči vstop kemoterapevtika v celico in povečanje njegove citotoksičnosti (Mali in sod., 2013). Trenutno se pri elektrokemoterapiji uporabljata le dva kemoterapevtika, bleomicin in cisplatin. Oba imata brez elektroporacije majhen in otežen prehod čez plazemsko membrano. Optimalna učinkovitost elektrokemoterapije je dosežena, ko so električni pulzi aplicirani v času najvišje zunajcelične koncentracije hidrofilnega kemoterapevtika v tumorju (Serša in sod., 2011).

Že prve klinične raziskave leta 1991 so pokazale visoko učinkovitost elektrokemoterapije. Ta je odvisna od zunajcelične koncentracije kemoterapevtika v času aplikacije električnih pulzov in od razporeditve električnega polja po tumorju. Vpliv na učinkovitost elektrokemoterapije imajo tudi parametri povezani z bolnikom, tumorjem in načinom zdravljenja. Sem spadajo tip tumorja, njegova velikost in lokacija, koncentracija in način administracije kemoterapevtika, tip elektrod ter protokol elektroporacije (Mali in sod., 2013).

V študiji ESOPE, ki je bila objavljena leta 2006, so bili določeni standardizirani postopki elektrokemoterapije. Med drugim izbira bleomicina ali cisplatina, njuna doza, način administracije (intravenozno ali intratumorsko), anestezija (lokalna ali sistemska), določen

je bil protokol električnih pulzov za različne tipe elektrod in frekvenca apliciranih pulzov (Marty in sod., 2006). Elektrokemoterapija pa ne vpliva samo na tumorske celice. Vključuje lahko tudi celice strome na primer endotelijske celice. Posledično lahko elektrokemoterapija s svojim citotoksičnim učinkom na endotelijske celice omogoči zmanjšan pretok krvi do tumorja. Električni pulzi povzročijo vazokonstrikcijo, ki še dodatno pripomore k zadržanju kemoterapevtikov v tumorju. Antigeni, ki se sproščajo z uničenih tumorskih celic spodbudijo imunski odziv, ki pripomore k odstranitvi preostalih tumorskih celic (Serša in sod., 2008)

2.3.6 Protokol zdravljenja ESOPE

Vbrizganje kemoterapevtika lahko poteka intravenozno ali intratumorsko. Po intravenoznem vbrizganju apliciramo električne pulze na tumor v 8–28 minutah, po intratumorskem vbrizganju kemoterapevtika pa takoj, oziroma v petih minutah. Za aplikacijo električnih pulzov uporabljamo generator električnih pulzov, ki ga je razvil evropski konzorcij. Generator električnih pulzov CLINIPORATOR™ je varen in zanesljiv ter registriran za delo v kliničnem okolju. Pri dovajanju električnih pulzov lahko uporabimo različne elektrode. Ploščate elektrode uporabimo za zdravljenje manjših tumorjev, igelne elektrode pa za zdravljenje večjih tumorjev, ki imajo v premeru 3 cm in pa ob več ponovitvah terapije. Bleomicin injiciramo intravensko v enkratnem odmerku 15.000 IU/m² ali intratumorsko 250–1000 IU/cm³ tumorja, cisplatin pa intratumorsko v odmerku 0,5–2 mg/cm³ tumorja. Apliciramo pravokotne električne pulze napetosti 1100 do 1300 V/cm, dolžine 100 μs in frekvence 1 Hz ali 5 kHz. Pri standardnem zdravljenju apliciramo 8 električnih pulzov (Mir in sod., 2006).

Elektrokemoterapija se zaradi visoke učinkovitosti, varnosti, omejene toksičnosti, enostavnosti, cenovne ugodnosti, možnosti ponovitev in neoadjuvantnega zdravljenja uporablja kot rutinsko zdravljenje kožnih in podkožnih tumorjev (Marty in sod., 2006). Učinkovita je pri zdravljenju tumorjev različne histološke sestave. Uporablja se tudi v primeru, da je tumor neodziven na konvencionalno zdravljenje ali kot citoreduktivno zdravljenje pred kirurško odstranitvijo (Serša in sod., 2011). Ricotti in sod. (2014) predlagajo uporabo elektrokemoterapije pri paliativnem zdravljenju, saj omogoča omilitev bolečin in zmanjša spontane krvavitve iz tumorja ter tako izboljša bolnikovo kvaliteto življenja. Elektrokemoterapija se lahko uporablja tudi za zdravljenje globoko ležečih tumorjev kot so možganski in kostni tumorji, tumorji v mišicah, požiralniku, danki, jetrni tumorji ali tumorji drugih notranjih organov (Serša in sod., 2011). Največje težave pri tem povzročajo določitev prevodnosti tkiva (nekrotične regije, krvne žile in mikro heterogenosti), določitev vrste elektroporacije (reverzibilna, ireverzibilna), določitev trajanja in števila pulzov in pozicije elektrod (Miklavčič in Davalos, 2014).

Pri aplikaciji po protokolu ESOPE omogoča elektrokemoterapija popolni lokalni odgovor pri 15–58 % bolnikov s površinskimi metastazami. Najpogostejši stranski učinki elektrokemoterapije so bolečina, lokalna rdečica, kožne razjede in trajna pigmentacija (Matthiessen in sod., 2011).

Od odobritve s strani FDA, leta 2011, je vedno več bolnikov, ki se zdravijo z vemurafenibom. Vemurafenib se uporablja za zdravljenje odraslih bolnikov z neresektabilnim ali metastatskim melanomom s potrjeno mutacijo *braf* V600E (Shelledy in Roman, 2015). Prav takšni bolniki imajo pogosto prisotne kožne ali podkožne metastaze, ki so primerne za zdravljenje z elektrokemoterapijo. Ti bolniki so kandidati za zdravljenje s kombinacijo vemurafeniba in elektrokemoterapije, in zato potrebujemo študije, s katerimi bi ugotovili medsebojno učinkovanje teh dveh terapij.

Valpione in sod. (2015) so s kombiniranim zdravljenjem z BRAF inhibitorjem in elektrokemoterapijo dosegli nadzor bolezni, ohranitev bolnikove aktivnosti in kvalitete življenja za 17 mesecev, kar je skoraj 3 krat dlje kot pri zdravljenju s samim BRAF inhibitorjem.

3 MATERIAL IN METODE

3.1 MATERIAL

3.1.1 Oprema

- Pipete različnih velikosti
- Pipetor
- Sterilni nastavki za pipete različnih velikosti
- 50 mL sterilne plastične centrifugirke
- 1,5 mL sterilne plastične mikrocentrifugirke
- Plošče z zmanjšano možnostjo pritrjevanja celic in 24 vdolbinicami (24-well ultra-low attachment plate, Corning Inc., Corning, ZDA)
- Čaša s 70 % etanolom
- Sterilne gaze
- Hemocitometer
- 6 cm petrijeveke
- Števec za štetje kolonij
- Elektroporator GT-01 in ploščate elektrode iz nerjavečega jekla z 2 mm razmikom (Fakulteta za elektrotehniko, Univerza v Ljubljani, Ljubljana, Slovenija)
- Centrifuga (Thermo, Heareus Multifuge 1S-R centrifuge)
- Svetlobni mikroskop
- Čitalec mikrotiterskih plošč (Infinite 200, Tecan, Männendorf, Švica)

3.1.2 Gojišče in dodatki

- AMEM gojišče - Advanced Minimum Essential Medium (Gibco, Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, ZDA)
- Advanced RPMI 1640 gojišče - Advanced RPMI (Roswell Park Memorial Institute) 1640 (Gibco)

3.1.3 Ostali reagenti in raztopine

- Bleomicin (Bleomycin medac, Medac, Wedel, Nemčija)
- Vemurafenib (MedChem Express, Monmouth Junction, NJ, ZDA)
- Fosfatni pufer (10 mg/ml - PBS; Phosphate Buffered Saline (Merck Millipore, Darmstadt, Nemčija)
- 0,25 % raztopine tripsina z dodatkom EDTA v Hankovem pufru (Gibco)

- Elektroporacijski pufer – 125 mmol/l saharoza, 10 nmol/l K_2HPO_4 , 2,5 mmol/l KH_2PO_4 , 2 mmol/l $MgCl_2 \cdot 6 H_2O$
- Barvilo kristal vijolično (Crystal Violet solution, Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, ZDA)
- L-glutamin (GlutaMAX, Gibco)
- Penicilin (Grünenthal, Aachen, Nemčija)
- Gentamicin (Krka, Novo mesto, Slovenija)
- 5 % fetalni goveji serum - FBS; Fetal Bovine Serum (Gibco)
- PrestoBlue™ Cell Viability Reagent (Invitrogen, Thermo Fisher Scientific)

3.1.4 Celični liniji

- SK-MEL 28 (American Type Culture Collection(ATCC), Manassas, VA, ZDA)
- CHL-1 (ATCC)

3.2 METODE

3.2.1 Gojenje celičnih linij

Pri delu smo uporabili dve humani melanomski celični liniji in sicer, SK-MEL 28 (Slika 5) in CHL-1 (Slika 4). SK-MEL 28 je celična linija izolirana iz primarnega tumorja malignega melanoma 51 letnega odraslega moškega. Izražen ima mutiran *braf* (V600E). Celična linija CHL-1 je izolirana iz primarnega humanega melanoma. Izražen ima divji tip gena *braf*.

Celično linijo SK-MEL 28 smo gojili v gojišču AMEM. Gojišču smo dodali fetalni goveji serum v končni koncentraciji 5 % (vol/vol), 10 mM L-glutamina, 100 U/ml penicilina in 50 μ g/ml gentamicina. Celično linijo CHL-1 smo gojili v gojišču Advanced RPMI 1640, ki smo mu dodali 5 % FBS, 10 mM L-glutamina, 100 U/ml penicilina in 50 μ g/ml gentamicina. Celice smo gojili v vlažni atmosferi s 5 % ogljikovega dioksida pri 37 °C. Vse delo s celičnimi linijami je potekalo v laminariju v sterilnih pogojih.

Za *in vitro* poskuse smo uporabili celice v eksponentni fazi rasti. Gojili smo jih v monosloju dokler niso dosegle vsaj 80 % konfluente. To smo preverili pod svetlobnim mikroskopom. Najprej smo odstranili gojišče, nato celice sprali s fosfatnim pufrom (PBS). Od podlage smo jih ločili z uporabo 0,25 % raztopine tripsina z dodatkom EDTA v Hankovem pufru. Po dodatku tripsina smo počakali nekaj minut, da so se celice odlepile. Pod svetlobnim mikroskopom smo pogledali ploščo. Odlepljene celice dobijo kroglasto

obliko. Ko so se vse celice sprostile s podlage, smo tripsin inaktivirali z dodatkom enake količine gojišča z dodanim FBS. Tako smo dobili suspenzijo celic za nadaljnje poskuse.

3.2.2 Določanje rastnih krivulj celičnih linij CHL-1 in SK-MEL 28 s testom Presto Blue

Test Presto Blue omogoča določanje metabolno aktivnih celic. Z njim kolorimetrično in fluorimetrično zaznavamo metabolno aktivnost celic na osnovi resazurina. Ta lahko prehaja preko celične membrane in se v encimatskih reakcijah v mitohodrijih, mikrosomih ali citosolu pretvarja v resorufin (Czekanska 2011). Po dodatku v celično suspenzijo se moder nefluorescenten resazurin pretvori v fluorecenten resorufin rdeče barve, ki ga lahko zaznamo. Prednost testa Presto Blue je, da omogoča nadaljnje gojenje celic in zaporedne meritve znotraj istega poskus, saj ne povzroči lize celic (O'Brien in sod. 2000).

Celice smo nasadili na ploščo z 96 vdolbinicami. Pred pipetiranjem smo celično suspenzijo dobro premešali. Nasadili smo 1000 celic/vdolbinico z volumnom 100 μ l. Nasadili smo 5 paralelk. Celice smo inkubirali v vlažni atmosferi pri 37 °C s 5 % ogljikovega dioksida. V zadnji dve vrstici smo odpipetirali gojišče, kar nam je služilo kot slepi vzorec. Rast celic smo določevali v petih časovnih intervalih. Prvič smo po treh urah v prvo paralelko odpipetirali reagent Presto Blue. V vsako vdolbinico smo ga dodali 10 μ l. Po 30 minutah inkubacije pri 37 °C in vlažni 5 % atmosferi ogljikovega dioksida smo izmerili intenziteto fluorescence pri ekscitacijski valovni dolžini 535 nm in pri emisijski valovni dolžini 595 nm s čitalcem mikrotiterskih plošč.

Meritve smo po istem postopku izvedli še po 24, 48, 72 in 96 urah. Za vsako paralelko smo odšteli vrednost fluorescence slepega vzorca in izračunali povprečno vrednost fluorescence. Nato smo s pomočjo prosto dostopnega spletnega programa Doubling Time (http://www.doubling-time.com/compute_more.php) iz meritev izračunali podvojitveni čas celičnih linij in izrisali rastni krivulji (Roth, 2016).

