

UNIVERZA V LJUBLJANI
BIOTEHNIŠKA FAKULTETA
ŠTUDIJ MOLEKULSKE IN FUNKCIONALNE BIOLOGIJE

Barbara STAREŠINIČ

**UČINEK ELEKTROPORACIJE V KOMBINACIJI Z RAZTOPINO
 CaCl_2 NA TUMORSKE IN NORMALNE CELIČNE LINIJE *IN VITRO***

Magistrsko delo
Magistrski študij– 2. stopnja

**THE EFFECT OF ELECTROPORATION IN COMBINATION WITH
 CaCl_2 ON TUMOR AND NORMAL CELL LINES *IN VITRO***

M. Sc. Thesis
Master Study Programme

Ljubljana, 2016

Magistrsko delo je zaključek magistrskega študijskega programa 2. stopnje Molekulska in funkcionalna biologija. Opravljeno je bilo na Oddelku za eksperimentalno onkologijo Onkološkega inštituta Ljubljana.

Po sklepu Komisije za študij 1. in 2. stopnje oziroma Senata oddelka z dne 15. 4. 2016 je bila za mentorico magistrskega dela imenovana prof. dr. Maja Čemažar in za recenzenta prof. dr. Tom Turk.

Komisija za oceno in zagovor:

Predsednik: prof. dr. Peter MAČEK
Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Oddelek za biologijo

Član: prof. dr. Tom TURK
Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Oddelek za biologijo

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

Datum zagovora:

Podpisana izjavljam, da je naloga 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.

Barbara Starešinič

KLJUČNA DOKUMENTACIJSKA INFORMACIJA (KDI)

ŠD	Du2
DK	UDK 616(043.2)=163.6
KG	elektroporacija/ CaCl_2 /elektrokemoterapija/citotoksičnost/ <i>in vitro</i>
AV	STAREŠINIČ, Barbara, diplomirana biologinja (UN)
SA	ČEMAŽAR, Maja (mentorica)/TURK Tom (recenzent)
KZ	SI-1000 Ljubljana, Jamnikarjeva 101
ZA	Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Oddelek za biologijo, Študij molekulske in funkcionalne biologije
LI	2016
IN	UČINEK ELEKTROPORACIJE V KOMBINACIJI Z RAZTOPINO CaCl_2 NA TUMORSKE IN NORMALNE CELIČNE LINIJE <i>IN VITRO</i>
TD	Magistrsko delo (Magistrski študij – 2. stopnja)
OP	X, 52 str., 1 pregl., 30 sl., 62 vir.
IJ	sl
JI	sl/en
AI	Elektroporacija (EP) je fizikalna metoda, kjer celice izpostavimo električnim pulzom, s čimer začasno povečamo prepustnost celičnih membran in omogočimo vstop v celice molekulam in ionom, ki težje prehajajo skozi celično membrano. V klinični praksi za zdravljenje raka se vse bolj uporablja elektrokemoterapija, ki združuje elektroporacijo in protitumorno učinkovino, kot sta bleomicin in cisplatin, potekajo pa raziskave drugih zdravil, med katerimi je tudi Ca^{2+} (v obliki CaCl_2). EP v kombinaciji z raztopino CaCl_2 je pokazala učinkovito zmanjšanje preživetja tumorskih celic, rast sferoidov in tumorjev, saj je Ca^{2+} pomemben sekundarni sporočevalec, ki je v citosolu prisoten v nizkih koncentracijah in je vpleten v številne celične procese, med drugim tudi v celično smrt, zato je v celicah natančno uravnavan. Z EP v prisotnosti raztopine CaCl_2 se močno poveča znotrajcelična koncentracija Ca^{2+} , kar preko različnih mehanizmov lahko vodi v celično smrt. Želeli smo preveriti, ali ima EP v kombinaciji z raztopino CaCl_2 različen učinek na tumorske in normalne celice v primerjavi z elektrokemoterapijo z bleomicinom, pri čemer se je izkazalo, da je terapija citotoksična za vse izbrane celične linije pri različnih IC_{50} koncentracijah. Prav tako smo opazili od koncentracije CaCl_2 odvisno znižanje znotrajcelične koncentracije ATP, ki v določeni meri sovpada s krivuljo citotoksičnosti, medtem ko je pri elektrokemoterapiji z bleomicinom koncentracija ATP padla le pri visokih koncentracijah bleomicina. Z barvanjem po Giemsi smo po terapiji na podlagi morfologije določevali tip celične smrti, ki je bila predvsem nekroza. Poleg tega smo spremljali tudi učinek terapije na migracijo celic, kjer smo zaznali znižanje stopnje migracije celic pri IC_{50} le pri endotelijskih celicah. Dokazali smo tudi, da ima EP v prisotnosti raztopine CaCl_2 antiangiogeni učinek <i>in vitro</i> , saj sta bili znižani tako stopnja migracije kot sposobnost nastanka kapilaram podobnih struktur. EP je v kombinaciji s CaCl_2 pokazala citotoksičen učinek na tumorske in normalne celice ter antiangiogeni učinek na endotelijske celice, nadaljnje raziskave pa so potrebne za popolno razumevanje mehanizmov delovanja in učinkov na druge tipe celic v organizmu.

KEY WORDS DOCUMENTATION

DN Du2
 DC UDK 616(043.2)=163.6
 CX electroporation/ CaCl_2 /electrochemotherapy/cytotoxicity/*in vitro*
 AU STAREŠINIČ, Barbara
 AA ČEMAŽAR, Maja (supervisor)/TURK Tom (reviewer)
 PP SI-1000 Ljubljana, Jamnikarjeva 101
 PB University of Ljubljana, Biotechnical Faculty, Master Study Programmes in Molecular and Functional Biology
 PY 2016
 TI THE EFFECT OF ELECTROPORATION IN COMBINATION WITH CaCl_2 ON TUMOR AND NORMAL CELL LINES *IN VITRO*
 DT M. Sc. Thesis (Master Study Programme)
 NO X, 52 p., 1 tab., 30 fig., 62 ref.
 LA sl
 AL sl/en
 AB Electroporation (EP) is a physical approach where cells are exposed to electric pulses, where cell membranes are temporally permeabilized and poorly permeating molecules and ions can enter. Electrochemotherapy (ECT) is combining electroporation and chemotherapeutic drug, mostly bleomycin and cisplatin, with other substances being tested, such as calcium (CaCl_2 solution). Calcium EP showed effectively reduced survival of cancer cells, growth of spheroids and tumors. Calcium is important second messenger, involved in many cellular processes, including cell death and therefore tightly regulated. Calcium EP induces elevation of normally low cytosolic calcium concentration what can cause cell death through several mechanisms. We evaluated the effects of calcium EP on two tumor and two normal cell lines and compared effects with ECT with bleomycin. Calcium EP was cytotoxic in both, tumor and normal cell lines at different IC_{50} concentration, therefore differential effect on cytotoxicity between normal in cancer cells was not observed. Calcium EP caused dose-dependent ATP depletion, which appears to follow same trend as cytotoxicity curve, whereas ECT caused ATP depletion only when high bleomycin concentrations were used. Giemsa staining revealed that calcium EP induces necrotic cell death in all cell lines. Furthermore, calcium EP seems to have anti-angiogenic effects, as it resulted in reduced migration at wound healing assay and reduced tube formation of used endothelial cells at IC_{50} concentration, whereas no effect on migration of other cell lines was observed. Calcium EP showed cytotoxic in *in vitro* study on normal and tumor cell lines. It also showed anti-angiogenic effect on endothelial cells. To fully elucidate the mechanisms of action and effects on other cell types, further studies are needed.

KAZALO VSEBINE

KLJUČNA DOKUMENTACIJSKA INFORMACIJA	III
KEY WORDS DOCUMENTATION	IV
KAZALO VSEBINE	V
KAZALO SLIK	VII
KAZALO PREGLEDNIC	VIII
SEZNAM OKRAJŠAV IN SIMBOLOV	IX
SLOVARČEK	X
1 UVOD	1
1.1 NAMEN	1
1.2 HIPOTEZE	1
2 PREGLED OBJAV	2
2.1 RAK	2
2.1.2 Karcinogeneza	3
2.1.2.1 Lastnosti rakavih celic	4
2.1.3 Neodzivnost na apoptotske signale	5
2.1.4 Tumorsko mikrookolje	5
2.1.5 Angiogeneza	6
2.1.5.1 Tumorsko žilje	7
2.1.6 Migracija celic in metastaziranje	8
2.2 TERAPEVTSKI PRISTOPI V ONKOLOGIJI	9
2.2.1 Kirurgija	9
2.2.2 Radioterapija/obsevanje	10
2.2.3. Kemoterapija	10
2.2.4 Hormonska terapija	10
2.2.5 Tarčna zdravila	10
2.2.6 Genska terapija	10
2.3 ELEKTROPORACIJA	11
2.2.1 Elektrokemoterapija	12
2.3 VLOGA Ca^{2+} V CELICI	13
2.3.1 Ca^{2+} in celična smrt	13
2.3.2 Ca^{2+} in zdravljenje raka	16
3 MATERIAL IN METODE	17
3.1 CELIČNE LINIJE IN GOJENJE CELIC	17
3.2 PRIPRAVA RAZTOPIN MOLEKUL	17
3.2.1 Raztopina CaCl_2	17
3.2.2 Raztopina bleomicina	17
3.3 ELEKTROPORACIJA V PRISOTNOSTI RAZTOPINE CaCl_2 IN VITRO	17
3.3.1 Test citotoksičnosti	18
3.3.2 Določanje znotrajcelične koncentracije ATP	19
3.3.3 Barvanje po Giemsi	19
3.4 TEST NASTANKA KAPILARAM PODOBNIH STRUKTUR ENDOTELIJSKIH CELIC	20
3.5 TEST CELJENJA RANE	21
3.6 STATISTIČNA ANALIZA REZULTATOV	22