3.2.3 Protitumorske učinkovine

3.2.3.1 Bleomicin

Pri elektrokemoterapiji smo uporabili bleomicin v različnih koncentracijah. Iz začetne koncentracije 3 mg/ml smo ga z destilirano vodo ustrezno redčili, da smo dobili 7 testnih

koncentracij s končno koncentracijo pri celicah 1.4×10^{-12} M, 1.4×10^{-11} M, 1.4×10^{-10} M, 1.4×10^{-9} M, 1.4×10^{-8} M, 1.4×10^{-7} M, 1.4×10^{-6} M.

3.2.3.2 Vemurafenib

Vemurafenib smo imeli pripravljen v začetni raztopini DMSO v koncentraciji 10 mM. Testirali smo 4 različne koncentracije, in sicer 0,5 μ M, 2,5 μ M, 5 μ M in 10 μ M. Te smo dobili tako, da smo k suspenziji celic in gojišča (14 ml) dodali 0,7 μ l, 3,5 μ l, 7 μ l ali 14 μ l vemurafeniba. Končna količina DMSO v mediju ob celicah je bila 20000x – 1000x razredčena in ni bila toksična za celice.

3.2.4 Testiranje citotoksičnosti elektrokemoterapije z bleomicinom

Občutljivost celic na elektrokemoterapijo z bleomicinom smo preverili na obeh celičnih linijah, in sicer SK-MEL 28 in CHL-1.

3.2.4.1 Elektrokemoterapija

Celično suspenzijo smo najprej centrifugirali (1500 obr./min, 5 min pri sobni temperaturi). Nato smo odlili supernatant in previdno odpipetirali še preostanek gojišča. Celice smo resuspendirali v 5 ml hladnega (4 °C) elektroporacijskega pufra in ponovno centrifugirali (1500 obr./min, 5 min pri sobni temperaturi). Vmes smo pripravili stiroporno škatlo z zdrobljenim ledom. Po centrifugiranju smo ponovno odlili supernatant in odpipetirali še preostanek elektroporacijskega pufra. Celice smo resuspendirali v 150 μ l (za približno $5 \cdot 10^6$ celic) hladnega elektroporacijskega pufra. Od tega koraka naprej smo celice shranjevali na ledu.

Pripravili smo si mikrocentrifugirko z 990 μ l elektroporacijskega pufra in ji dodali 10 μ l suspenzije celic. Tako smo dobili 100 kratno redčitev celic za štetje s hemocitometrom. Za eno elektroporacijo moramo imeti 1×10^6 celic v 40 μ l. Za tem smo natančno izmerili volumen celične suspenzije in izračunali število prešteti celic (1).

$$x = \frac{\text{št.prešteti celic} \cdot \text{izmerjen volumen}}{1 \text{ ml}} \quad \dots(1)$$

Ko smo s hemocitometrom prešteli celice smo po zgornji formuli izračunali število celic v suspenziji. Število prešteti celic smo pomnožili s 40 μl in tako dobili končni volumen, ki ga potrebujemo za elektroporacijo. Od tega smo odšteli naš izmerjeni volumen celične suspenzije in tako dobili volumen elektroporacijskega pufra, ki smo ga dodali celični suspenziji.

Pripravili smo si 8 mikrocentrifugirk, jih ustrezno označili in v vsako odpipetirali 88 μl (25×10^6 celic/ml) celične suspenzije ter jih shranili na ledu. Nato smo vzeli prvo mikrocentrifugirko, ji dodali 22 μl ustrezno redčene raztopine bleomicina in vsebino s pipetiranjem dobro premešali. Od 110 μl mešanice smo 50 μl mešanice uporabili za skupine brez elektroporacije. Odpipetirali smo jih v vdolbinico ultra low attachment 24-well testne plošče, ki smo jo pred tem ustrezno označili. Drugih 50 μl mešanice smo odpipetirali med 2 sterilni jekleni ploščati elektrodi z 2 mm razmikom, ki smo ju pred tem sprali v 70 % etanolu in dobro obrisali s sterilno gazo. Že pred tem smo na elektroporatorju nastavili sledeče parametre:

- Napetost = 260 V (ustreza nastavitvam 1300 V/cm)
- Trajanje pulzov (T_i) = 100 μs
- Pavza (D_i) = 9999 (ustreza nastavitvam za frekvenco 1 Hz)
- Število pulzov (N_i) = 8
- Število ponovitev (N_s) = 8 (št. elektroporacij)

Mešanico smo elektroporirali z 8 pravokotnimi električnimi pulzi (razmerje amplituda – razdalja 1300 V/cm, trajanje 100 μs in frekvenca 1 Hz) in nato stresli v vdolbinico ultra low attachment 24-well testne plošče. Elektrodi smo za tem ponovno sprali v 70 % etanolu in ju dobro obrisali s sterilno gazo. Celice smo inkubirali 5 min po elektroporaciji na sobni temperaturi. Nato smo dodali 1 ml gojišča v vdolbinico ultra low attachment 24-well testne plošče tako k elektroporiranim kot tudi k ne-elektroporiranim celicam. Postopek smo ponovili 8 krat, za vse testne koncentracije bleomicina in kontrolo pri kateri smo namesto bleomicina dodali 22 μl destilirane vode.

3.2.4.2 Test klonogenosti

S testom klonogenosti se določa delitvena sposobnost celic. Postopek je bil prvič opisan leta 1956. Uporablja se kot *in vitro* test za določanje preživetja celic, ki so ohranile reproduktivno sposobnost. Ta se ocenjuje na podlagi sposobnosti posamezne celice, da z delitvami zraste v kolonijo. Kolonija je opredeljena kot skupek vsaj 50 celic (Franken in sod., 2006). S testom torej preverimo sposobnost neomejenih delitev pri vsaki preučevani celici. Test klonogenosti omogoča oceno razlik v sposobnosti delitve med kontrolnimi celicami in celicami, ki so bile izpostavljene ionizirajočemu sevanju, citotoksičnim snovem

ali genskim manipulacijam. Število celic, ki so ohranile reprodukcijsko sposobnost se prikaže s krivuljo preživetja (Rafehi in sod., 2011).

S testom klonogenosti smo spremljali preživetje celic, ki so ohranile reprodukcijsko sposobnost. Pripravili smo 16 50 ml centrifugirk in jih ustrezno označili. V vsako smo odpipetirali 14 ml gojišča z dodanim FBS. Mešanico v vdolbinici ultra low attachment 24-well testne plošče smo s pipetiranjem dobro premešali. Nato smo v mikrocentrifugirko s 14 ml gojišča odpipetirali ustrezno količino celic, da smo dobili zeleno končno število celic na 6 cm petrijevi plošči (Preglednica 1). Že pred tem smo pripravili in ustrezno označili 48 6 cm petrijevih plošč. Pripravili smo si 3 petrijevke na skupino. Vsebinsko centrifugirke smo dobro premešali in v vsako od 3 petrijevk napipetirali 4 ml mešanice iz centrifugirke. Petrijevke smo inkubirali pri 37 °C, v vlažni atmosferi s 5 % ogljikovega dioksida. Po približno 8 (CHL-1) ali 12 (SK-MEL 28) dneh so iz reproductivno sposobnih celic zrastle dovolj velike kolonije.

Preglednica 1: Število nasajenih celic celičnih linij SK-MEL 28 in CHL-1 pri različnih koncentracijah bleomicina brez (BLM) in ob elektrokemotrapiji (EP + BLM).

| Skupina | Število nasajenih celic | |
|------------------------------------|-------------------------|-------|
| | SK-MEL-28 | CHL-1 |
| Kontrola (dH ₂ O) | 400 | 200 |
| BLM 1,4 x 10 ⁻¹² M | 600 | 300 |
| BLM 1,4 x 10 ⁻¹¹ M | 800 | 400 |
| BLM 1,4 x 10 ⁻¹⁰ M | 1000 | 500 |
| BLM 1,4 x 10 ⁻⁹ M | 1200 | 600 |
| BLM 1,4 x 10 ⁻⁸ M | 1400 | 700 |
| BLM 1,4 x 10 ⁻⁷ M | 1600 | 800 |
| BLM 1,4 x 10 ⁻⁶ M | 1800 | 900 |
| Kontrola EP (dH ₂ O) | 800 | 400 |
| EP + BLM 1,4 x 10 ⁻¹² M | 1200 | 600 |
| EP + BLM 1,4 x 10 ⁻¹¹ M | 1600 | 800 |
| EP + BLM 1,4 x 10 ⁻¹⁰ M | 2000 | 1000 |
| EP + BLM 1,4 x 10 ⁻⁹ M | 2400 | 1200 |
| EP + BLM 1,4 x 10 ⁻⁸ M | 2800 | 1400 |
| EP + BLM 1,4 x 10 ⁻⁷ M | 3200 | 1600 |
| EP + BLM 1,4 x 10 ⁻⁶ M | 4000 | 2000 |

3.2.4.3 Barvanje z barvilom kristal vijolično

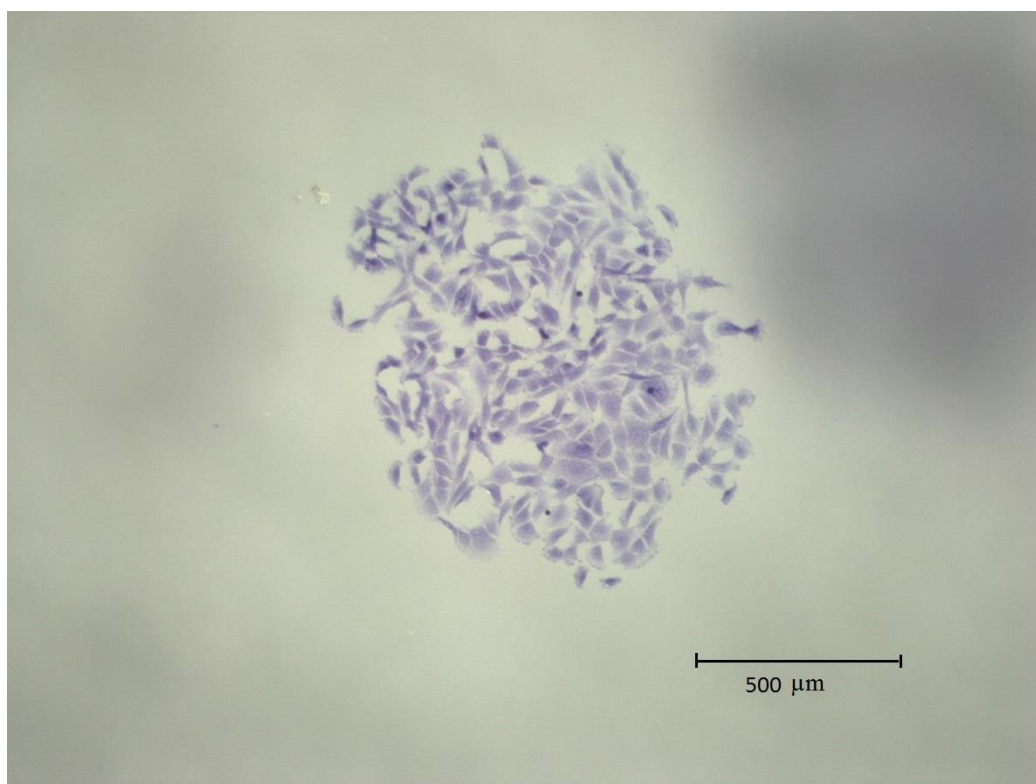
Kolonije smo pobarvali in fiksirali z barvilom kristal vijolično raztopljenim v etanolu. Iz petrijevke smo najprej odlili gojišče. Nato smo v petrijevko nalili 2 ml barvila, počakali 3-5 min in barvilo odlili. Petrijevko smo sprali pod rahlim curkom vode in počakali, da se je posušila.

3.2.4.4 Štetje kolonij

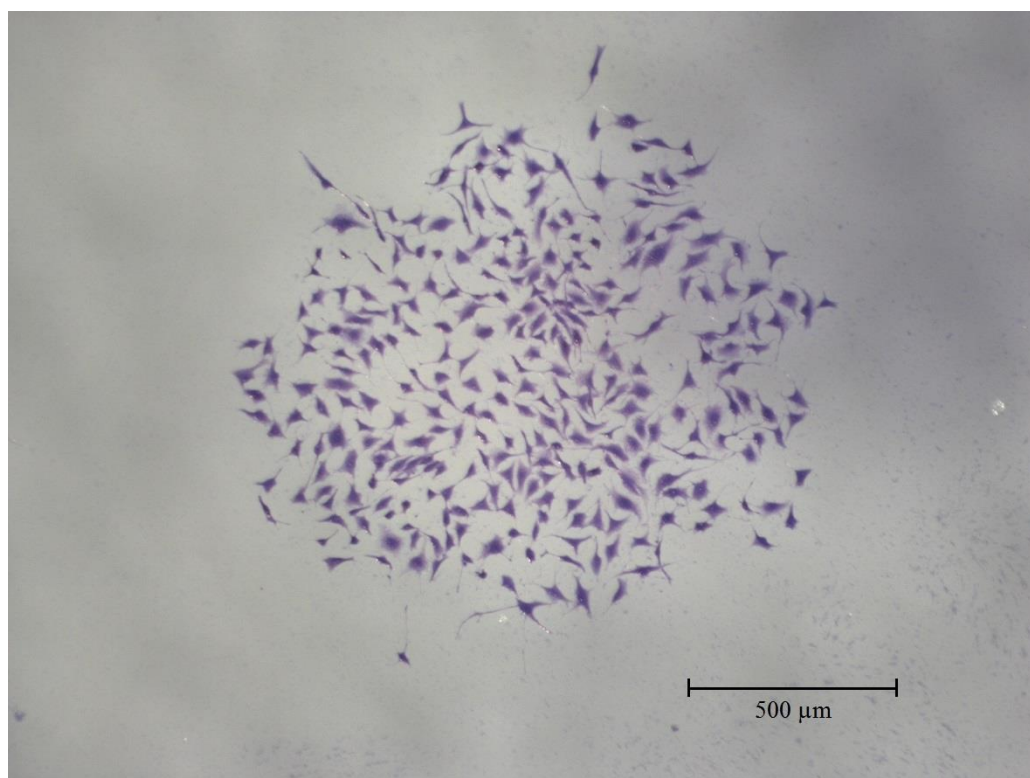
Pri štetju kolonij smo upoštevali le tiste, ki so imele več kot 50 celic na kolonijo. Iz razmerja med številom zraslih kolonij in številom nasajenih celic smo za vsako skupino določili uspešnost nasaditve celic (plating efficiency; PE, 2), delež preživelih celic (surviving fraction; SF, 3) pa iz razmerja med uspešnostjo nasaditve poskusne skupine in kontrolne skupine. Izračunali smo tudi IC₉₀ – koncentracija bleomicina, ki zmanjša preživetje celic za 90 %. Tega smo izračunali tako, da smo vzeli za vsak poskus posebej 2 vrednosti, med katerima je bilo vmes vrednost 0,1 (kar pomeni, da je 10 % preživelih celic), med njima smo narisali enačbo premice in iz nje izračunali kolikšna je ta koncentracija. Izračunali smo tudi faktor izboljšave (enhancement factor; EF), ki pove za kolikokrat so celice bolj občutljive na to terapijo. Izračunali smo ga z deljenjem vrednosti IC₉₀.

$$PE [\%] = \frac{\text{število zraslih kolonij}}{\text{število nasajenih celic}} \times 100 \quad \dots(2)$$

$$SF = \frac{PE \text{ poskusna skupina}}{PE \text{ kontrolna skupina}} \quad \dots(3)$$



Slika 4: Fotografija kolonije celic celične linije CHL-1.



Slika 5: Fotografija kolonije celic celične linije SK-MEL 28.

3.2.5 Testiranje citotoksičnosti različnih koncentracij vemurafeniba

Testirali smo štiri različne koncentracije vemurafeniba, in sicer 0,5, 2,5, 5 in 10 μM . Za vsako koncentracijo smo naredili tri paralelke. Pripravili smo si 15 6 cm petrijevih plošč in jih ustrezno označili. Pri testiranju celične linije CHL-1 smo na vsako ploščo nasadili 300 celic in dodali testne koncentracije vemurafeniba, saj nismo pričakovali citotoksičnosti vemurafeniba, ker celična linija nima prisotne *braf* mutacije. Te smo dobili tako, da smo k suspenziji celic in gojišča (14 ml) dodali 0,7, 3,5, 7 ali 14 μl vemurafeniba. Po približno osmih dneh smo celice pobarvali, fiksirali in prešteli zrasle kolonije.

Pri testiranju celične linije SK-MEL 28 smo na kontrolne plošče nasadili 300, na plošče z 0,5 in 2,5 μM vemurafeniba 400 in na plošče z 5 in 10 μM vemurafeniba 500 celic, saj smo pričakovali citotoksični vpliv vemurafeniba. Po približno dvanajstih dneh smo celice pobarvali, fiksirali in prešteli kolonije.

3.2.6 Testiranje kombiniranega tretiranja celic z vemurafenibom in elektrokemoterapijo z bleomicinom

Celična linija CHL-1 ima divji tip gena *braf*, zato smo poskuse učinka izpostavitve celic vemurafenibu in elektrokemoterapiji z bleomicinom opravil le na celični liniji SK-MEL 28, ki ima izražen mutiran *braf* gen.

Elektrokemoterapijo z bleomicinom smo opravili po postopku opisanem v poglavju 3.2.4.1. V centrifugirke s 14 ml gojišča smo napipetirali testno število celic (Preglednica 2). Nato smo v vsako centrifugirko dodali še 0,7 μl (0,5 μM) vemurafeniba. Tudi tokrat smo delali v treh paralelkah. Vsebinsko centrifugirke smo dobro premešali in na vsako od treh petrijevih plošč napipetirali 4 ml iz centrifugirke. Celice smo inkubirali v vlažni atmosferi pri 37 °C s 5 % ogljikovega dioksida. Po približno dvanajstih dneh smo celice pobarvali, fiksirali in prešteli kolonije.

Preglednica 2: Število nasajenih celic celične linije SK-MEL 28 pri različnih koncentracijah bleomicina brez (BLM + VMF) in ob elektrokemoterapiji (EP + BLM + VMF) in tretiranju z vemurafenibom.

| Skupina | Število nasajenih celic |
|---|-------------------------|
| Kontrola (dH ₂ O) + 0,5 μM VMF | 400 |
| BLM 1,4 x 10 ⁻¹² M + 0,5 μM VMF | 600 |
| BLM 1,4 x 10 ⁻¹¹ M + 0,5 μM VMF | 800 |
| BLM 1,4 x 10 ⁻¹⁰ M + 0,5 μM VMF | 1000 |
| BLM 1,4 x 10 ⁻⁹ M + 0,5 μM VMF | 1200 |
| BLM 1,4 x 10 ⁻⁸ M + 0,5 μM VMF | 1400 |
| BLM 1,4 x 10 ⁻⁷ M + 0,5 μM VMF | 1600 |
| BLM 1,4 x 10 ⁻⁶ M + 0,5 μM VMF | 1800 |
| Kontrola EP (dH ₂ O) + 0,5 VMF | |
| EP + BLM 1,4 x 10 ⁻¹² M + 0,5 μM VMF | 1200 |
| EP + BLM 1,4 x 10 ⁻¹¹ M + 0,5 μM VMF | 1600 |
| EP + BLM 1,4 x 10 ⁻¹⁰ M + 0,5 μM VMF | 2000 |
| EP + BLM 1,4 x 10 ⁻⁹ M + 0,5 μM VMF | 2400 |
| EP + BLM 1,4 x 10 ⁻⁸ M + 0,5 μM VMF | 2800 |
| EP + BLM 1,4 x 10 ⁻⁷ M + 0,5 μM VMF | 3200 |
| EP + BLM 1,4 x 10 ⁻⁶ M + 0,5 μM VMF | 4000 |

3.2.7 Računanje vrednosti IC₉₀

Vrednost IC₉₀ smo izračunali tako, da smo vzeli pri vsakem poskusu eno vrednost, ki je bila nižja od 0,1 in eno, ki je bila višja od 0,1. Skoz izbrani točki smo v programu Microsoft Excel narisali enačbo premice. Potem smo izračunali vrednost x pri vrednosti y 0,1 in tako dobili vrednost IC₉₀. Za vsak poskus smo iz ponovitev izračunali povprečno vrednost IC₉₀.

3.2.8 Določanje interakcije med bleomicinom in vemurafenibom

Interakcijo med bleomicinom in vemurafenibom (5) smo izračunali na podlagi vrednosti IC₉₀ (4) po metodi, ki so jo razvili Spector in sod. (1982).

Uporabili smo povprečne vrednosti IC₉₀.

$$Q = \ln(\bar{x}_1) + \ln(\bar{x}_2) + \ln(\bar{x}_{1+2}) + \ln(\bar{x}_{control}) \quad \dots(4)$$

\bar{x}_1 – povprečna vrednost IC₉₀ pri elektrokemoterapiji z bleomicinom

\bar{x}_2 – povprečna vrednost IC₉₀ pri izpostavitvi celic bleomicinu in vemurafenibu

\bar{x}_{1+2} – povprečna vrednost IC₉₀ pri elektrokemoterapiji z bleomicinom in tretiranju z vemurafenibom

$\bar{x}_{control}$ – povprečna vrednost IC₉₀ ob izpostavitvi celic bleomicinu

$$SE = \sqrt{\frac{\left(\frac{\sigma_1}{\bar{x}_1}\right)^2 + \left(\frac{\sigma_2}{\bar{x}_2}\right)^2 + \left(\frac{\sigma_{1+2}}{\bar{x}_{1+2}}\right)^2 + \left(\frac{\sigma_{control}}{\bar{x}_{control}}\right)^2}{n_1 + n_2 + n_{1+2} + n_{control}}} \quad \dots(5)$$

σ_1 – standardni odklon pri elektrokemoterapiji z bleomicinom

σ_2 – standardni odklon pri izpostavitvi celic bleomicinu in vemurafenibu

σ_{1+2} – standardni odklon pri elektrokemoterapiji z bleomicinom in tretiranju z vemurafenibom

$\sigma_{control}$ – standardni odklon ob izpostavitvi celic bleomicinu

n – število ponovitev

$Q < -2SE$ – učinek je antagonističen

$-2SE < Q < 2SE$ – učinek je aditiven

$Q > 2SE$ – učinek je sinergističen

3.2.9 Statistična analiza

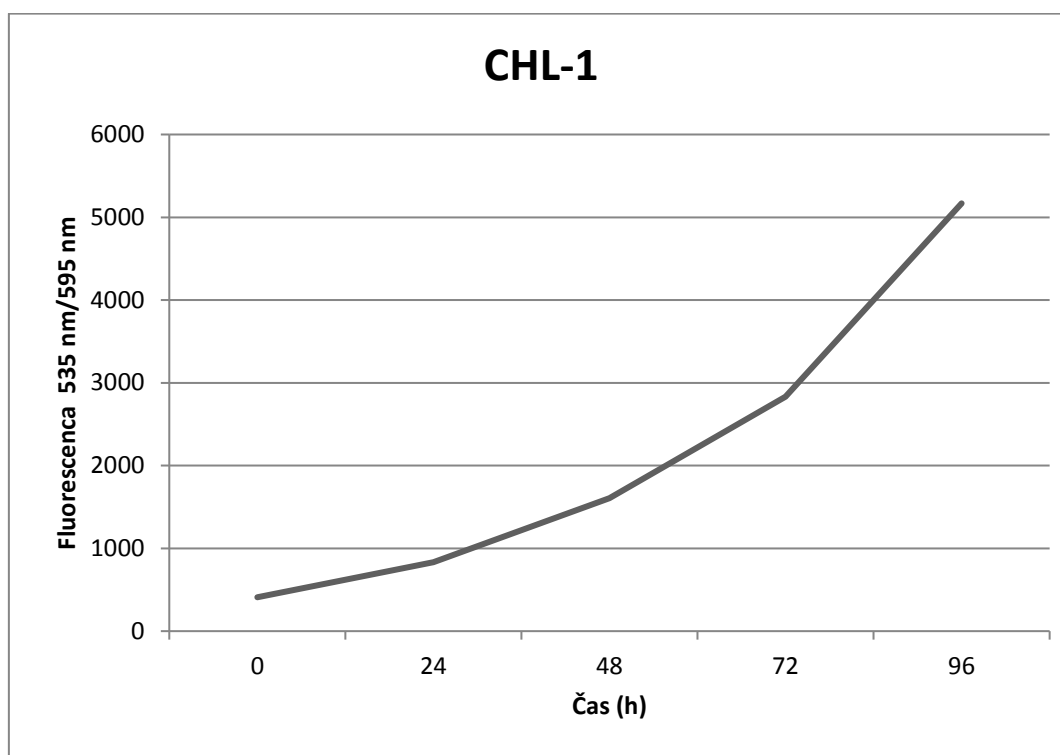
Za analizo in grafični prikaz smo uporabili SigmaPlot programsko opremo (različica 12.0, Systat Software, London, Velika Britanija). Za analizo statistično značilnih razlik med poskusi, smo uporabili Studentov t-test (za primerjavo 2 skupin) ali enosmerno analizo variance ANOVA (primerjava več skupin). Vrednosti $p < 0,05$ smo obravnavali kot za

statistično značilne. Interakcijo med bleomicinom in vemurafenibom smo izračunali na podlagi vrednosti IC_{90} po metodi, ki so jo razvili Spector in sod. (1982).