4	REZULTATI	23
4.1	CITOTOKSIČNI UČINEK ELEKTROPORACIJE CELIC V KOMBINACIJI Z RAZTOPINO CaCl_2	23
4.2	UČINEK ELEKTROPORACIJE V KOMBINACIJI Z RAZTOPINO CaCl_2 NA ZNOTRAJCELIČNO KONCENTRACIJO ATP	25
4.3	DOLOČEVANJE TIPA CELIČNE SMRTI Z BARVANJEM PO GIEMSI	28
4.4	UČINEK ELEKTROPORACIJE V KOMBINACIJI Z RAZTOPINO CaCl_2 NA SPOSOBNOST TVORBE KAPILARAM PODOBNIH STRUKTUR ENDOTELIJSKIH CELIC	32
4.5	UČINEK NA SPOSOBNOST MIGRACIJE CELIC PO ELEKTROPORACIJI V KOMBINACIJI Z RAZTOPINO CaCl_2	33
5	RAZPRAVA	38
5.1	TEST CITOTOKSIČNOSTI	39
5.2	KONCENTRACIJA ZNOTRAJCELIČNEGA ATP	40
5.3	DOLOČEVANJE TIPA CELIČNE SMRTI	40
5.4	ANTIANGIOGENI UČINEK NA ENDOTELIJSKE CELICE	41
5.5	UČINEK NA MIGRACIJO TUMORSKIH IN NORMALNIH CELIC	42
6	SKLEPI	43
7	POVZETEK	44
7.1	POVZETEK	44
7.2	SUMMARY	46
8	VIRI	48

ZAHVALA

KAZALO SLIK

Sl. 1:	Značilnosti rakavih celic	4
Sl. 2:	Celice tumorskega mikrookolja	6
Sl. 3:	Shematski prikaz klasičnega angiogenega preklopa	8
Sl. 4:	Večstopenjski proces metastaziranja	9
Sl. 5:	Shema modela tvorbe vodnih por med elektroporacijo	12
Sl. 6:	Osnovni koncept elektrokemoterapije	13
Sl. 7:	Nekatere znotrajcelične tarče, vpletene v citotoksičnost posredovano s Ca^{2+}	15
Sl. 8:	Shematski prikaz usode celice glede na naravo dražljaja	15
Sl. 9:	μ -Slide Angiogenesis ploščica za spremljanje angiogeneze	20
Sl. 10:	Test celjenja rane	21
Sl. 11:	Test citotoksičnosti za celično linijo B16F1	24
Sl. 12:	Test citotoksičnosti za celično linijo FaDu	24
Sl. 13:	Test citotoksičnosti za celično linijo HUVEC	25
Sl. 14:	Test citotoksičnosti za celično linijo CHO	25
Sl. 15:	Delež znotrajceličnega ATP pri celični liniji B16F1	26
Sl. 16:	Delež znotrajceličnega ATP pri celični liniji FaDu.	27
Sl. 17:	Delež znotrajceličnega ATP pri celični liniji HUVEC	27
Sl. 18:	Delež znotrajceličnega ATP pri celični liniji CHO	28
Sl. 19:	Celice B16F1 barvane po Giemsi	29
Sl. 20:	Celice FaDu barvane po Giemsi	30
Sl. 21:	Celice HUVEC barvane po Giemsi	31
Sl. 22:	Celice CHO barvane po Giemsi	32
Sl. 23:	Sposobnost tvorjenja kapilaram podobnih struktur HUVEC celic	33
Sl. 24:	B16F1 celice med optimizacijo testa celjenja »rane«	34
Sl. 25:	Migracija celic FaDu	34
Sl. 26:	Stopnja migracije celic FaDu	35
Sl. 27:	Migracija celic HUVEC	35
Sl. 28:	Stopnja migracije celic HUVEC	36
Sl. 29:	Migracija celic CHO	36
Sl. 30:	Stopnja migracije celic CHO	37

KAZALO PREGLEDNIC

Pregl. 1:	IC_{50} koncentracije CaCl_2 in bleomicina za posamezne celične linije	23
-----------	--	----

SEZNAM OKRAJŠAV IN SIMBOLOV

AIF	inducirajoči dejavnik apoptoze
ANOVA	analiza variance (ang. analysis of variance)
B16F1	celična linija mišjega melanoma z nizkim metastatskim potencialom
CHO	celična linija ovarijskih celic kitajskega hrčka
EP	elektroporacija (ang. electroporation)
ER	endoplazemski retikel
FaDu	humane celice ploščatoceličnega karcinoma ustnega žrela
FBS	fetalni goveji serum (ang. Fetal Bovine Serum)
HUVEC	endotelijske celice iz človeške popkovnične vene (ang. Human Umbilical Vein Endothelial Cell)
PBS	fosfatni pufer (ang. Phosphate Buffered Saline)
TNF-α	dejavnik tumorske nekroze alfa

SLOVARČEK

Adhezija	Povezava med celicami s celičnimi adhezijskimi molekulami ali med celicami in zunajceličnim matriksom.
Angiogeneza	Nastanek novega žilja iz že obstoječega.
Apoptoza	Vrsta programirane celične smrti, za katero je potrebna energija in jo označuje krčenje celice, fragmentacija citoplazme in jedra, nastanek apoptotskih telesc ter razgradnja v fagocitih.
Citotoksičnost	Strupenost za celice.
Ekstravazacija	Izstop celic iz žilja.
Elektrokemoterapija	Kombinacija elektroporacije in kemoterapije.
Elektroporacija	Fizikalna metoda, pri kateri celice izpostavimo zunanemu električnemu polju, s čimer začasno ali trajno povečamo prepustnost membran.
IC ₅₀	Koncentracija, pri kateri odmrje 50 % celic.
Invazija	Potovanje celic skozi zunajcelični matriks in encimska razgradnja bariere.
<i>In vitro</i>	V umetnem okolju.
<i>In vivo</i>	V živem organizmu.
Intravazacija	Vstopanje celic v žilje.
Karcinogeneza	Nastanek in razvoj maligne novotvorbe.
Metastaza	Skupek rakavih celic, ki se razširi iz prvotnega žarišča na drugo mesto v telesu in povzroči isto bolezen.
Migracija celic	Selitev, premik celic iz enega mesta na drugo, večinoma v odziv na določen kemijski signal.
Morfologija	Veda o zgradbi in obliki celic, tkiv, organov in organizmov.
Nekroza	Vrsta celične smrti, patološko odmrtnje celic, ki privede do vnetja.
Onkogen	Gen, katerega aktivnost ali izraženost je močno povečana v rakavih celicah. Spodbuja proliferacijo in druge značilnosti rakavih celic.
Rak	Skupina bolezni, za katere je značilna nekontrolirana proliferacija, invazija in zasevanja celic v druga tkiva.
Tumor	Novotvorba, ki je posledica nenormalne, nekontrolirane, navadno lokalne patološke rasti tkiva. Skupno ime za benigne in maligne tumorje (rak).
Tumorsko mikrookolje	Celično okolje, ki obdaja tumorske celice in v katerem najdemo stromalne celice, ki vplivajo na rast in napredovanje tumorjev.
Tumor supresorski gen	Gen, katerega produkt zavira proliferacijo celic in sproži apoptozo.

1 UVOD

Elektroporacija je fizikalna metoda, pri kateri celice izpostavimo električnim pulzom, s čimer začasno povečamo prepustnost celičnih membran, v katerih pride do strukturnih sprememb, ki omogočajo vstop molekul in ionov, za katere je membrana sicer neprepustna. Na ta način lahko v celice vnesemo različne učinkovine, med katerimi so tudi nekatere protitumorne učinkovine, ki zaradi svojih kemijskih lastnosti ne morejo vstopati v celice ali pa to poteka izredno počasi. Protitumornim učinkovinam je skupno, da delujejo nespecifično na celoten organizem in imajo pogoste neželene stranske učinke, zato je njihova uporaba v kombinaciji z elektroporacijo (elektrokemoterapija), ki lokalno poveča količino zdravila v tumorju, vse bolj uveljavljana za zdravljenje različnih tumorjev v klinični praksi (Campana in sod., 2016; Miklavčič in sod., 2012). V zadnjih predkliničnih raziskavah na celičnih kulturah, sferoidih in mišjih tumorskih modelih so ugotovili, da ima tudi elektroporacija v kombinaciji z raztopino CaCl_2 podobne učinke kot elektrokemoterapija (Frandsen in sod., 2012). Ca^{2+} je namreč pomemben sekundarni sporočevalec, ki je vpleten v številne celične procese, vključno z uravnavanjem transkripcije, metabolizmom, delitvijo celic in celično smrtjo (apoptoza, nekroza). Njegova koncentracija in distribucija sta zato v celicah natančno uravnani. Za njegovo učinkovitost pri uravnavanju aktivnosti citosolnih encimov in celičnih funkcij je ključno vzdrževanje homeostaze Ca^{2+} , ki mora v citosolu biti nizka in stabilna (Cerella in sod., 2010). Z elektroporacijo celic v prisotnosti raztopine CaCl_2 se močno poveča citosolna koncentracija Ca^{2+} , kar lahko vodi v celično smrt preko aktivacije različnih mehanizmov (Zielichowska in sod., 2016). Lokalna elektroporacija v kombinaciji z raztopino CaCl_2 nudi nekatere prednosti pred drugimi zdravili, ki se uporabljajo v kombinaciji z elektroporacijo, zaradi cenovne ugodnosti in dostopnosti CaCl_2 , prav tako ta ni toksičen za organizem, zato ni potrebna posebna previdnost pri rokovanju z njim, kot je to potrebno pri protitumornih učinkovinah. Kljub osnovnim spoznanjem o protitumornem delovanju Ca^{2+} , moramo opraviti nove raziskave, da bi ugotovili učinek elektroporacije v kombinaciji z raztopino CaCl_2 tako na tumorske kakor tudi na normalne celice.