4 REZULTATI

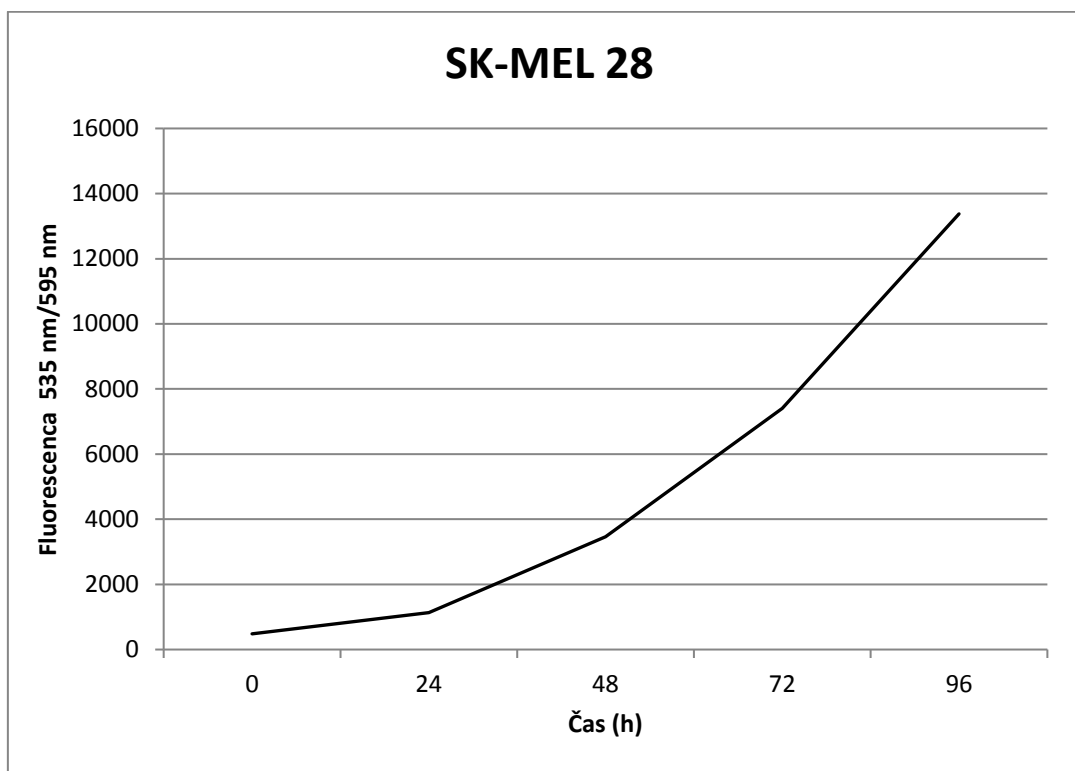
4.1 DOLOČANJE RASTNIH KRIVULJ CELIČNIH LINIJ CHL-1 IN SK-MEL 28

Rastni krivulji celičnih linij smo določili s testom Presto Blue. Izmerjeno fluorescenco pri eksitacijski valovni dolžini 535 nm in pri emisijski valovni dolžini 595 nm smo prikazali v odvisnosti od časa. Izmerjena fluorescenca je premosorazmerna številu metabolno aktivnih celic. Število metabolno aktivnih celic je s časom naraščalo.



Slika 6: Rastna krivulja celične linije CHL-1. Prikazana je povprečna vrednost fluorescence.

S testom Presto Blue smo določili, da je podvojitveni čas celične linije CHL-1 27,19 h (Slika 6).

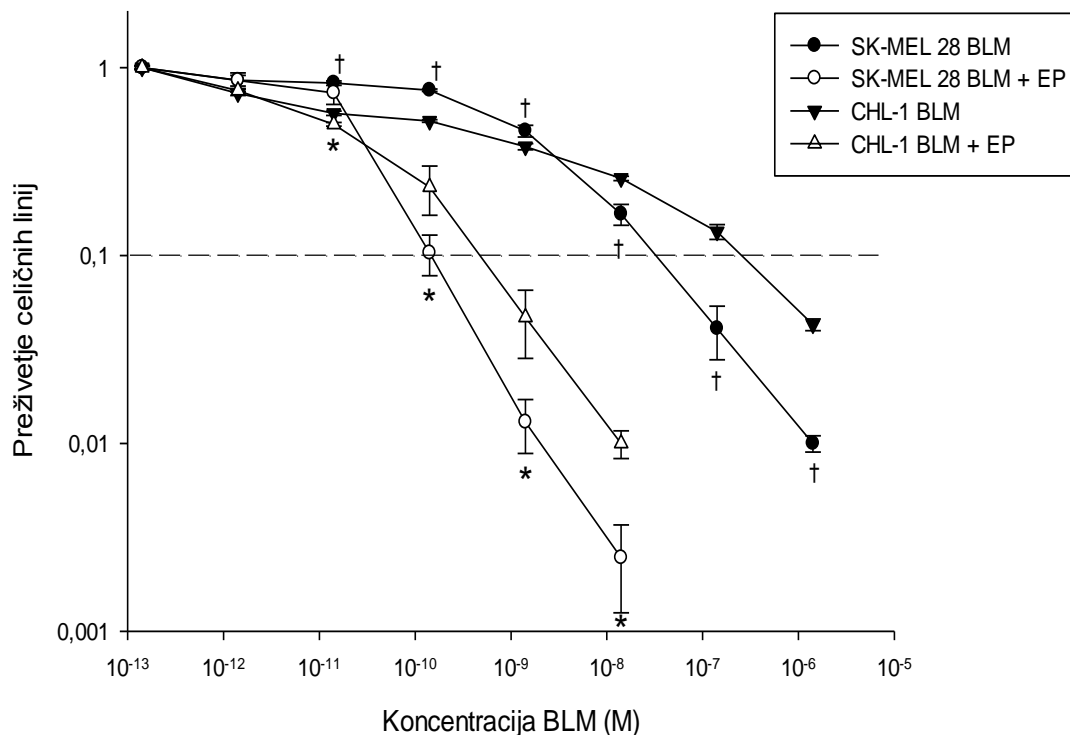


Slika 7: Rastna krivulja celične linije SK-MEL 28. Prikazana je povprečna vrednost fluorescence.

S testom Presto Blue smo določili, da je podvojitveni čas celične linije SK-MEL 28 25,19 h (Slika 7). Čas je primerljiv z podvojitvenim časom 24 h, ki ga za celično linijo SK-MEL 28 navajajo Larrosa in sod. (2004).

4.2 TESTIRANJE CITOTOKSIČNOSTI ELEKTROKEMOTERAPIJE Z BLEOMICINOM

Citotoksičnost elektrokemoterapije z bleomicinom smo določali s testom klonogenosti. Testirali smo 7 različnih koncentracij bleomicina, in sicer 1.4×10^{-12} M, 1.4×10^{-11} M, 1.4×10^{-10} M, 1.4×10^{-9} M, 1.4×10^{-8} M, 1.4×10^{-7} M in 1.4×10^{-6} M. Preizkušali smo občutljivost dveh celičnih linij, CHL-1 in SK-MEL 28.



Slika 8: Primerjava citotoksičnosti samega bleomicina (BLM) in bleomicina v kombinaciji z elektrokemoterapijo (EP) na celični liniji SK-MEL 28, ki ima izražen mutiran gen *braf* (V600E) in celični liniji CHL-1, ki ima izražen divji tip gena *braf*. Rezultati so podani kot delež preživetja celic glede na kontrolno skupino (povprečje treh neodvisnih poskusov ± standardna napaka). *, † prikazujeta statistično značilno razliko glede na kontrolo za vsako celično linijo posebej (Studentov t-test, $p < 0,05$). Prekinjena črta označuje vrednost IC_{90} .

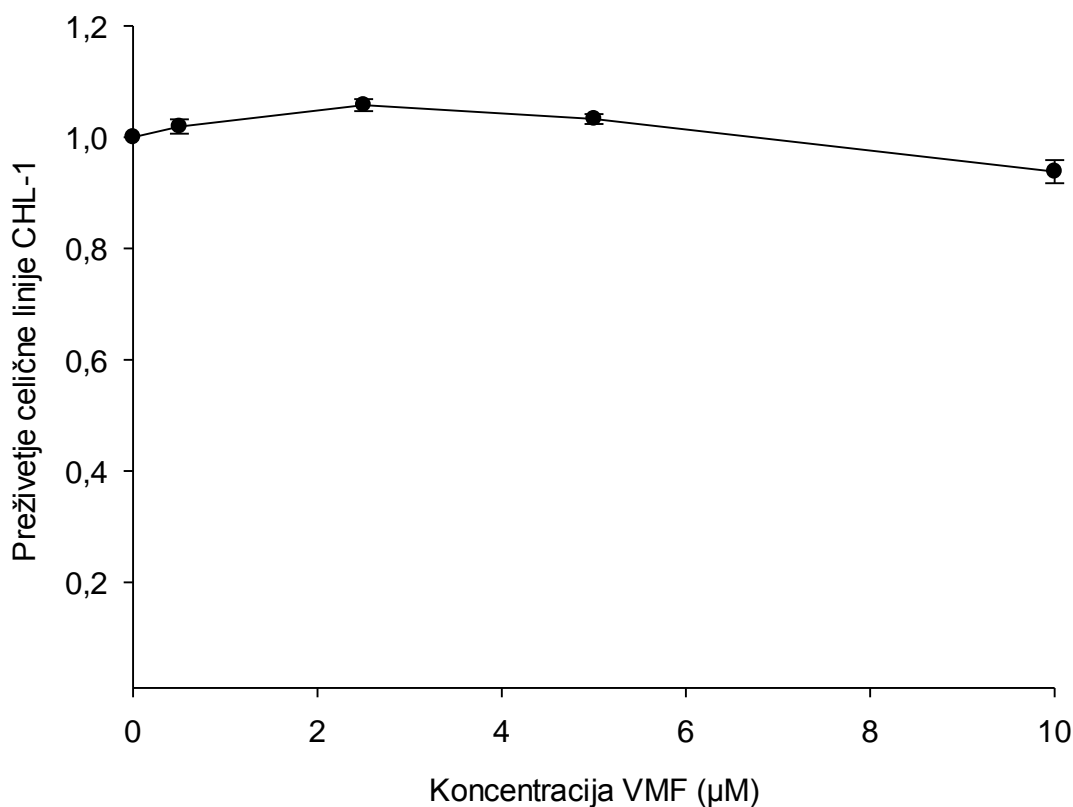
Rezultati so pokazali, da elektrokemoterapija znatno poveča citotoksični učinek bleomicina na celični liniji CHL-1. Ta se po predvidevanjih veča z večanjem dodane koncentracije bleomicina. Pri nižjih koncentracijah bleomicina ni opaznih razlik med citotoksičnostjo samega bleomicina in elektrokemoterapije z bleomicinom. Tudi pri celični liniji SK-MEL 28 je opazna večja citotoksičnost elektrokemoterapije z bleomicinom v primerjavi z izpostavitvijo celic samo bleomicinu. Preživetje celic ob večanju koncentracije bleomicina naglo upada.

Iz primerjave preživetja celične linije z divjim tipom gena *braf* (CHL-1) in celične linije z mutacijo V600E v genu *braf* (SK-MEL 28) vidimo, da so celice z mutacijo V600E bolj občutljive tako na izpostavljenost bleomicinu kot tudi na elektrokemoterapijo z bleomicinom. Izračunana vrednost IC_{90} za celično linijo CHL-1 je bila 7.7×10^{-10} M za

celično linijo SK-MEL 28 pa 3.8×10^{-10} M. Iz tega je razvidno, da je celična linija SK-MEL 28 z mutacijo V600E bolj občutljiva na elektrokemoterapijo z bleomicinom, saj za uničenje 90 % celic potrebuje 2 krat nižjo koncentracijo bleomicina (Slika 8).

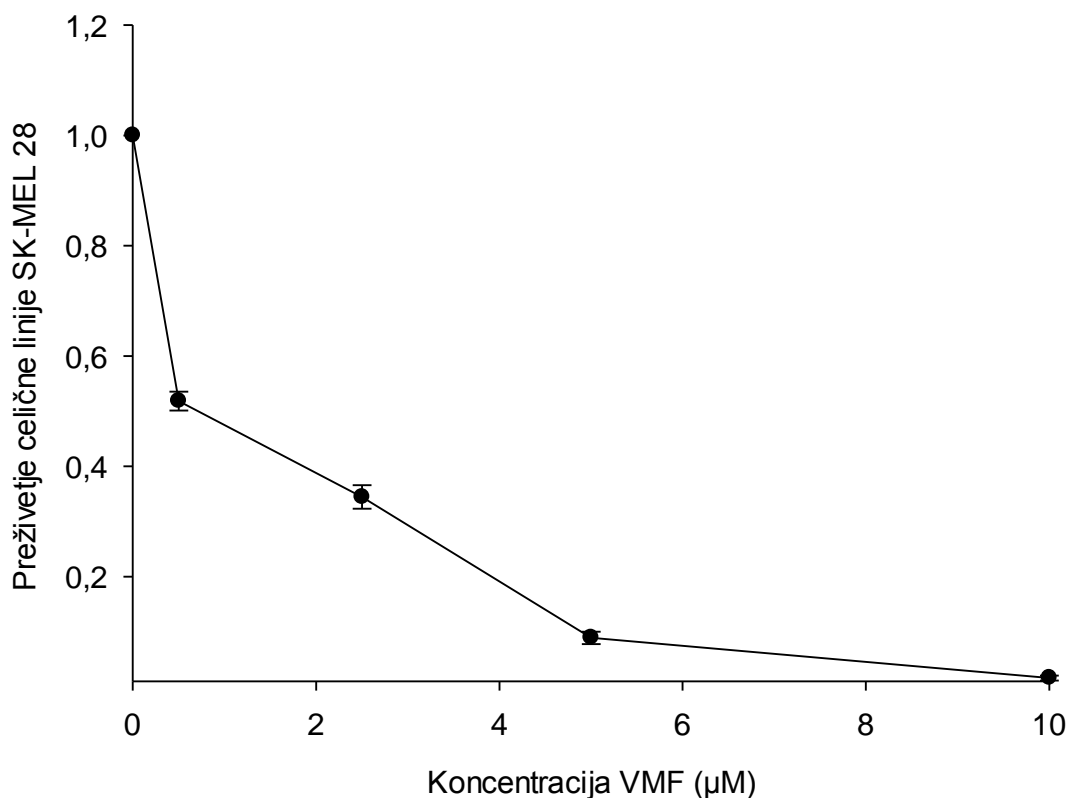
4.3 TESTIRANJE CITOTOKSIČNOSTI RAZLIČNIH KONCENTRACIJ VEMURAFENIBA

S testom klonogenosti smo preverili občutljivost celičnih linij CHL-1 in SK-MEL 28 na 4 različne koncentracije vemurafeniba, in sicer 0,5 μ M, 2,5 μ M, 5 μ M in 10 μ M.