1.1 NAMEN

Namen magistrskega dela je bil ugotoviti, če je kombinacija elektroporacije in raztopine CaCl_2 citotoksična za izbrane tumorske in normalne celične linije *in vitro*, ter te učinke primerjati z elektrokemoterapijo z bleomicinom. Ugotoviti smo želeli tudi učinek na sposobnost migracije teh celic in sposobnost nastanka kapilaram podobnih struktur endotelijskih celic. Endotelijske celice so sestavni del tumorske strome in so pomembne pri razvoju raka in njegovem napredovanju, zato smo jih vključili v našo raziskavo.

1.2 HIPOTEZE

1. Kombinacija elektroporacije in raztopine CaCl_2 zmanjša preživetje tumorskih in normalnih celic *in vitro*.
2. Kombinacija elektroporacije in raztopine CaCl_2 zmanjša sposobnost migracije tumorskih in normalnih celic *in vitro*.
3. Kombinacija elektroporacije in raztopine CaCl_2 zmanjša sposobnost nastanka kapilaram podobnih struktur endotelijskih celic *in vitro*.

2 PREGLED OBJAV

2.1 RAK

Rak je eden od vodilnih vzrokov smrti v globalnem merilu, predvsem na račun staranja prebivalstva. Različne vrste raka so različne bolezni, ki imajo značilen nastanek in potek, razlikujejo pa se v incidenci glede na starost, spol in druge rizične faktorje ter preživetju. V Sloveniji se ogroženost zbolevanja za rakom zmerno povečuje, največja je v starejših letih (po 65. letu starosti). Najpogostejše vrste raka pri nas so kožni rak, rak debelega črevesa in danke, prostate, pljuč in dojke. Te vrste raka so povezane tudi z nezdravim življenjskim slogom. Kljub večanju incidence, pa se manjša umrljivost za rakom, kar pomeni, da je zdravljenje bolj uspešno in vse več bolnikov ozdravi oziroma živi z rakom (Rak v Sloveniji 2011, 2015).

2.1.1 Vrste raka

Rak je skupina bolezni, za katere je značilna nekontrolirana delitev celic različnih tkiv in organov ter njihova invazija in migracija na druga mesta v telesu. Po teh lastnostih ločimo med benignimi in malignimi tumorji. Benigni tumorji so lokalne tvorbe, ki se ne razširijo v sosednja tkiva. Maligni tumorji pa imajo sposobnost invazije v podporni mezenhim in zasevanja (Pecorino, 2012). Benigni tumorji rastejo počasi in so histološko običajno grajeni iz dobro diferenciranih celic. Niso fiksirani na sosednja tkiva in so običajno obdani z vezivno ovojnico. Problem predstavljajo predvsem zaradi anatomske lokacije in kompresije na sosednje anatomske strukture ter v primeru izločanja biološko aktivnih substanc. Razgradnja in izguba vezivne ovojnice, ki obdaja tumor, je običajno osnovna razlika med benignim in malignim tumorjem. Funkcionalne spremembe v neoplastičnih celicah imajo za posledico nastanek in izločanje aktivnih substanc, kot so rastni faktorji, hormoni, litični encimi itn. Proteolitični encimi (kolagenaze, nekateri katepsini) omogočijo povečano mobilnost in razširjanje rakavih celic. Rast tumorja je odvisna od njegove ožiljenosti. Maligni tumorji so fiksirani na sosednje strukture, rastejo hitro, so slabo diferencirani. Izločajo substance, ki stimulirajo nastanek novih žil (angiogenezo). V končni fazi razvoja malignega tumorja pride do njegove invazije v sosednja tkiva in zasevanja (Baba in Căttoi, 2007). Med razvojem čvrstega tumorja so opazne štiri značilne stopnje: hiperplazija (opazna skoraj normalna histologija, celice so normalne, vendar je povečana stopnja celične proliferacije), displazija (celice niso več normalne in pravilno organizirane, zelo visoka stopnja celičnih delitev), polip ali adenom (še vedno benigna stopnja) in rak (maligna stopnja – invazija v sosednja tkiva in tvorba metastaz) (Weinberg, 2014).

Na podlagi izvornega tkiva delimo rakave bolezni v štiri velike skupine (SLORA, 2016):

- Karcinomi izvirajo iz epiteljskih celic, v to skupino uvrščamo kar 80 % rakavih obolenj.
- Sarkomi izvirajo iz celic opornih tkiv, pojavljajo se predvsem v vezivnem, maščobnem, kostnem in hrustančnem tkivu.
- Levkemije izvirajo iz krvnih celic ali celic krvotvornih organov.
- Limfomi so rakava obolenja limfatičnega sistema.

Klonalna ekspanzija je splošno sprejet model razvoja tumorja, ki pravi, da so vse tumorske celice potomke ene same začetne celice, vendar pa se v tumorju nahaja genetsko

heterogena populacija tumorskih celic, ki nastane zaradi genomske nestabilnosti tumorskih celic in s tem še večje podvrženosti novim mutacijam ter razlik v epigenetskih modifikacijah (Weinberg, 2014).

2.1.2 Karcinogeneza

Nastanek raka ali karcinogeneza je večstopenjski proces, pri katerem pride do maligne transformacije celic in v končni fazi do tvorbe zasevkov v drugih delih telesa. Ta proces poteka pod vplivom karcinogenih dejavnikov, ki povzročajo mutacije. V zaporedjih DNA (deoksiribonukleinska kislina) tumorskih celic najdemo veliko število sprememb, od točkovnih mutacij do obsežnih kromosomskih aberacij, kot so delecije in kromosomske translokacije, ki se skozi čas akumulirajo v celici. Rak je predvsem bolezen starejših ljudi, saj se s staranjem organizma te mutacije kopičijo, pojavnost raka pa s starostno dobo narašča (Pecorino, 2012).

Na nastanek raka torej vpliva izpostavljenost karcinogenim dejavnikom iz okolja (delimo jih na kemične, fizikalne in biološke dejavnike), pa tudi drugi dejavniki, kot so dedne mutacije, hormoni in ostali dejavniki, ki niso mutageni, temveč spodbujajo celično delitev in jim pravimo tumorski promotorji. Med fizikalne dejavnike uvrščamo ionizirajoče in ultravijolično sevanje, med kemičnimi dejavniki so pomembnejši aflatoksini, policiklični aromatski ogljikovodiki, aromatični amini, azo barvila, N-nitrozamini, karbamati, halogenirane spojine in alkilirajoči agensi. Med biološke dejavnike pa spadajo predvsem virusi (humani papiloma virus, Epstein-Barr virus, hepatitis B virus idr.) in nekateri mikroorganizmi (*Helicobacter pylori*, *Salmonella enterica*) (Weinberg, 2014).

V zdravem organizmu je delitev celic reguliran proces, celice se odzivajo na signale za delitev, diferenciacijo ali celično smrt. Med procesom nastanka rakave celice različni karcinogeni dejavniki postopoma spreminjajo lastnosti celic, tako da te postajajo manj odzivne na te signale. DNA popravljalni mehanizmi so pomembna obramba celic proti mutacijam. V primeru obsežnih mutacij se aktivirajo signalne poti, ki vodijo v celično smrt. Vse spremembe v DNA, ki niso popravljene pred naslednjo celično delitvijo, se prenesejo na hčerinske celice in se tako ohranijo, kar prispeva h karcinogenezi. Gene, ki so največkrat vpleteni v nastanek raka, lahko razdelimo v dve skupini: protoonkogeni v normalnih celicah spodbujajo celične delitve (v malignih celicah so mutirani v onkogene) in so pod nadzorom druge skupine, tumor supresorskih genov, ki zavirajo delitev celic. V kolikor pride do mutacije v enem izmed alelov protoonkogenega v onkogen, je lahko posledica izguba sposobnosti odzivanja na regulatorne zaviralne signale in spodbujanje k celični delitvi, mutacija pa je dominantna. Produkti onkogenov so v tumorskih celicah pogosto močno izraženi ali imajo povišano aktivnost, to so rastni faktorji, receptorji rastnih faktorjev, prenašalci signalov, ki so vpleteni v signalne poti celične proliferacije in izogibanja celični smrti. Posledica mutacije obeh alelov (recesivna mutacija) tumor supresorskih genov je izguba funkcije teh genov, katerih produkti v normalni celici inhibirajo celični cikel, spodbujajo diferenciacijo ali sprožijo celično smrt. Tudi mutacije v regijah DNA, ki kodirajo mikro-RNA (miRNA), so lahko eden izmed dejavnikov karcinogeneze. Molekule miRNA so kratke dvoverižne RNA molekule, ki na posttranskripcijskem nivoju uravnavajo izražanje proteinov. Mutacija miRNA, ki je vpletena v regulacijo izražanja nekega tumor supresorskega gena ali onkogenega, lahko tako tudi prispeva k maligni transformaciji celic (Pecorino, 2012; Weinberg, 2014).

2.1.2.1 Lastnosti rakavih celic

V normalnih celicah in tkivih sta proliferacija in diferenciacija celic kontrolirana procesa, stimulacija in inhibicija celične proliferacije sta natančno regulirana. Celica na poti transformacije iz normalne v maligno postopoma pridobiva določene funkcionalne lastnosti, kar sta v svojem prvem modelu leta 2000 predstavila Hanahan in Weinberg (Hanahan in Weinberg, 2000):

- samozadostnost v proizvodnji rastnih signalov,
- neobčutljivost na zaviralce rasti,
- omogočanje reprodukcijske nesmrtnosti,
- aktivacija invazije in metastaziranja,
- indukcija angiogeneze,
- upiranje celični smrti.

Ista avtorja sta leta 2011 (Hanahan in Weinberg, 2011) model nadgradila z naslednjimi lastnostmi:

- genomska nestabilnost in mutacije,
- deregulacija celičnega metabolizma,
- izogibanje imunskemu sistemu,
- vnetje, povezano s tumorji (Slika 1).



Slika 1: Značilnosti rakavih celic (Hanahan in Weinberg, 2011: 668).

Te funkcionalne lastnosti se med različnimi tipi raka razlikujejo, prav tako ni določeno samo zaporedje njihovega pridobivanja. K maligni transformaciji celic poleg mutacij pomembno prispevajo tudi epigenetske spremembe, ne samo v rakavih celic, pač pa tudi v celicah, ki so prisotne v tumorskem mikrookolju, in njihova medsebojna komunikacija (Hanahan in Weinberg, 2011). Rakave celice imajo v primerjavi z normalnimi navadno tudi drugačne morfološke značilnosti. Značilne so spremembe v jedru (aneuploidija), ki je

večje, z veliko evkromatina in nepravilne oblike, citoplazemski del celice pa je bolj skromen. Maligne celice imajo visoke potrebe po energiji, značilne so spremembe v produkciji encimov in spremembe v citoskeletu – spremenjena oblika, adhezija in mobilnost (Weinberg, 2014; Baba in Côtai, 2007).

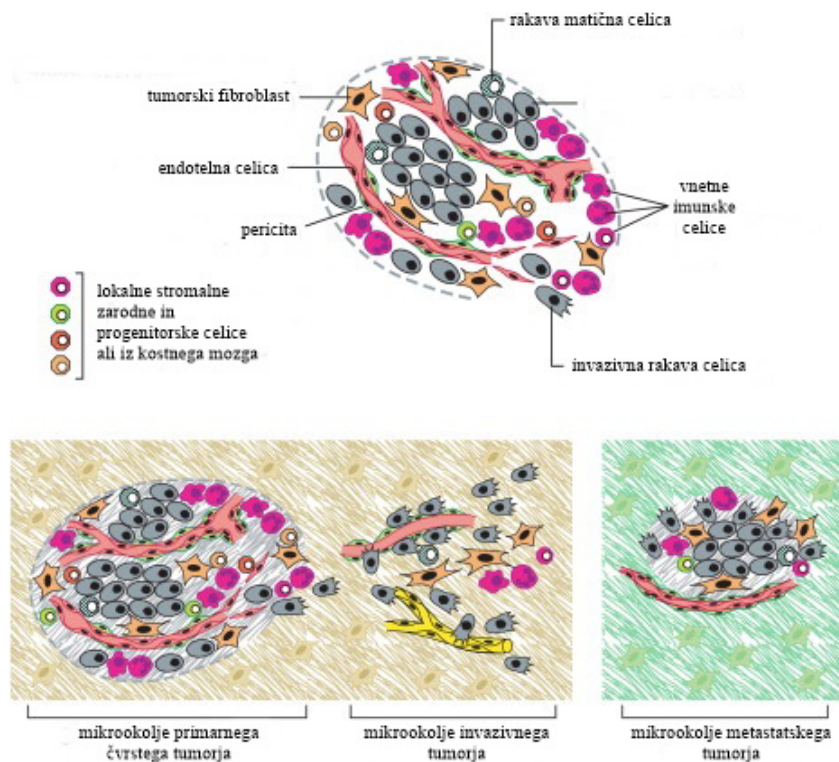
V naslednjih podpoglavjih podrobneje opisujemo in razlagamo nekatere lastnosti rakavih celic in tumorjev, na katere smo v magistrskem delu želeli preveriti učinek terapije.

2.1.3 Neodzivnost na apoptotske signale

Programirana celična smrt ali apoptoza je proces, ki ima pomembno vlogo v razvoju in vzdrževanju tkivne homeostaze z odstranjevanjem nepotrebnih ali poškodovanih celic. Apoptoza se sproži pod vplivom različnih zunanjih in notranjih signalov in je v celicah močno nadzorovan proces. Sproži se lahko zaradi nepopravljivih poškodb DNA in celična vsebina se razgradi preko aktivacije kaspaz. Mehanizem apoptoze uravnavajo proapoptotični in antiapoptotični geni, ki so v večini rakavih celic okvarjeni, pomemben regulator tako proapoptotičnih kot antiapoptotičnih dejavnikov pa je Ca^{2+} , ki lahko torej sproži ali inhibira apoptozo. Proapoptotični dejavniki večinoma uravnavajo sproščanje citokroma c iz mitohondrijev, ki v citoplazmi kot del apoptosoma (multiproteinski kompleks) aktivira kaspaze. Med proapoptotične proteine spadajo Bax, Bak, Bid, Bim in p53, med antiapoptotične pa Bcl-2, Bcl-X_L, Bcl-w. Celica postane med maligno transformacijo neodzivna na te signale, s čimer se mutacija prenese na hčerinske celice. Posledično lahko pride tudi do neobčutljivosti na radioterapijo in kemoterapijo (Giorgi in sod., 2008; Novaković in sod., 2009).

2.1.4 Tumorsko mikrookolje

Tumorji so izredno kompleksne strukture, ki oddajajo in sprejemajo signale od celic, ki jih obdajajo – to imenujemo tumorsko mikrookolje ali tumorska stroma (vključuje fibroblaste, endotelijske celice, pericite in imunske celice) (Slika 2). Proces metastaziranja rakavih celic vključuje več stopenj, in sicer invazijo, intravazacijo, transport, ekstravazacijo in v končni fazi metastatsko kolonizacijo. Interakcije med tumorskimi celicami in mikrookoljem imajo pomemben vpliv na metastatsko aktivnost posameznih rakavih celic. Rakave celice lahko izločajo rastne faktorje, citokine, kemokine, ki privabljajo imunske celice, te pa nato inducirajo vnetni odziv in z izločanjem $\text{TNF-}\alpha$ (dejavnik tumorske nekroze α) ter prostaglandinov stimulirajo delitev sosednjih epitelijskih celic in sprožijo angiogenezo. V normalnih tkivih stromalne in epitelijske celice sodelujejo pri izdelovanju specializiranega ekstracelularnega matriksa, bazalne membrane. Endotelijske celice tvorijo stene kapilar in večjih žil, pa tudi limfatičnih vodov. Med nastankom novih žil izločajo rastne faktorje, ki stimulirajo proliferacijo sosednjih celičnih tipov in privabljajo pericite ter celice gladkih mišic, te pa zopet izločajo pomembne preživitvene signale za endotelijske celice. Celice tumorske strome so torej pomembne pri razvoju raka, saj morajo tudi tiste rakave celice, ki uspejo zapustiti primarni tumor in tvoriti nove metastaze na drugih lokacijah, običajno privabiti stromalne celice in stimulirati njihovo proliferacijo ali pa se vgnezditi v obstoječo stromo tkiva, v katerem pristanejo. Različne vrste rakov običajno zasevajo na specifičnih lokacijah, kar lahko razložimo z anatomskim vidikom (glede na tok krvi) ali pa ujemanjem tumorskih celic s sprejemnim okoljem oziroma tkivom (Pecorino, 2012; Weinberg, 2014).



Slika 2: Celice tumorskega mikrookolja. Zgoraj: sestava večine čvrstih tumorjev. Parenhim in stroma oba vsebujeta različne celične tipe in podtipe, ki skupaj omogočajo rast tumorja in napredovanje. Spodaj: različna mikrookolja tumorjev, ki se med napredovanjem tumorja spreminjajo (normalno okoliško tkivo je prikazano shematično) (Hanahan in Weinberg, 2011: 662).

2.1.5 Angiogeneza

Angiogeneza je proces nastanka novih kapilar iz že obstoječih krvnih žil z rastjo in migracijo endotelijskih celic, za kar so potrebne interakcije med različnimi vrstami celic, zunajceličnim matriksom ter citokini in rastnimi faktorji. Ta proces je pogost v času embriogeneze, v odraslem organizmu pa normalno poteka samo še pri celjenju ran, med vnetjem, pri ženskem reproduktivnem ciklu in med rastjo tumorjev. Da imajo celice dostop do zadostne količine kisika in hranil, morajo biti v razdalji med 100 – 200 μm od krvnih žil, kar je difuzijska meja kisika. Ključni stimulus za začetek angiogeneze je hipoksija. Celice se odzovejo na pomanjkanje kisika z izločanjem angiogenih signalov. Med brstenjem obstoječih zrelih krvnih žil je potrebna obsežna reorganizacija, ki vključuje njihovo destabilizacijo, proliferacijo in migracijo endotelijskih celic ter njihovo zorenje. Prvi korak pri nastanku je odpiranje obstoječih kapilar in delna razgradnja ekstracelularnega matriksa, kar omogoča migracijo endotelijskih celic skozi bazalno membrano. Temu sledi vaskularna faza, med katero se celice povezujejo v cevaste strukture, iz katerih nastanejo nove žile in je omogočena nadaljnja rast tumorja (Slika 3) (Chung in sod., 2010; Pecorino, 2012).