Slika 9: Prikaz citotoksičnosti različnih koncentracij vemurafeniba (VMF) na celično linijo CHL-1 ki ima divji tip gena *braf*.

Iz rezultatov vidimo, da izpostavitve z BRAF inhibitorju vemurafenibu ni zmanjšala preživetja celične linije SK-MEL-1, ki ima izražen divji tip gena *braf*. Preživetje je bilo tudi pri najvišji koncentraciji vemurafeniba (10 μM) večje od 94 % (Slika 9).

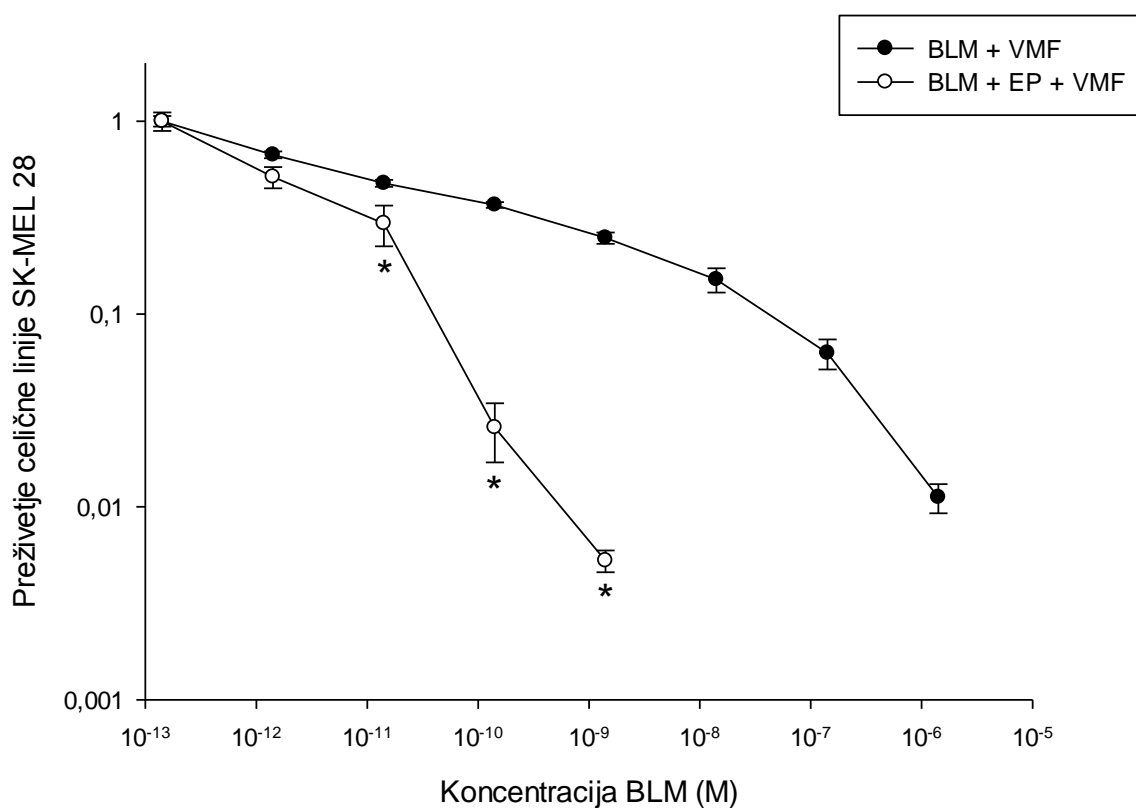


Slika 10: Prikaz citotoksičnosti različnih koncentracij vemurafeniba (VMF) na celično linijo SK-MEL 28, ki ima mutacijo V600E v genu *braf*.

Na celični liniji SK-MEL 28 je opazen velik citotoksični učinek BRAF inhibitorja vemurafeniba. Celično preživetje naglo pada z višanjem koncentracije. Za uničenje 90 % celic je potrebna koncentracija 5 μM . Iz rezultatov je razvidno selektivno delovanje vemurafeniba na celice z mutacijo V600E v genu *braf*. Koncentracija 0,5 μM je zmanjšala preživetje celic za 50 % zato smo jo uporabili za nadaljnje tretiranje celic s kombinacijo elektrokemoterapije z bleomicinom in vemurafeniba (Slika 10).

4.4 TESTIRANJE KOMBINIRANEGA TRETIRANJA CELIC Z VEMURAFENIBOM IN ELEKTROKEMOTERAPIJO Z BLEOMICINOM

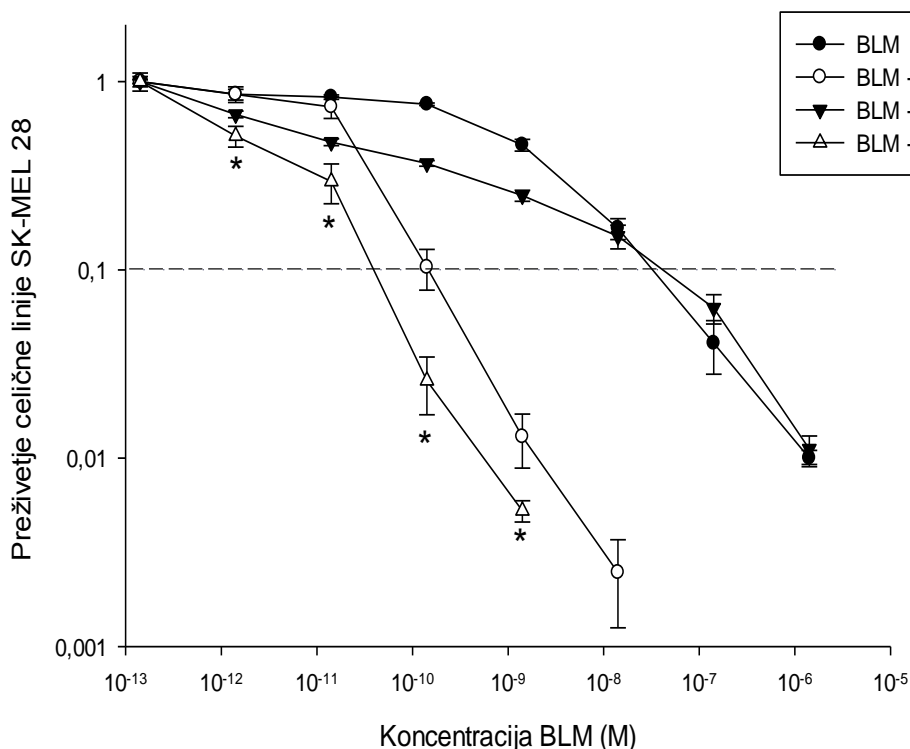
Pri testiranju vpliva kombiniranega tretiranja celic z vemurafenibom in elektrokemoterapijo z bleomicinom smo celice izpostavili 7 različnim koncentracijami bleomicina, in sicer 1.4×10^{-12} M, 1.4×10^{-11} M, 1.4×10^{-10} M, 1.4×10^{-9} M, 1.4×10^{-8} M, 1.4×10^{-7} M in 1.4×10^{-6} M. Nato smo celice gojili v gojišču z dodanim $0,5 \mu\text{M}$ vemurafeniba. Preživetje celic smo spremljali s testom klonogenosti.



Slika 11: Primerjava citotoksičnosti izpostavitve celične linije SK-MEL 28, ki ima izražen mutiran gen *braf* (V600E) bleomicinu in vemurafenibu (BLM + VMF) in elektrokemoterapiji z bleomicinom v kombinaciji s tretiranjem z vemurafenibom (BLM + EP + VMF). Rezultati so podani kot delež preživetja celic SK-MEL 28 glede na kontrolno skupino (povprečje treh neodvisnih poskusov \pm standardna napaka) * prikazuje statistično značilno razliko glede na kontrolo (Studentov t-test, $p < 0,05$).

Rezultati kažejo zmanjšanje preživetja celic, ki so bile izpostavljene vemurafenibu v kombinaciji z elektrokemoterapijo z bleomicinom v primerjavi s celicami, ki so bile izpostavljene samo bleomicinu in vemurafenibu (Slika 11). Izračunana vrednost IC_{90} pri

izpostavitvi celic vemurafenibu v kombinaciji z elektrokemoterapijo z bleomicinom je bila $8,5 \times 10^{-11}$ M, ob izpostavitvi celic bleomicinu in vemurafenibu pa $8,5 \times 10^{-8}$ M.



Slika 12: Primerjava citotoksičnosti izpostavitve celične linije SK-MEL 28, ki ima izražen mutiran gen *braf* (V600E) bleomicinu (BLM), elektrokemoterapiji z bleomicinom (BLM + EP), bleomicinu in vemurafenibu (BLM + VMF) in elektrokemoterapiji z bleomicinom v kombinaciji s tretiranjem z vemurafenibom (BLM + EP + VMF). Rezultati so podani kot delež preživetja celic SK-MEL 28 glede na kontrolno skupino (povprečje treh neodvisnih poskusov ± standardni odklon). * prikazuje statistično značilno razliko glede na kontrolo (Studentov t-test, $p < 0,05$). Prekinjena črta označuje vrednost IC_{90} .

Izpostavitve celic SK-MEL 28 $0,5 \mu\text{M}$ vemurafenibu je zmanjšala njihovo preživetje za 50 %. Ta vpliv smo normalizirali tako, da smo pri poskusih, kjer smo preverjali učinek vemurafeniba v kombinaciji z elektrokemoterapijo z bleomicinom tudi pri kontroli dodali $0,5 \mu\text{M}$ vemurafeniba. Opazna je večja citotoksičnost vemurafeniba v kombinaciji z elektrokemoterapijo z bleomicinom. Pri elektrokemoterapiji z bleomicinom je bila izračunana vrednost IC_{90} $3,8 \times 10^{-10}$ M, pri izpostavitvi celic vemurafenibu v kombinaciji z elektrokemoterapijo z bleomicinom pa je bila izračunana vrednost IC_{90} $8,5 \times 10^{-11}$ M. Iz tega je razvidno, da je bila ob kombiniranem tretiranju celic z vemurafenibom, potrebna 4,5 krat manjša koncentracija bleomicina za uničenje 90 % celic (Slika 12).

4.4.1 Določanje interakcije med bleomicinom in vemurafenibom

Interakcijo med bleomicinom in vemurafenibom smo izračunali na podlagi vrednosti IC_{90} po metodi, ki so jo razvili Spector in sod. (1982). Vrednosti Q in SE smo izračunali po formulah opisanih v poglavju Materiali in metode.

Spectorjeva formula določa da, če:

$Q < -2SE$ – je učinek antagonističen

$-2SE < Q < 2SE$ – je učinek aditiven

$Q > 2SE$ – je učinek sinergističen

Naša izračunana vrednost za Q je bila 1,521 za SE pa 0,486, kar pomeni, da je $Q > 2SE$ ($1,521 > 0,968$) in da je učinek kombiniranega tretiranja z vemurafenibom in elektrokemoterapijo z bleomicinom sinergističen.