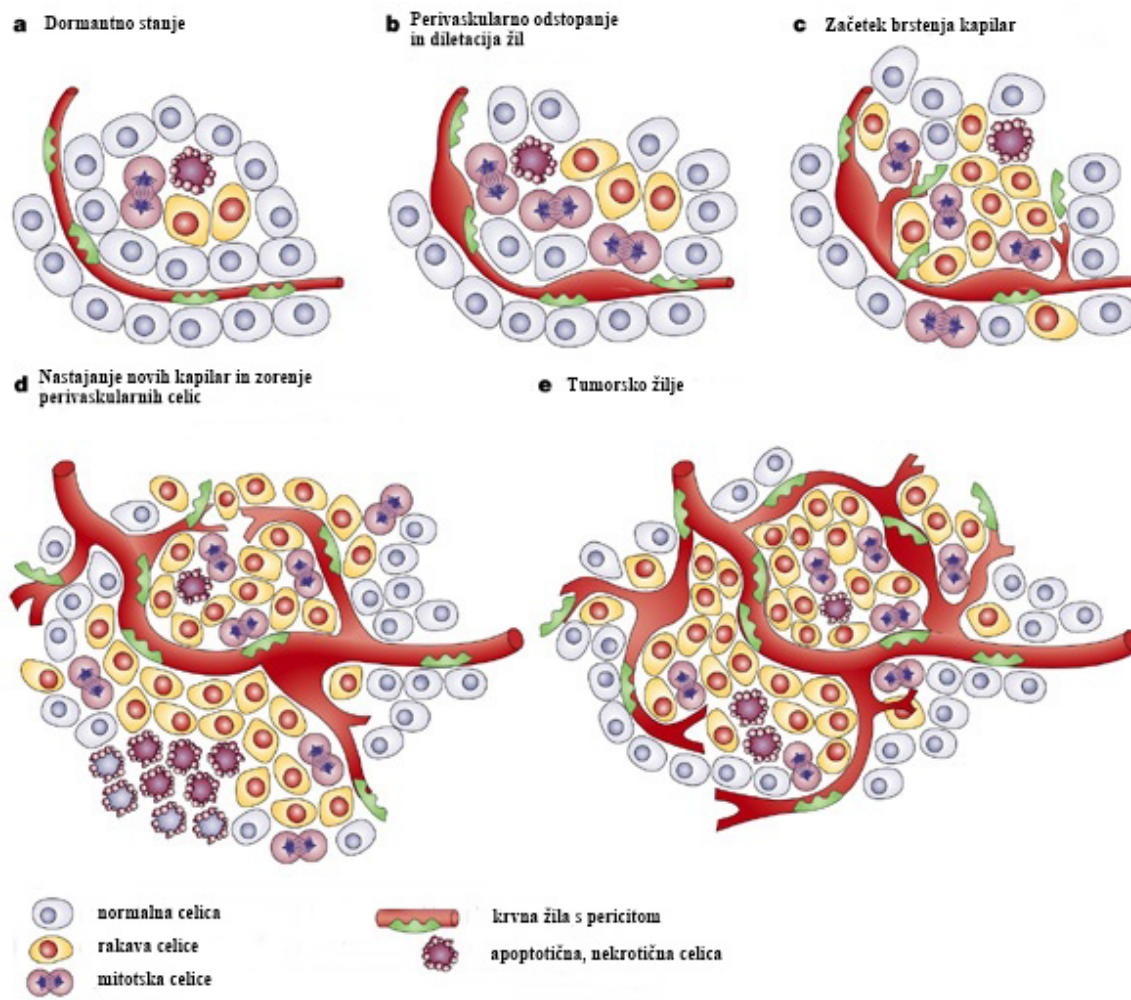
Regulacija angiogeneze je odvisna od dinamičnega ravnotežja angiogenih aktivatorjev in inhibitorjev. Za preklap tumorskega t.i. »angiogenega stikala« je potrebna sprememba razmerja v prid angiogenih aktivatorjev, ki je posledica fiziološkega dražljaja, kot je

hipoksija (zaradi povečane mase tkiva) (Dor in sod., 2001), aktivacija onkogen ali mutacija tumor supresorskega gena (Kerbel in Folkman, 2002).

2.1.5.1 Tumorsko žilje

Med normalnim procesom angiogeneze na novo formirane žile hitro dozori in postanejo stabilne. Za tumorsko angiogenezo pa je značilno, da se izgubi nadzor nad pro- in antiangiogenimi signali, zato je omogočena stalna rast novih krvnih žil. Posledično se tumorsko žilje precej razlikuje od normalnega, saj je neorganizirano in ima nekonvencionalno hierarhijo, kjer so arteriole, venule in kapilare težko določljive. Tumorske žile so nezrele, zavite in hiperpermeabilne. Prav tako so neenakomerno oblikovane z nestalnim premerom in slepimi konci, pogosto so močno prepustne in hemoragične, deloma zaradi prevelike ekspresije VEGF (vaskularni endotelijski rastni faktor). Perivaskularne celice so navadno manj pogoste in bolj ohlapno povezane z endotelijskimi celicami kot v normalnem žilju, manj je tudi celic gladkega mišičja, zaradi česar so žile še bolj prepustne. V tumorjih je tudi slabši pretok krvi, zato zaradi vseh omenjenih lastnosti pride do pojava hipoksičnih in zakisanih predelov. Hipoksija je povezana z aktivacijo proangiogenih faktorjev in posledično povečevanjem mase tumorja (Bergers in Benjamin, 2003; Siemann, 2011).

Migracija endotelijskih celic je ključnega pomena za angiogenezo. Glavni citoskeletni element endotelijskih celic je aktin. Sestavljen je iz monomernih globularnih podenot (G-aktin), ki polimerizirajo v filamente (F-aktin). Polimerizacija je tesno povezana s hidrolizo ATP preko intrinzične ATPazne aktivnosti. Za migracijo celic je ključnega pomena konstantno preoblikovanje aktinskih filamentov, značilne so dinamične in koordinirane spremembe v celični adheziji, signalni transdukciji in citoskeletni dinamiki in organizaciji (Lamallice in sod., 2007).

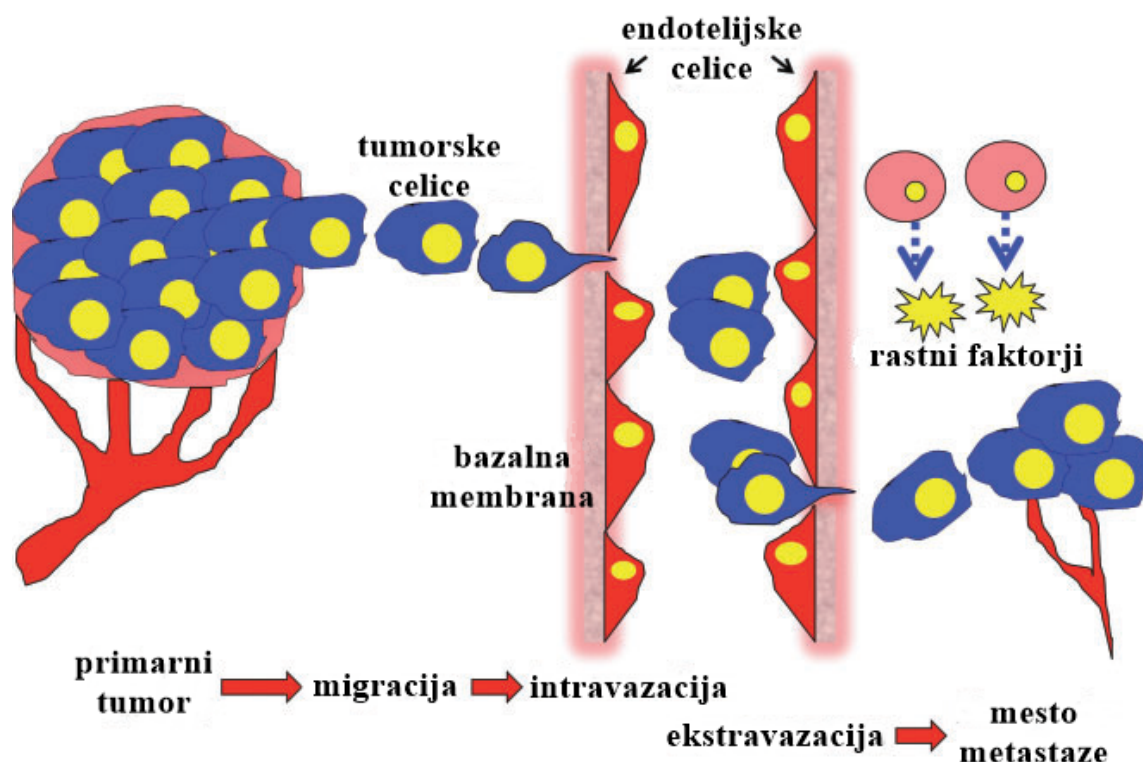


Slika 3: Shematski prikaz klasičnega angiogenega preklopa, ki se lahko zgodi v različnih stopnjah napredovanja tumorja, kar je odvisno od narave tumorja in njegovega mikrookolja. Večina tumorjev začne rasti v obliki dormantnih neožiljenih nodululov (Bergers in Benjamin 2003: 403).

2.1.6 Migracija celic in metastaziranje

Metastaziranje je kompleksen proces, med katerim se tumorske celice iz primarnega tumorja razširijo na oddaljene organe, kar je najbolj pogost vzrok smrti pacientov z rakom (Yamaguchi in sod., 2005). Ključna dražljaja, ki vzpodbudita tumorske celice k metastaziranju, sta hipoksija v primarnem tumorju in vnetje, pomembno pa je tudi mikrookolje na sekundarnem mestu za nadaljnjo delitev (Langley in Fidler, 2011).

Metastatsko razširjanje tumorskih celic je močno selektiven večstopenjski proces, med katerim mora tumorska celica skozi sledeče faze: 1) odcepitev od primarnega tumorja, 2) celična migracija in invazija, 3) intravazacija (vstop v žilje) in transport skozi krvni ali limfni obtok, 4) ekstravazacija in 5) rast sekundarnega tumorja (Slika 4). Med tem procesom celičnega gibanja in sprememb oblike celic so potrebne dramatične spremembe reorganizacije celičnega citoskeleta (Fife in sod., 2014).



Slika 4: Večstopenski proces metastaziranja (Fife in sod., 2014: 5508).

2.2 TERAPEVTSKI PRISTOPI V ONKOLOGIJI

Pristope k zdravljenju raka razvrščamo glede na vrsto zdravljenja, princip uporabe in delovanja ter po načelih kombinirane terapije, pa tudi glede same oblike raka. Vsi pristopi temeljijo na odstranitvi ali uničenju tumorskega tkiva. Pri vseh vrstah zdravljenja pa je potrebno temeljito preučiti delovanja na zdrava tkiva in ugotoviti terapevtski indeks, ki nam pove, koliko specifično je določeno zdravljenje za tumor in razmerje med poškodbami tumorja ter zdravega tkiva (Pecorino, 2012).

Glede na delovanje ločimo lokalno in sistemsko zdravljenje. Lokalno zdravljenje je uspešno pri zgodnjih stadijih bolezni, sistemsko ter kombinacija sistema in lokalnega zdravljenja pa se uporabljata pri napredovali in sistemski bolezni. Glede na principe uporabe ločimo kurativno in paliativno zdravljenje (Novaković in sod., 2009).

Glede na vrsto zdravljenja so v uporabi kirurgija, radioterapija, kemoterapija, hormonska terapija, tarčna zdravila ter genska terapija (Novaković in sod., 2009).

2.2.1 Kirurgija

Za zdravljenje raka je najbolj pogosto kirurško zdravljenje. Je terapija izbora za zdravljenje čvrstih tumorjev in je uspešna predvsem pri majhnih tumorjih, ki še niso v fazi invazije in metastaziranja. Pri odstranitvi večjih tumorjev pa je potrebno dodatno kombinirano zdravljenje z obsevanjem ali kemoterapijo, zaradi verjetnosti prisotnosti metastaz (Novaković in sod., 2009).

2.2.2 Radioterapija/obsevanje

Radioterapija je lokalni pristop zdravljenja raka, učinek je omejen izključno na mesto absorpcije ionizirajočega sevanja, ki poškoduje biološke makromolekule v procesu ionizacije. Preživetje celice je odvisno od vrsta in števila poškodb v DNA in uspešnosti popravljalnih mehanizmov. Učinki sevanja so lahko neposredni z nastankom dvojnih prelomov DNA ali posredni zaradi nastanka prostih radikalov. Le določen volumen tkiva izpostavimo sevanju, da okoliško tkivo ostane čim manj poškodovano. Tudi pri tem pristopu je za večjo uspešnost zdravljenja v uporabi kombinirana terapija s kirurgijo in sistemskim zdravljenjem (Novaković in sod., 2009).

2.2.3. Kemoterapija

Pri konvencionalni kemoterapiji so v uporabi kemikalije, ki vplivajo na DNA, RNA in proteine. Cilj terapije je povzročiti hude poškodbe DNA in sprožitev apoptoze v hitro delečih rakavih celicah. Kemoterapevtikom je skupno, da vplivajo na celoten organizem, saj prekinejo celični cikel v vseh hitro delečih celicah, vključno z normalnimi, kar ima za posledico pogoste stranske učinke. Zdravljenje se zato navadno izvaja s prekinitvami, da se normalna tkiva vmes regenerirajo (Pecorino, 2012), odmerek je potrebno ponoviti tudi za nadaljnje zmanjševanje števila rakavih celic, ki so preživele. V uporabi so naravni ali sintetični produkti, ki imajo citotoksičen učinek. Glede na način delovanja kemoterapevtikov (citostatikov) poznamo alkilante, antimetabolite, antibiotike s protitumornim delovanjem, zaviralce delitvenega vretena in inhibitorje topoizomeraz. Velikokrat se uporablja kombinacija različnih citostatikov z različnimi tarčami delovanja. Zaradi nespecifičnosti delovanja je potrebno strogo nadzorovano odmerjanje in prilagajanje doze (Novaković in sod., 2009).

2.2.4 Hormonska terapija

Hormonska terapija se uporablja za sistemsko zdravljenje hormonsko odvisnih rakov, kot sta rak dojke in rak prostate. Hormoni in antagonisti lahko delujejo na tumorske celice neposredno ali posredno prek vpliva na delovanje drugih celic v organizmu. Največkrat gre za uravnavanje izražanja genov različnih rastnih dejavnikov, preprečevanje nastajanja, izločanja ali aktivnosti hormonov. V uporabi so androgeni, antiandrogeni, kortikosteroidi, estrogeni, progestini, antiestrogeni, inhibitorji aromataz, analogi hipotalamičnih hormonov, hormoni ščitnice, analog somatostatina (Novaković in sod., 2009).

2.2.5 Tarčna zdravila

Med tarčna zdravila uvrščamo zdravila, ki delujejo na specifične molekularne tarče v tumorski celici, ne pa v normalni celici, s čimer naj bi slednje ostale nepoškodovane. Med tarčnimi zdravili po mehanizmu delovanja ločimo monoklonska protitelesa in majhne molekule. Monoklonska protitelesa, ki so večinoma velika in vodotopna, največkrat ciljajo zunajcelične komponente, kot so vezavne domene receptorjev ali ligandi in s tem prekinejo določeno signalno pot. Male molekule vstopajo v celice in vplivajo na znotrajcelične tarče. Med tarčna zdravila spadajo tudi imunomodulatorji, ki povečujejo, spodbujajo, zavirajo ali kako drugače spreminjajo imunski odziv na raka (Gerber, 2008; Novaković in sod., 2009).

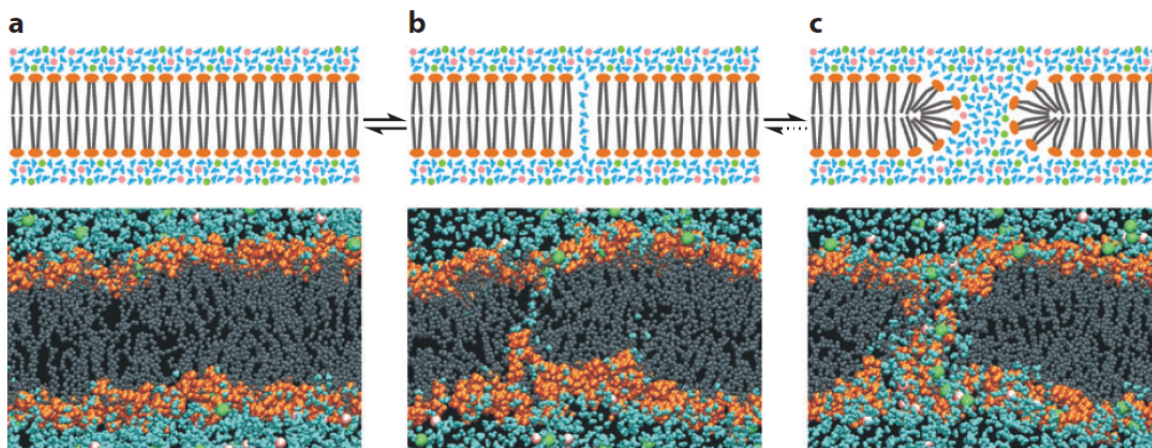
2.2.6 Genska terapija

Genska terapija je novejši pristop zdravljenja raka, ki jo lahko uvrščamo tudi med tarčne terapije. Z vnosom terapevtskega gena v tarčno tkivo poskušamo selektivno vplivati na tumorske celice. Navadno želimo sprožiti izražanje tumor supresorskih genov, utišati ekspresijo onkogenov, spodbuditi imunski odziv oziroma sprožiti imunogenost tarčnega tkiva, aktivirati delovanje encimov za nastanek citotoksičnih produktov, ki delujejo antiangiogeno ali onkolitično (Cross in Burmester, 2006).

2.3 ELEKTROPORACIJA

Membrane so pomemben sestavni element vseh celic, saj razmejujejo notranjost celic od zunanjega okolja, prav tako pa ločujejo različne predelke v sami celici. Celične membrane so sestavljene iz fosfolipidnega dvosloja, ki uravnava izmenjavo snovi z okoljem in so polprepustne, saj omogočajo prehod majhnim nepolarnim in zelo majhnim polarnim molekulam, medtem ko so neprepustne za večino večjih vodotopnih molekul in za vse ione. Za te snovi celice uporabljajo različne transportne proteine, kot so kanali in črpalke (Alberts, 2010). Učinkovitost številnih potencialnih kemoterapevtikov je tako omejena, ker ne morejo prosto prehajati v celice (Rabussay in sod., 2002).

Elektroporacija je fizikalna metoda, ki jo je prvi uporabil in opisal Neumann s sodelavci leta 1972 (Neumann in sod., 1982). Pri elektroporaciji celice izpostavimo zunanjemu pulzirajočemu električnemu polju visoke jakosti, s katerim presežemo kritično vrednost transmembranskega potenciala in s tem povečamo prepustnost celične membrane, s čimer lahko v celice vnesemo različne molekule, kot so različni proteini, DNA, RNA, barvila, zdravila in ioni, ki drugače skozi membrane ne prehajajo ali pa prehajajo izredno počasi. Do kakšnih strukturnih sprememb membrane pride med elektroporacijo še ni popolnoma znano, ena od verjetnih hipotez je nastanek vodnih por v membrani, skozi katere v celico vstopijo manjše molekule in ioni (Slika 5) (Yarmush in sod., 2014). Najverjetnejši mehanizem za vstop makromolekul, kot je DNA, je preko tvorbe agregatov DNA na površini celične membrane (Markelc in sod., 2015), ki vstopijo na strani katode s procesom endocitoze in preko endosomalnega prenosa potujejo do jedra (Rosazza in sod., 2016). Medtem ko DNA molekule tvorijo komplekse z membrano v obliki točk, siRNA vstopa v celico preko celotne stranice na strani katode in se hitro translocira do jedra (Chabot in sod., 2013). Elektroporacija je lahko reverzibilna ali ireverzibilna, kar je odvisno od izbranih vrednosti električnih pulzov (Kee in sod., 2011). Reverzibilno elektroporacijo uporabljamo za vnos molekul v celice, saj celice lahko po določenem času vzpostavijo prvotno stanje in ostanejo viabilne. Pri ireverzibilni elektroporaciji pride do obsežnih strukturnih sprememb v membrani in se poruši sposobnost vzdrževanja homeostaze celice, kar vodi v celično smrt (Kotnik in sod., 2012).