5 RAZPRAVA

Z našim delom smo želeli ugotoviti razlike v odzivu na zdravljenje celic malignega melanoma z ali brez mutacije V600E v genu *braf*. Primerjali smo celično linijo CHL-1, ki ima divji tip gena *braf* in celično linijo SK-MEL 28 z mutacijo V600E v genu *braf*. Valpione in sod. (2015) so prvi opisali primer bolnika, ki je bil sistemsko zdravljeno z BRAF inhibitorjem dabrafenibom, sočasno pa so mu uspešno zdravili kožne metastaze z elektrokemoterapijo. Na podlagi tega primera smo želeli preveriti učinkovitost elektrokemoterapije z bleomicinom na celicah malignega melanoma z divjim tipom gena *braf* in jo primerjati z učinkovitostjo elektrokemoterapije z bleomicinom na celicah malignega melanoma z mutacijo V600E v genu *braf*. Zanimalo nas je, če je elektrokemoterapija z bleomicinom učinkovita tudi ob hkratni izpostavitvi celic malignega melanoma inhibitorju mutiranega BRAF proteina vemurafenibu *in vitro*. Naši rezultati kažejo, da je elektrokemoterapija učinkovita tako na celicah malignega melanoma, ki imajo divji tip gena *braf*, kot tudi na tistih, ki imajo mutacijo V600E v genu *braf*. Učinkovitost elektrokemoterapije z bleomicinom je bila celo večja na celicah, ki imajo mutiran *braf* gen. Ob primerjavi hkratne izpostavitve celic malignega melanoma elektrokemoterapiji z bleomicinom in BRAF inhibitorju vemurafenibu smo opazili sinergistično interakcijo.

Elektrokemoterapija z bleomicinom je učinkovita metoda za zdravljenje malignega melanoma (Cadossi in sod., 2014). Preverili smo ali je občutljivost melanomskih celic na elektrokemoterapijo z bleomicinom enaka pri melanomskih celicah z in brez mutacije *braf*. Elektrokemoterapija z bleomicinom bi se lahko uporabljala tudi pri bolnikih, ki so že prejeli ali prejemale terapijo s tarčnimi zdravili za mutiran BRAF protein zato nas je zanimalo ali je elektrokemoterapija z bleomicinom učinkovita tudi pri kombiniranem zdravljenju z BRAF inhibitorjem vemurafenibom.

Do nedavnega so bile možnosti zdravljenja metastatskega melanoma zelo omejene. Dolgo časa je bila edina s strani FDA odobrena terapija za zdravljenje melanoma kemoterapija z dakarbazinom. Ta je učinkovita samo pri približno 10 % bolnikov, njen učinek je večinoma kratkotrajen in nima dokazanega vpliva na podaljšanje preživetja bolnikov (Crosby in sod., 2000). Mnoge kožne in podkožne metastaze so neodzivne na standardno zdravljenje (Boyle 2011).

V zadnjih letih je boljše poznavanje molekulske patogeneze melanoma omogočilo razvoj tarčno usmerjenih terapevtskih pristopov (Flaherty 2011). Ena od takih tarč je mutacija gena *braf*, ki je prisotna pri 40-60 % melanomov. V 90 % gre za mutacijo V600E v genu *braf* (Davies in sod., 2002). Ta povzroči neprestano aktivnost MAPK signalne poti, ki vodi do pospešenih delitev celic, upočasnjuje apoptozo in posledično vodi v pospešeno napredovanje melanoma. Onkogeno mutacijo *braf* se povezuje agresivnejšimi oblikami tumorjev, ki imajo zmanjšano občutljivost na zdravljenje (Roskoski, 2010).

S primerjavo podvojitvenih časov celičnih linij z in brez *braf* mutacije smo tudi mi ugotovili, da so delitve pri celicah z mutacijo *braf* pogostejše. Podvojitveni čas celične linije SK-MEL 28, ki ima izraženo mutacijo *braf*, je bil za dve uri krajši od podvojitvenega časa celične linije CHL-1, ki ima divji tip gena *braf*. Tudi ob primerjavi izrisanih rastnih krivulj je razvidno, da število celic celične linije SK-MEL 28 rahlo hitreje narašča.

Kemoterapija je učinkovita le, če kemoterapevtik pride do svojih tarč v tumorski celici. Citostatiki, kot sta cisplatin in bleomicin, težko vstopajo v celico, saj je njihov transport čez celično membrano otežen. Znotraj celice je njihov citotoksični učinek velik. Obsežnejši prehod citostatikov v celico lahko dosežemo s primernimi električnimi pulzi, ki jih dovedemo na mesto, kjer želimo povečati prepustnost celičnih membran (Serša in sod., 2007). Elektrokemoterapija je način zdravljenja raka, ki združuje uporabo standardnih kemoterapevtikov in aplikacijo električnih pulzov na območje tumorja. Elektrokemoterapija se je izkazala kot učinkovita terapija za zdravljenje metastaz, ki so neodzivne na standardno zdravljenje. Z elektrokemoterapijo močno povečamo količino citostatika, ki vstopi v tumorske celice. Klinične študije so pokazale, da lahko z elektrokemoterapijo z bleomicinom uspešno zdravimo kožne in podkožne metastaze. Terapijo lahko večkrat ponovimo, bolniki pa jo večinoma dobro prenašajo (Cadossi in sod., 2014). Prva klinična študija elektrokemoterapije z bleomicinom je bila opravljena leta 1991 v Franciji na 9 bolnikih s ploščato celičnim karcinomom glave ali vratu (Mir in sod., 1991). Belehradek in sod. (1993) so zdravili 8 bolnikov s skupno 40 tumorji. Od 40 tumorjev so pri 23 dosegli polno regresijo, pri 6 pa delno regresijo. Heller in sod. (1996) so z elektrokemoterapijo z bleomicinom zdravili 6 bolnikov s skupno 18 tumorji. Pri 6 so dosegli popolno regresijo, pri 7 delno regresijo, pri 5 tumorjih pa ni bilo spremembe. Med junijem 2007 in septembrom 2012 je bilo 60 bolnikov zdravljenih z elektrokemoterapijo po intravenoznem vbrizganju bleomicina. Po 3 mesecih je bila pri 29 bolnikih dosežena popolna regresija pri 23 delna regresija, pri 8 bolnikih pa ni bilo opažene spremembe ali napredovanja bolezni (Caracò in sod., 2013).

Nas je zanimalo ali se učinkovitost elektrokemoterapije z bleomicinom razlikuje pri melanomskih celicah z in brez mutacije *braf*. Citotoksičnost elektrokemoterapije z bleomicinom smo določali s testom klonogenosti s katerim določamo reprodukcijsko sposobnost celic. Elektrokemoterapija z bleomicinom se je izkazala za učinkovito terapijo za zdravljenje metastatskega melanoma z ali brez *braf* mutacije. Učinkovitost je bila večja na celični liniji SK-MEL 28, ki ima prisotno *braf* mutacijo. Celice z mutacijo *braf* so bolj občutljive tako na izpostavljenost samemu bleomicinu kot tudi na elektrokemoterapijo z bleomicinom. Pri celični liniji SK-MEL-28 z mutacijo *braf* je za uničenje 90 % celic potrebna 2 krat nižja koncentracija bleomicina. Čeprav bleomicin večinoma povzroči prekinitev DNA na mestih bogatih z GC in GT baznimi pari, raziskave kažejo, da na mesta delovanja bleomicina vpliva tudi struktura DNA (Hecht, 2000). Hertzberg in sod. (1985) so dokazali, da metilacija, ki spremeni konformacijo DNA, zmanjša uspešnost cepitve

bleomicina na mestih bogatih z GC in GT baznimi pari. Ugotovitve kažejo, da bleomicin pogosteje povzroča prekinitve v DNA na mestih, ki nosijo zapise za aktivne gene. Mesto cepitve je pogosto povezovalna regija med nukleosomi (Kuo, 1981). Dokazano je, da bleomicin lahko cepi različne vrste RNA (tRNA, mRNA, rRNA). Bleomicin slabo prehaja preko celične in jedrne membrane, kar povzroči zmanjšan dostop do ciljne DNA. RNA molekule pa so pogosto prisotne v celični citoplazmi in tako hitreje dosegljive za bleomicin. Iz tega izhaja, da je uničenje ključne celične RNA lahko potencialen mehanizem preko katerega bleomicin uniči tumorske celice (Hecht, 2000). Večji citotoksični učinek bleomicina na celicah z mutacijo *braf* ja tako lahko posledica večje aktivnosti in hitrejših delitev celic. Za določitev točnega mehanizma, ki povzroči večji citotoksični učinek bleomicina in elektrokemoterapije z bleomicinom na melanomskih celicah z mutacijo v genu *braf* pa bi bilo potrebnih več raziskav.

Identifikacija mutacije *braf* in razvoj malih molekulskih inhibitorjev mutiranih BRAF proteinov kot sta vemurafenib in dabrafenib, je močno izboljšala možnosti zdravljenja za bolnike z melanomom. Ker ima polovica melanomov prisotno mutacijo V600E v genu *braf* ima terapija, ki cilja produkt mutiranega gena velik terapevtski potencial (Davies in sod., 2002).

Primerjali smo odziv celične linije CHL-1 z divjim tipom gena *braf* in celične linije SK-MEL 28 z mutiranim genom *braf* na izpostavitvev BRAF inhibitorju vemurafenibu. Pri celični liniji z mutacijo *braf* smo opazili velik citotoksični učinek vemurafeniba. Koncentracija 10 μM je uničila skoraj vse celice. Rezultati izpostavitve celične liniji CHL-1 vemurafenibu pa kažejo njegovo selektivno delovanje. Tudi pri izpostavitvi najvišji koncentraciji (10 μM) nismo opazili citotoksičnega učinka. Naše ugotovitve se skladajo z ugotovitvami Tsaia in sod. (2008), ki prav tako niso opazili nikakršnih učinkov BRAF inhibitorja na preživetje celičnih linij z divjim tipom gena *braf*.

BRAF inhibitorji so primerni za zdravljenje bolnikov z razširjenim melanomom. Delujejo preko zaviranja aktivnosti MAPK signalne poti (Johansson in Brage, 2014). Vemurafenib je močen inhibitor mutiranega BRAF. Predklinične raziskave so pokazale, da že v nanomolarnih koncentracijah prekine signaliziranje preko MAPK signalne poti in s tem prepreči delitve celic z mutacijo *braf* (Tsai in sod., 2008). Flaherty in sod. (2010) so v raziskave faze 1 določili primeren odmerek vemurafeniba, in sicer 960 mg peroralno dvakrat na dan. V multicentrični raziskavi faze 2 so med oktobrom 2009 in marcem 2010 z vemurafenibom zdravili 132 bolnikov. Pri 6 % bolnikov so dosegli popoln odgovor pri 47 % pa delni odgovor. Bolezen je kljub zdravljenju napredovala le pri 14 % bolnikov. Povprečno trajanje obdobja brez napredovanja bolezni je bilo 6,8 meseca (Sosman in sod., 2012). V kliničnih študijah na bolnikih z melanomom je bila dokazana nizka toksičnost in hiter kliničen odgovor vemurafeniba (Huang in sod., 2013). Boc in sod. (2013) so opisali primer bolnika pri katerem citostatsko zdravljenje ni prineslo zelenih rezultatov. Tudi

zdravljenje s kombinacijo ipilimumaba z dakarabazinom ni povzročilo izboljšanja. Edino zdravljenje, ki se je izkazalo za učinkovito, je bilo zdravljenje z vemurafenibom. To je povzročilo regresijo bolezni na vseh lokalizacijah, odgovor na zdravljenje pa je trajal 6 mesecev.

Pri bolnikih z razširjenim melanomom, lahko pride do neodzivnosti na zdravljenje pri posameznih metastazah. Vzrok je lahko velikost metastaze ali pa pridobljena rezistenca na BRAF inhibitorje (Johansson in Brage, 2014). Na pridobitev rezistence na BRAF inhibitorje lahko vplivajo vse komponente MAPK signalne poti, pa tudi aktivacija alternativnih signalnih poti. Vlogo verjetno igrajo tudi heterogenost znotraj tumorja, tumorsko mikrookolje in imunski sistem. V tem primeru je potrebno uvesti dodatno zdravljenje, ki je učinkovito tudi na celicah z *braf* mutacijo (Johansson in Brage, 2014).

Ugotovili smo, da bi se elektrokemoterapija lahko uspešno uporabljala v kombinaciji z BRAF inhibitorji. Naši rezultati kažejo, da je izpostavitve celic SK-MEL 28 0,5 μM vemurafenibu zmanjšala njihovo preživetje za 50 %. Opazili smo tudi občutno zmanjšanje preživetja celic, ki so bile izpostavljene vemurafenibu v kombinaciji z elektrokemoterapijo z bleomicinom v primerjavi s celicami, ki so bile izpostavljene samo bleomicinu in vemurafenibu. To smo potrdili tudi z izračunom vrednosti IC_{90} , ki je bila za elektrokemoterapijo z bleomicinom manjša kot IC_{90} pri izpostavitvi celic vemurafenibu v kombinaciji z elektrokemoterapijo z bleomicinom. Pri kombinirani izpostavitvi celic vemurafenibu in elektrokemoterapiji z bleomicinom je bila potrebna 4,5 krat manjša koncentracija bleomicina za uničenje 90 % celic.