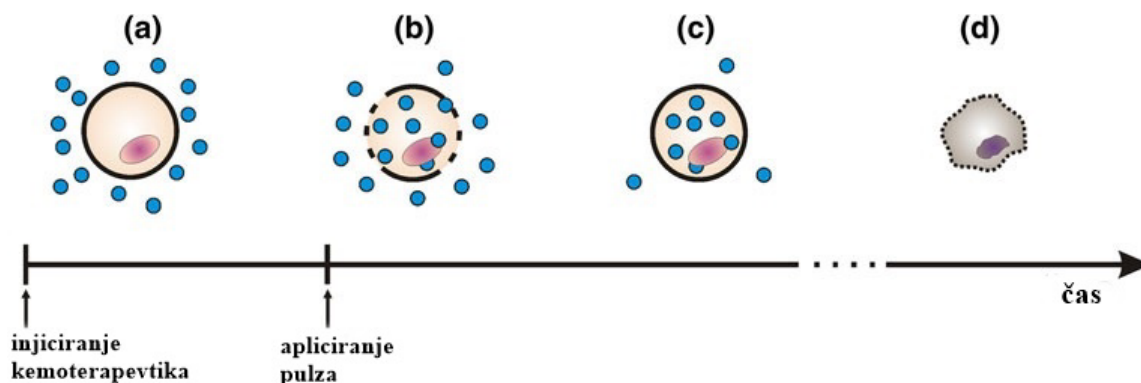
Slika 5: Shema modela nastanka por med elektroporacijo na molekularnem nivoju (zgoraj) in dinamična simulacija na atomskem nivoju (spodaj). (a) Nedotaknjen dvosloj, (b) vodne molekule vdrijo v dvosloj, (c) preusmeritev polarnih glav lipidov proti vodnim molekulam v dvosloju in stabilizacija pore (Yarmush in sod., 2014: 297).

Prednost uporabe reverzibilne elektroporacije kot transportnega mehanizma je v tem, da ni odvisen od prenašalnih mehanizmov celice in ga lahko uporabljamo pri vseh celičnih tipih ter v vseh fazah celičnega cikla, proces pa sam po sebi ni biološko in biokemično toksičen. Učinkovitost te metode je kljub temu precej odvisna od lastnosti celic. Pri majhnih celicah je za permeabilizacijo potrebno višje električno polje, celice z manj prevodno vsebino (npr. adipociti) so tudi manj dovzetne. V heterogenem tkivu se lahko prag, potreben za prenos, torej precej razlikuje. Kot pri vseh fizikalnih metodah pa pride do stranske škode, predvsem zaradi prehodne poškodbe membrane, ki v nekaterih primerih vodi v celično smrt (Hui, 2008). Po elektroporaciji lahko pride tudi do osmotskega nabrekanja celic, okrevanje elektroporiranih celic pa je odvisno od pulznih pogojev in tipa celic. Raziskava, ki so jo opravili Rabussay in sod. (2002), je pokazala, da so normalna tkiva pod istimi pulznimi pogoji manj dovzetna za poškodbe zaradi elektroporacije kot tumorska tkiva.

2.2.1 Elektrokemoterapija

Elektrokemoterapija je strategija lokalnega zdravljenja rakavih obolenj, pri kateri gre za kombinacijo kemoterapije in dovajanja visokonapetostnih električnih pulzov za povečanje prepustnosti celične membrane. Kemoterapija je namreč učinkovita samo v primeru, če lahko protitumorna učinkovina uspešno prehaja celično membrano (Slika 6) (Serša in sod., 2008). Elektroporacija protitumornih učinkovin je pokazala večkratno povečano terapevtsko učinkovitost v primerjavi z uporabo same učinkovine, saj je olajšano prehajanje učinkovine in s tem povečana citotoksičnost (Campana in sod., 2016). Prednost lokalizirane toksičnosti na elektroporirano tkivo je v zmanjšanju sistemskih neželenih stranskih učinkov in logaritemskem povečanju učinkovitosti protitumornih učinkovin. V klinični uporabi sta dve taki učinkovini, in sicer bleomicin (Tounekti in sod., 1993) ter cisplatin (Serša in sod., 2000). Bleomicin je ena od takih protitumornih učinkovin, ki je hidrofilna in slabo prehaja celično membrano, z uporabo elektroporacije pa je njegov učinek do 1000-krat večji. Bleomicin v celici deluje kot encim, ki povzroči obsežnejše prelome DNA vijačnice, in ima tako močan intrinzični citotoksični učinek (Miklavčič in sod., 2012). Z elektrokemoterapijo z bleomicinom lahko dosežemo selektivno uničenje

tumorskega tkiva z veliko manjšo škodo na okoliškem normalnem tkivu, kot pri sami kemoterapiji (Gehl, 2008).



Slika 6: Osnovni koncept elektrokemoterapije. (a) Injiciranju (intravenozno ali intratumorsko) protitumorne učinkovine sledi (b) lokalna aplikacija električnih pulzov, ki reverzibilno permeabilizirajo celično membrano, slabo prehodna tumorska učinkovina skozi pore vstopi v celico, (c) pore se zaprejo, kemoterapevtik ostane ujet v celici in (d) jo ubije (Miklavčič in sod., 2012: 1214).

2.3 VLOGA Ca^{2+} V CELICI

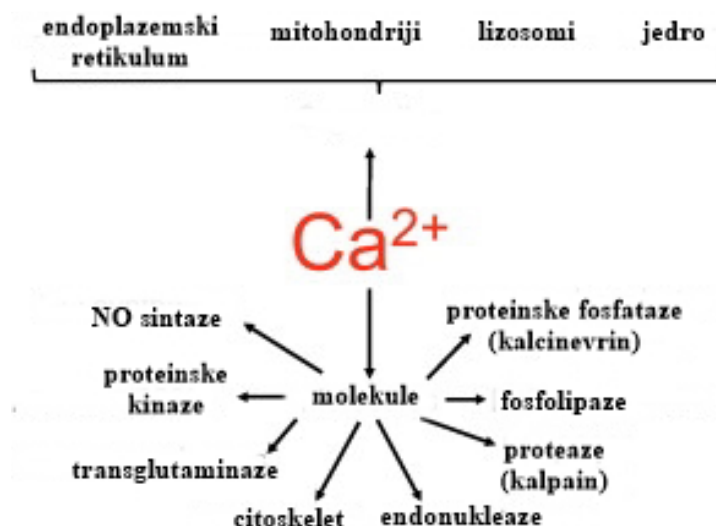
Ca^{2+} je univerzalen sekundarni sporočevalec, ki ga najdemo v vseh celicah in je vpleten v regulacijo številnih celičnih procesov (Giorgi in sod., 2008). Ca^{2+} ima v celici značilno distribucijo, v citosolu ga najdemo v zelo nizkih koncentracijah, in sicer okrog 100 nM, medtem ko je zunajcelična koncentracija 1 – 2 mM (Stewart in sod., 2015). Ta značilnost mu omogoča vlogo sporočevalca, ki regulira citosolne od Ca^{2+} odvisne encime in funkcije, ko se njegova lokalna koncentracija dvigne nad prag. V celici zato obstajajo številni mehanizmi, ki vzdržujejo nizko in stabilno citosolno koncentracijo Ca^{2+} . Ti mehanizmi vključujejo aktivnost transmembranskih transporterjev (kanalčki, prenašalci), ki prenašajo Ca^{2+} proti gradientu in visoko afinitetne Ca^{2+} vezavne proteine. Vsak dvig citosolne koncentracije Ca^{2+} nad 500 nM pomeni za celice stres in vključuje tudi sodelovanje mitohondrijev, ki kopičijo presežek Ca^{2+} v matriksu. Signalizacija tako poteka z lokalnimi prehodnimi dvigi koncentracije Ca^{2+} , ki nato vplivajo na številne celične funkcije, med drugim tudi na celični metabolizem, delitev, diferenciacijo, mobilnost in celično smrt (Cerella in sod., 2010). Do dviga znotrajcelične koncentracije Ca^{2+} lahko pride po dveh poteh: a) s sproščanjem iz znotrajceličnih zalog, večinoma iz endoplazemskega retikla, ali b) vstop Ca^{2+} iz zunajceličnega okolja preko odprtja membranskih Ca^{2+} kanalčkov, prenašalcev ter por. Ko Ca^{2+} aktivira svoje tarče, ga mora celica hitro odstraniti iz citosola oziroma spraviti njegovo citosolno koncentracijo na osnovno raven, tako da ga izčrpa iz celice ali tako da ga ponovno shrani v znotrajcelične rezervoarje (endoplazemski retikel (ER) in mitohondrije) (Patergnani in sod., 2011).