In vitro rezultati so pokazali, da je učinek elektrokemoterapije z bleomicinom v kombinaciji z izpostavitvijo vemurafenibu sinergističen. Zelo pomembna ugotovitev je tudi, da ni potrebno čakati na zaključek zdravljenja z BRAF inhibitorji, da lahko začnemo z elektrokemoterapijo. Glede na pridobljene rezultate je učinek hkratnega apliciranja obeh terapij še večji. Valpione in sod. (2015) so opisali, da je bolnik dobro prenašal sočasno zdravljenje z BRAF inhibitorjem in elektrokemoterapijo. Naši rezultati, ki kažejo na sinergistično delovanje, podpirajo uporabo elektrokemoterapije sočasno z zdravljenjem z BRAF inhibitorji. Vendar pa bo potrebno opraviti raziskave na večjem številu bolnikov, da se bo zagotovo potrdilo, da sočasno zdravljenje ne povzroča hujših nezaželenih učinkov. Če bodo tudi *in vivo* raziskave potrdile sinergistično interakcijo med terapijami, bi lahko to vodilo do zmanjšanja uporabljenega odmerka bleomicina pri elektrokemoterapiji.

Naše ugotovitve so v skladu z ugotovitvami raziskave, kjer so spremljali zdravljenje bolnika z metastatskim melanomom. Bolnik je prejemal terapijo z BRAF inhibitorjem dabrafenibom, hkrati pa so posamezne metastaze uspešno zdravili z elektrokemoterapijo. Elektrokemoterapija je bila učinkovita tudi na metastazah, ki se niso odzvale na zdravljenje z BRAF inhibitorjem dabrafenibom (Valpione in sod., 2015). To nakazuje, da bi bila lahko

elektrokemoterapija učinkovita tudi na celicah, ki so pridobile rezistenco na BRAF inhibitorje.

Učinkovitost elektrokemoterapije na celicah z *braf* mutacijo kaže na možnost klinične uporabe elektrokemoterapije pri zdravljenju melanoma s prisotno *braf* mutacijo. Ugotovili smo tudi, da je ob sočasni izpostavitvi melanomskih celic z *braf* mutacijo vemurafenibu in elektrokemoterapiji z bleomicinom njun učinek sinergističen. Naši rezultati so spodbudni, vendar je potrebno raziskave razširiti na več celičnih linij in tumorskih modelov. Učinkovitost elektrokemoterapije bi morali preveriti tudi na klonih, ki so pridobili rezistenco na BRAF inhibitorje. S tako pridobljenimi rezultati bi lahko natančneje določili odziv tumorja in možne nezaželene učinke.

Večina bolnikov sčasoma razvije rezistenco na BRAF inhibitorje, kar vodi v ponovno napredovanje bolezni (Johansson in Brage, 2014). Sočasna uporaba elektrokemoterapije z bleomicinom in zdravljenja z vemurafenibom se lahko izkaže kot dobra strategija za nadaljnje izboljšanje rezultatov zdravljenja pri bolnikih z metastatskim melanomom, ki imajo potrjeno V600E mutacijo v genu *braf*.

6 SKLEPI

- Celične delitve so pri celicah z mutacijo *braf* pogostejše. Podvojitveni čas celične linije SK-MEL 28, ki ima izraženo mutacijo *braf*, je bil za dve uri krajši od podvojitvenega časa celične linije CHL-1, ki ima divji tip gena *braf*. Tudi ob primerjavi izrisanih rastnih krivulj je razvidno, da število celic celične linije SK-MEL 28 rahlo hitreje narašča.
- Elektrokemoterapija z bleomicinom je učinkovit zmanjšala preživetje celic metastatskega melanoma z ali brez *braf* mutacije. Učinkovitost je bila večja na celični liniji SK-MEL 28, ki ima prisotno *braf* mutacijo. Celice z mutacijo *braf* so bolj občutljive tako na izpostavljenost samemu bleomicinu kot tudi na elektrokemoterapijo z bleomicinom.
- Pri celični liniji SK-MEL 28 z mutacijo *braf* je za uničenje 90 % celic potrebna 2 krat nižja koncentracija bleomicina kot pri celični liniji CHL-1 z divjim tipom gena *braf*.
- Pri celični liniji SK-MEL 28 z mutacijo *braf* smo opazili velik citotoksični učinek vemurafeniba. Rezultati izpostavitve celične liniji z divjim tipom gena *braf* CHL-1 vemurafenibu pa kažejo njegovo selektivno delovanje. Tudi pri izpostavitvi najvišji koncentraciji nismo opazili citotoksičnega učinka.
- Pri kombinirani izpostavitvi celic vemurafenibu in elektrokemoterapiji z bleomicinom je bila potrebna 4,5 krat manjša koncentracija bleomicina za uničenje 90 % celic v primerjavi s samo elektrokemoterapijo z bleomicinom.
- *In vitro* rezultati so pokazali, da je učinek elektrokemoterapije z bleomicinom v kombinaciji z izpostavitvijo vemurafenibu sinergističen. Zelo pomembna ugotovitev je tudi, da ni potrebno čakati na zaključek zdravljenja z BRAF inhibitorji, da lahko začnemo z elektrokemoterapijo.

7 POVZETEK

Melanom je zaradi svoje sposobnosti metastaziranja najagresivnejša oblika kožnega raka. Incidenca melanoma v zadnjem desetletju vztrajno narašča. Kopičenje mutacij v genih je vzrok za nastanek rakavih obolenj. Približno 50 % melanomov ima prisotno V600E mutacijo v genu *braf*. Ta gen nosi zapis za serin/treonin kinazo iz družine RAF kinaz. Mutirana kinaza BRAF je neprestano aktivna in posledično povzroči neprestano aktivacijo MAPK signalne poti. To vodi do hitrejših delitev, izogibanja apoptozi in večje odpornosti na zdravljenje pri celicah, ki imajo mutacijo v genu *braf*. Boljše poznavanje molekulskih mehanizmov rakavih celic je omogočilo razvoj tarčnih zdravil. Vemurafenib je tarčno zdravilo, ki cilja mutirani protein BRAF in ga inaktivira. Pri zdravljenju melanoma najboljše rezultate prinese kombinirano zdravljenje. Pogost problem pri zdravljenju rakavih obolenj je tudi dostava zdravila do njegove tarče v celici. Bleomicin je kemoterapevtik, ki zaradi svoje hidrofilnosti težko prehaja celično membrano. Z apliciranjem električnih pulzov – elektrokemoterapijo, lahko znatno povečamo njegov prehod v celico. V celici povzroči prelome v verigi DNA in tako sproži apoptozo. Elektrokemoterapija je vse bolj uveljavljena metoda zdravljenja predvsem kožnih metastaz malignega melanoma. Cilj magistrskega dela je bil ugotoviti razlike v učinkovitosti elektrokemoterapije na celicah malignega melanoma z ali brez mutacije v genu *braf*. Ugotavljali smo citotoksičnost elektrokemoterapije z bleomicinom *in vitro* na celicah malignega melanoma, ki imajo prisotno V600E mutacijo v genu *braf*, in izražajo mutiran protein BRAF, in celicah, ki nimajo mutacije V600E v genu *braf*. Ugotoviti smo želeli tudi kolikšna je citotoksičnost elektrokemoterapije z bleomicinom na celicah malignega melanoma z mutacijo v genu *braf* ob sočasni izpostavitvi inhibitorju mutiranega BRAF proteina vemurafenibu. Ugotovili smo, da so celične delitve pri celicah z mutacijo *braf* pogostejše. Podvojitveni čas celične linije SK-MEL 28, ki ima izraženo mutacijo *braf*, je bil za dve uri krajši od podvojitvenega časa celične linije CHL-1, ki ima divji tip gena *braf*. Celični linij smo najprej izpostavili elektrokemoterapiji z bleomicinom. Celično preživetje smo določili s testom klonogenosti. Ugotovili smo, da je bilo ob izpostavitvi bleomicinu in elektrokemoterapiji z bleomicinom preživetje celic z mutacijo v genu *braf* nižje od preživetja celic brez mutacije. Pri celični liniji SK-MEL-28 z mutacijo *braf* je bila za uničenje 90 % celic potrebna 2 krat nižja koncentracija bleomicina. Pri celični liniji z mutacijo *braf* SK-MEL 28 smo opazili velik citotoksični učinek vemurafeniba. Rezultati izpostavitve celične liniji z divjim tipom gena *braf* CHL-1 vemurafenibu pa kažejo njegovo selektivno delovanje. Tudi pri izpostavitvi najvišji koncentraciji nismo opazili citotoksičnega učinka. Prav tako smo preverili učinkovitost elektrokemoterapije z bleomicinom ob sočasni izpostavitvi celične linije SK-MEL 28 vemurafenibu. Ugotovili smo, da bi se elektrokemoterapija lahko uspešno uporabljala v kombinaciji z BRAF inhibitorji. Opazili smo občutno zmanjšanje preživetja celic, ki so bile izpostavljene vemurafenibu v kombinaciji z elektrokemoterapijo z bleomicinom v primerjavi s celicami, ki so bile izpostavljene samo bleomicinu in vemurafenibu. Pri kombinirani izpostavitvi

celic vemurafenibu in elektrokemoterapiji z bleomicinom je bila potrebna 4,5 krat manjša koncentracija bleomicina za uničenje 90 % celic v primerjavi z elektrokemoterapijo z bleomicinom. Ugotovili smo tudi, da je učinek med elektrokemoterapijo z bleomicinom in izpostavitvijo vemurafenibu pri melanomskih celicah z mutacijo v genu *braf* sinergističen. Učinkovitost elektrokemoterapije z bleomicinom na melanomskih celicah z *braf* mutacijo in potencial za učinkovitost le te med zdravljenjem z vemurafenibom *in vitro* nakazuje na možnost klinične uporabe elektrokemoterapije z bleomicinom sočasno z zdravljenjem z vemurafenibom ob prisotnosti *braf* mutacije pri bolnikih z melanomom.

8 VIRI

- Ascierto P.A., Kirkwood J.M., Grob J.J., Simeone E., Grimaldi A.M., Maio M., Palmieri G., Testori A., Marincola F.M., Mozzillo N. 2012. The role of BRAF V600 mutation in melanoma. *Journal of Translational Medicine*, 10, 85: 1-9
- Belehradec M., Domenge C., Luboinski B., Orłowski S., Belehradec J., Mir L.M. 1993. Electrochemotherapy, a new antitumor treatment. First clinical phase I- II trial. *Cancer*, 72, 12: 3694-3700
- Blum R.H., Carter S.K., Agre K. 1973. A clinical review of bleomycin-a new antineoplastic agent. *Cancer*, 31,4: 903-914
- Boc M., Boc N., Mesti T., Reberšek M. 2013. Zdravljenje metastatskega malignega melanoma z VMFom - klinični primer. *Onkologija*, XVII, 2: 143-146
- Bollag G., Tsai J., Zhang J., Zhang C., Ibrahim P., Nolop K., Hirth P. 2012. VMF: the first drug approved for BRAF-mutant cancer. *Nature Reviews Drug Discovery*, 11: 873-886
- Boyle G.M. 2011. Therapy for metastatic melanoma: an overview and update. *Expert Review of Anticancer Therapy*, 11, 5: 725-737
- Bucheita A.D., Davies M.A. 2014. Emerging insights into resistance to BRAF inhibitors in melanoma. *Biochemical Pharmacology*, 87: 381-389
- Cadossi R., Ronchetti M., Cadossi M. 2014. Locally enhanced chemotherapy by electroporation: clinical experiences and perspective of use of electrochemotherapy. *Future Oncology*, 10, 5: 877-890
- Caracò C., Mozzillo N., Marone U., Simeone E., Benedetto L., Di Monta G., Di Cecilia M.L., Botti G., Ascierto P.A. 2013. Long-lasting response to electrochemotherapy in melanoma patients with cutaneous metastasis. *BMC Cancer*, 13: 564
- Chapman P.B., Hauschild A., Robert C., Haanen J.B., Ascierto P., Larkin J., Dummer R., Garbe C., Testori A., Maio M., Hogg D., Lorigan P., Lebbe C., Jouary T., Schadendorf D., Ribas A., O'Day S.J., Sosman J.A., Kirkwood J.M., Eggermont A.M., Dreno B., Nolop K., Li J., Nelson B., Hou J., Lee R.J., Flaherty K.T., McArthur G.A. 2011. Improved survival with VMF in melanoma with BRAF V600E mutation. *The New England Journal of Medicine*, 364, 26: 2507-2516
- Crosby T., Fish R., Coles B., Mason M.D. 2000. Systemic treatments for metastatic cutaneous melanoma. *The Cochrane Collaboration*, 2: CD001215

- Czekanska E.M. 2011. Assessment of cell proliferation with resazurin-based fluorescent dye. *Methods in Molecular Biology*, 740: 27-32
- Davies H., Bignell G.R., Cox C., Stephens P., Edkins S., Clegg S., Teague J., Woffendin H., Garnett M.J., Bottomley W., Davis N., Dicks E., Ewing R., Floyd Y., Gray K., Hall S., Hawes R., Hughes J., Kosmidou V., Menzies A., Mould C., Parker A., Stevens C., Watt S., Hooper S., Wilson R., Jayatilake H., Gusterson B.A., Cooper C., Shipley J., Hargrave D., Pritchard-Jones K., Maitland N., Chenevix-Trench G., Riggins G.J., Bigner D.D., Palmieri G., Cossu A., Flanagan A., Nicholson A., Ho J.W., Leung S.Y., Yuen S.T., Weber B.L., Seigler H.F., Darrow T.L., Paterson H., Marais R., Marshall C.J., Wooster R., Stratton M.R., Futreal A.P. 2002. Mutations of the BRAF gene in human cancer. *Nature*, 417: 949-954
- Flaherty K.T., Puzanov I., Kim K.B., Ribas A., McArthur G.A., Sosman J.A., O'Dwyer P.J., Lee R.J., Grippo J.F., Nolop K., Chapman P.B. 2010. Inhibition of Mutated, Activated BRAF in Metastatic Melanoma. *The New England Journal of Medicine*, 363, 9: 809-819
- Flaherty K.T. 2011. BRAF inhibitors and melanoma. *Cancer journal*, 17: 505–511
- Franken N.A., Rodermond H.M., Stap J., Haveman J., van Bree C. 2006. Clonogenic assay of cells in vitro. *Nature protocols*, 1,5: 2315-2319
- Gothelf A., Mir L.M., Gehl J. 2003. Electrochemotherapy: results of cancer treatment using enhanced delivery of bleomycin by electroporation. *Cancer Treatment Reviews*, 29, 5: 371-387
- Hecht S.M. 2000. Bleomycin: new perspectives on the mechanism of action. *Journal of Natural Products*, 63: 158-168
- Heller R., Jaroszeski M.J., Glass L.F., Messina J.L., Rapaport D.P., DeConti R.C., Fenske N.A., Gilbert R.A., Mir L.M., Reintgen D.S. 1996. Phase I/II trial for the treatment of cutaneous and subcutaneous tumors using electrochemotherapy. *Cancer*, 77, 5: 964-971
- Hertzberg R.P., Caranfa M.J., Hecht S.M. 1985. DNA Methylation Diminishes Bleomycin-Mediated Strand Scission. *Biochemistry*, 24, 20: 5285–5289
- Huang T., Karsy M., Zhuge J., Zhong M., Liu D. 2013. BRAF and the inhibitors: from bench to bedside. *Journal of Hematology & Oncology*, 6, 30. doi:10.1186/1756-8722-6-30
- Johansson H.C., Brage E.S. 2014. BRAF inhibitors in cancer therapy. *Pharmacology & Therapeutics*, 142, 2: 176-182

- Kuo M.T. 1981. Preferential damage of active chromatin by bleomycin. *Cancer research*, 41, 6: 2439-2443
- Larrosa M., Tomas-Barberan F.A., Espin J.C. 2004. The grape and wine polyphenol piceatannol is a potent inducer of apoptosis in human SK-Mel-28 melanoma cells. *European Journal of Nutrition*, 43, 5: 275-284
- Lebar-Maček A., Serša G., Čemažar M., Miklavčič D. 1998. Elektroporacija. *Medicinski razgledi*, 37: 339-354
- Mali B., Jarm T., Snoj M., Serša G., Miklavčič D. 2013. Antitumor effectiveness of electrochemotherapy: A systematic review and meta-analysis. *European Journal of Surgical Oncology*, 39: 4-16
- Marty M., Sersa G., Garbay J.R., Gehl J., Collins C.G., Snoj M., Billard V., Geertsen P.F., Larkin J.O., Miklavcic D., Pavlovic I., Paulin-Kosir S.M., Cemazar M., Morsli N., Rudolf Z., Robert C., O'Sullivan C.G., Mir L.M. 2006. Electrochemotherapy - an easy, highly effective and safe treatment of cutaneous and subcutaneous metastases: Results of ESOPE (European Standard Operating Procedures of Electrochemotherapy) study. *European Journal of Cancer Supplements*, 4: 3-13
- Matthiessen L.W., Chalmers R.L., Sainsbury D.C., Veeramani S., Kessell G., Humphreys A.C., Bond J.E., Muir T., Gehl J. 2011. Management of cutaneous metastases using electrochemotherapy. *Acta Oncologica*, 50: 621-629
- Miklavčič D., Davalos R.V. 2014. Electrochemotherapy (ECT) and irreversible electroporation (IRE) -advanced techniques for treating deep-seated tumors based on electroporation. *BioMedical Engineering OnLine*, 14, 3
- Miller A.J., Mihm M.C. 2006. Melanoma. *The New England Journal of Medicine*, 355, 1: 51-65
- Mir L.M., Belehradek M., Domenge C., Orłowski S., Poddevin B., Belehradek J., Jr., Schwaab G., Luboinski B., Paoletti C. 1991. [Electrochemotherapy, a new antitumor treatment: first clinical trial]. *Comptes rendus de l'académie des sciences - series III*, 313, 13: 613-618
- Mir L.M., Gehl J., Serša G., Collins C.G., Garbay J.R., Billard V., Geertsen P.F., Rudolf Z., O'Sullivan G.C., Marty M. 2006. Standard operating procedures of the electrochemotherapy: Instructions for the use of bleomycin or cisplatin administered either systemically or locally and electric pulses delivered by Cliniporator™ by means of invasive or noninvasive electrodes. *European Journal of Cancer Supplements*, 4: 14-25

- Novaković S., Hočevar M., Jezeršek Novaković B., Strojan P., Žgajnar J. 2009. Onkologija: Raziskovanje, diagnostika in zdravljenje raka. Ljubljana, Mladinska knjiga: 30-31, 241-242
- O'Brien J., Wilson I., Orton T., Pognan F. 2000. Investigation of the Alamar Blue (resazurin) fluorescent dye for the assessment of mammalian cell cytotoxicity. *European Journal of Biochemistry*, Sep, 267, 17: 5421-5426
- Ocvirk J. 2013. Sistemsko zdravljenje melanoma. *Onkologija*, XVII, 2; 129-131
- Polsky D., Cordon-Cardo C. 2003. Oncogenes in melanoma. *Oncogene*, 22: 3087–3091
- Queirolo P., Marincola F., Spagnolo F. 2014. Electrochemotherapy for the management of melanoma skin metastasis: a review of the literature and possible combinations with immunotherapy. *Archives of Dermatological Research*, 306: 521–526
- Ravnan M.C., Matalka M.S. 2012. VMF in Patients With BRAF V600E Mutation–Positive Advanced Melanoma. *Clinical Therapeutics*, 34, 7: 1474 -1486
- Rafehi H., Orłowski C., Georgiadis G.T., Ververis K., El-Osta A., Karagiannis T.C. 2011. Clonogenic Assay: Adherent Cells. *Journal of Visualized Experiments*, 49, <http://www.jove.com/details.php?id=2573>, doi: 10.3791/2573
- Ricotti F., Giuliadori K., Cataldi I., Campanati A., Ganzetti G., Ricotti G., Offidani A. 2014. Electrochemotherapy: an effective local treatment of cutaneous and subcutaneous melanoma metastases. *Dermatologic Therapy*, 27: 148-152
- Roskoski R. Jr. 2010. RAF protein-serine/threonine kinases: structure and regulation. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 399, 3: 313-317
- Roth V. Doubling time. http://www.doubling-time.com/compute_more.php (20.6.2016)
- Rudolf Z., Bartenjev I., Hočevar M., Strojan P., Ocvirk J., Snoj M. 2004. Priporočila za obravnavo bolnikov z malignim melanomom. *Onkologija*, priporočila: 68-72
- Serša G., Rudolf Z., Paulin-Košir S.M., Ocvirk J., Čemažar M., Kranjc S., Slekovec-Kolar B., Snoj M. 2007. ECT pri lokalnem zdravljenju napredovalega melanoma. *Radiology and Oncology*, 41, 1: 37-42.
- Serša G., Jarm T., Kotnik T., Coer A., Podkrajšek M., Šentjerc M., Miklavčič D., Kadivec M., Kranjc S., Secerov A., Čemažar M. 2008. Vascular disrupting action of electroporation and electrochemotherapy with bleomycin in murine sarcoma. *British Journal of Cancer*, 98: 388-398
- Serša G., Čemažar M., Snoj M. 2011. Electrochemotherapy of solid tumors – preclinical and clinical experience. *Conference proceedings: Annual International Conference of*

the IEEE Engineering in Medicine and Biology Society. IEEE Engineering in Medicine and Biology Society. Annual Conference, 2011: 728-731

Shelledy L., Roman D. 2015. VMF: First-in-Class BRAF Mutated Inhibitor for the Treatment of Unresectable or Metastatic Melanoma. *Journal of the Advanced Practitioner in Oncology*, 6, 4: 361–365

Simões M.C., Sousa J.J., Pais A.A. 2015. Skin cancer and new treatment perspectives: A review. *Cancer Letters*, 357,1: 8–42

Snoj N., Čufer T. 2009. Biološko in tarčno zdravljenje karcinomov. *Onkologija*. 11, 1: 72-76

Sosman J.A., Kim K.B., Schuchter L., Gonzalez R., Pavlick A.C., Weber J.S., McArthur G.A., Hutson T.E., Moschos S.J., Flaherty K.T., Hersey P., Kefford R., Lawrence D., Puzanov I., Lewis K.D., Amaravadi R.K., Chmielowski B., Lawrence J., Shyr Y., Ye F., Li J., Nolop K.B., Lee R.J., Joe A.K., Ribas A. 2012. Survival in BRAF V600–Mutant Advanced Melanoma Treated with Vemurafenib. *The New England Journal of Medicine*, 366, 8: 707-714

Spagnolo F., Ghiorzo P., Queirolo P. 2014. Overcoming resistance to BRAF inhibition in BRAF-mutated metastatic melanoma. *Oncotarget*, 5, 21: 10206-10221

Spector S.A., Tyndall M., Kelley E. 1982. Effects of acyclovir combined with other antiviral agents on human cytomegalovirus. *The American Journal of Medicine* 73, 1A: 36-39

Strickland L.R., Pal H.C., Elmets C.A., Afaq F. 2015. Targeting drivers of melanoma with synthetic small molecules and phytochemicals. *Cancer Letters*, 359, 1: 20–35

Suzuki H., Nagai K., Yamaki H., Tanaka N., Umezawa H. 1969. On the mechanism of action of bleomycin: scission of DNA strands *in vitro* and *in vivo*. *The Journal of Antibiotics*, 22, 9: 446-448.

Swaika A., Crozier J.A., Joseph R.W. 2014. VMF: an evidence-based review of its clinical utility in the treatment of metastatic melanoma. *Drug Design, Development and Therapy*, 8: 775–787

Tsai J., Lee J.T., Wang W., Zhang J., Cho H., Mamo S., Bremer R., Gillette S., Kong J., Haass N.K., Sproesser K., Li L., Smalley K.S., Fong D., Zhu Y.L., Marimuthu A., Nguyen H., Lam B., Liu J., Cheung I., Rice J., Suzuki Y., Luu C., Settachatgul C., Shellooe R., Cantwell J., Kim S.H., Schlessinger J., Zhang K.Y., West B.L., Powell B., Habets G., Zhang C., Ibrahim P.N., Hirth P., Artis D.R., Herlyn M., Bollag G. 2008. Discovery of a selective inhibitor of oncogenic BRAF kinase with potent

antimelanoma activity. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 105, 8: 3041-3046

Tsao H., Chin L., Garraway L.A., Fisher D.E. 2012. Melanoma: from mutations to medicine. *Gene and Development*, 26: 1131–1155

Valpione S., Campana L.G., Pigozzo J., Chiarion-Sileni V. 2015. Consolidation electrochemotherapy with bleomycin in metastatic melanoma during treatment with dabrafenib. *Radiology and Oncology*, 49, 1: 71-74

Weaver J.C. 1993. Electroporation: A General Phenomenon for Manipulating Cells and Tissues. *Journal of Cellular Biochemistry* 51: 426-435

Žakelj M.P., Žagar T., Zadnik V. 2007. Epidemiologija malignega melanoma. *Radiology and Oncology*, 41, 1: 1-12

ZAHVALA

Zahvaljujem se prof. dr. Gregorju Serši za prevzem mentorstva in omogočitev opravljanja eksperimentalnega dela magistrskega dela na Onkološkem inštitutu v Ljubljani na Oddelku za eksperimentalno onkologijo. Hvala za dano priložnost. Zahvaljujem se tudi za vse popravke magistrskega dela, ki so pripomogli k njegovemu izboljšanju.

Posebej lepo bi se zahvalila delovnim mentoricama Lari Prosen in Tanji Dolinšek za vso pomoč pri eksperimentalnem delu in pisanju magistrskega dela. Hvala za vso potrpežljivost, dobro voljo, vse praktične nasvete in odgovore na moja vprašanja.

Zahvaljujem se recenzentki prof. dr. Maji Čemažar za hiter pregled magistrskega dela.

Zahvala gre tudi moji družini za finančno podporo tekom študija. Še posebej bi se zahvalila sestri Anji, da mi je vedno stala ob strani, za vse spodbudne besede in dobro voljo.