2.3.1 Ca^{2+} in celična smrt

Ca^{2+} ima v rakavih (in drugih) celicah dvojno vlogo, saj vpliva tako na proliferacijo kot na apoptozo (Orrenius in sod., 2003; Schwarz in sod., 2013). Amplituda, čas in prostorska lokalizacija sprememb v koncentraciji citosolnega Ca^{2+} so ključnega pomena za določanje usode celice (Berridge, 1995). V splošnem majhni, prehodni dvigi citosolne koncentracije

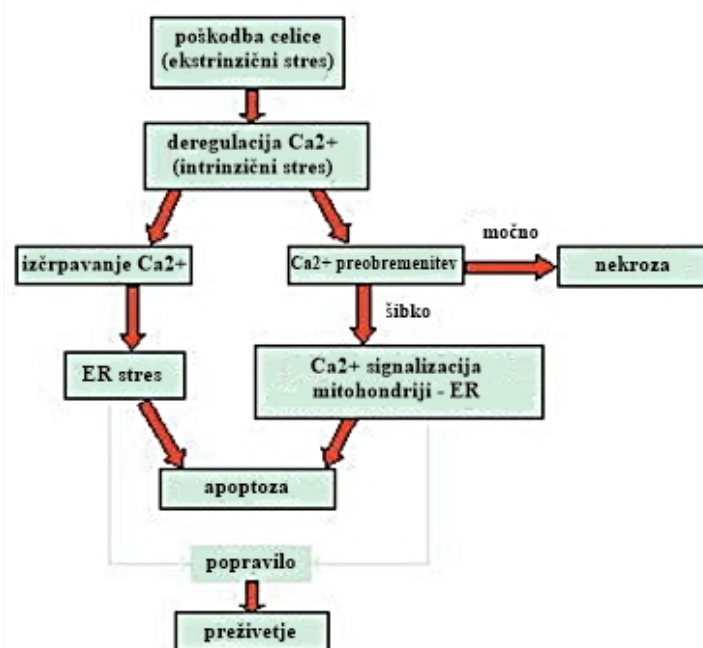
Ca^{2+} (nizke do srednje nM) uravnava celično proliferacijo, medtem ko trajnejši in občutnejši (visoke nM do μM) dvigi koncentracije ponavadi sprožijo apoptozo (Qu in sod., 2011).

Celična smrt je eden od pomembnih celičnih mehanizmov za vzdrževanje tkivne homeostaze in odstranjevanje poškodovanih celic. Glede na morfološke spremembe, začetne signale ali vpletenost kaspaz, lahko celično smrt razdelimo v tri glavne kategorije: a) apoptoza, b) avtofagija in c) nekroza. Kateremu tipu celične smrti bo celica podlegla, je odvisno predvsem od dražljaja. Apoptoza je močno reguliran proces, ki je visoko učinkovit in energetsko potrošen, vključuje pa več poti celične signalizacije. Okvare v teh poteh lahko vodijo med drugim v rakava obolenja, avtoimunske in nevrodegenerativne bolezni. Rezultat apoptoze je organiziran propad celice, pride do krčenja celice, kondenzacije kromatina, cepitve DNA in proteinov, fragmentacije v apoptotična telesca in fagocitoze s strani sosednjih celic. Aktivacija poteče preko dveh poti, in sicer preko receptorjev smrti (ekstrinzična pot) in preko mitohondrijev (intrinzična pot), v obeh poteh pa so vključeni encimi kaspaze in regulatorni proteini (Giorgi in sod., 2008). Intrinzična pot celične smrti prek mitohondrijev nastopi zaradi permeabilizacije zunanje mitohondrijske membrane in sprostitve mitohondrijskih proteinov, odpiranje prehodnih por pa lahko med drugim sproži visoka koncentracija Ca^{2+} v mitohondrijskem matriksu. Mitohondrijske prehodne pore sicer večinoma povezujejo z nekrozo, vendar lahko v nekaterih primerih pride tudi do uhajanja proapoptotičnih proteinov, kot so citokrom c, AIF (apoptozo inducirajoči faktor) in drugi. V citosolu so poleg tega tudi številni proteini, ki so vpleteni v citotoksičnost, posredovano s Ca^{2+} (Slika 7) (Zhivotovsky in Orrenius, 2011). Nekrotična celična smrt ni rezultat ene same signalne kaskade, temveč je posledica obsežnega medsebojnega vpliva med številnimi biokemičnimi in molekulskimi dogodki na večih celičnih nivojih. Opišemo jo lahko z nabrekanjem citoplazme, ireverzibilnimi poškodbami celične membrane in propadom organelov, celična vsebina pa se izlije v zunajcelično okolje (Giorgi in sod., 2008). Avtofagna celična smrt je morfološko definirana kot celična smrt, pri kateri ne poteče kondenzacija kromatina, spremlja pa jo obsežna avtofagna vakuolizacija citoplazme (Klionsky in Emr, 2000).



Slika 7: Nekatere znotrajcelične tarče vpletene v citotoksičnost posredovano s Ca^{2+} . Prisotnost Ca^{2+} v različnih znotrajceličnih razdelkih vodi v aktivacijo različnih molekul, ki so vpletene v signalizacijo celične smrti. Zaradi motenj v Ca^{2+} signalizaciji lahko pride do aktivacije številnih citotoksičnih mehanizmov, vključno s prehodno permeabilnostjo mitohondrijev in porušenja citoskeletne organizacije. S Ca^{2+} sprožena aktivacija NO sintaz, kalcinevrina, transglutaminaz, kalpaina, fosfolipaz ali endonukleaz je povezana z različnimi oblikami apoptotične celične smrti (Zhivotovsky in Orrenius, 2011).

Glede na naravo in resnost dražljaja, pa tudi glede na celični tip, lahko pride do različnih oblik celične smrti (Slika 8). V nekaterih primerih lahko pride ob zavrtju funkcije določenega znotrajceličnega razdelka do preklopa iz ene vrste celične smrti v drugo. Na primer, inhibicija mitohondrijskega energijskega metabolizma (znižanje ATP) lahko vodi v preklap iz apoptoze v nekrozo ali celo avtofagijo (Zhivotovsky in Orrenius, 2011).



Slika 8: Shematski prikaz usode celice glede na naravo dražljaja (Cerella in sod., 2010).

2.3.2 Ca^{2+} in zdravljenje raka

Predklinične študije, ki so jih opravili na nekaterih celičnih linijah, sferoidih in mišjih tumorskih modelih so pokazale, da ima elektroporacija v kombinaciji z raztopino CaCl_2 podobne učinke kot elektrokemoterapija (Frandsen in sod., 2012, 2014). Vstop zunajceličnega Ca^{2+} v celice skozi pore v celični membrani med elektroporacijo naj bi povzročil bioenergetski izpad, hitro izgubo membranske integritete in posledično nekrozo. Prevelika količina Ca^{2+} sproži prehodno prepustnost mitohondrijev (izguba transmembranskega potenciala mitohondrijske notranje membrane) in s tem ovira produkcijo ATP v mitohondrijih, kar vodi v motnje homeostaze in normalnih celičnih funkcij (Zong in Thompson, 2006). Glede na to, da je za izvedbo apoptoze potrebna zadostna količina ATP, da poteče regulirana razgradnja celice, s Ca^{2+} posredovana motnja pri tvorbi energije najverjetneje povzroči nekrozo (Morotomi in sod., 2014). Frandsen in sod. (2012) na osnovi svojih rezultatov navajajo, da ima intratumorsko injiciranje raztopine CaCl_2 v kombinaciji z elektroporacijo nekatere prednosti pred drugimi terapijami, ne samo zaradi dostopnosti, cenovne ugodnosti in varnosti pri rokovanju, pač pa ta tudi nima sistemske toksičnosti. Kljub temu so potrebne nove raziskave glede učinka kombinacije elektroporacije in raztopine CaCl_2 na različne tumorske in normalne celice.

3 MATERIAL IN METODE

Raziskovalno delo smo opravili na Oddelku za eksperimentalno onkologijo Onkološkega inštituta Ljubljana v letu 2015 in 2016.

3.1 CELIČNE LINIJE IN GOJENJE CELIC

Pri eksperimentih smo uporabili štiri celične linije, in sicer B16F1 (American Type Culture Collection; ATCC, Manassas, ZDA), FaDu (ATCC), CHO (ATCC) in HUVEC (ATCC). B16F1 je tumorska celična linija mišjega melanoma, FaDu je humana celična linija ploščatoceličnega karcinoma ustnega žrela, CHO je celična linija ovarijskih celic kitajskega hrčka, HUVEC pa je humana celična linija endotelijskih celic popkovnične vene. Celice B16F1 smo gojili v gojišču AMEM (Advanced minimum essential medium, Gibco, Thermo Fisher Scientific, Carlsbad, ZDA), celice FaDu smo gojili v gojišču Advanced RPMI 1640 (Gibco). Celice CHO smo gojili v gojišču Advanced DMEM/F-12 (Gibco) ter celice HUVEC v gojišču Advanced DMEM (Gibco). Gojiščem smo dodali fetalni goveji serum (FBS; Fetal Bovine Serum, Gibco) v končni koncentraciji 5% (vol/vol), L-glutamin (10 mM; GlutaMax, Gibco), penicilin (100 U/ml; Grünenthal, Aachen, Nemčija) in gentamicin (50 mg/ml; Krka, Novo mesto, Slovenija). Celice smo gojili v 15 cm Petrijevih ploščah (Petri dishes, Techno Plastic Products, TPP, Trasadingen, Švica) v inkubatorju (HERAcell® 240 CO_2 Incubator, Kendro Laboratory Products, Langenselbold, Nemčija) pri 37 °C v vlažni atmosferi s 5 % ogljikovega dioksida (CO_2). Celice smo za *in vitro* poskuse uporabili v eksponentni fazi rasti. Gojišče smo odstranili, celice sprali z 1x fosfatnim pufrom (PBS; Merck Milipore, Darmstadt, Nemčija) in jih ločili od podlage z raztopino 0,25% tripsina z etilendiamin tetraacetatom (EDTA) v Hankovem pufru (Gibco).

3.2 PRIPRAVA RAZTOPIN MOLEKUL

3.2.1 Raztopina CaCl_2

Založno raztopino CaCl_2 v koncentraciji 250 mM smo pripravili iz $\text{CaCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ (Merck Milipore, Merck, MA, ZDA) in destilirane vode. Založno raztopino CaCl_2 smo pred vsakim poskusom posebej razredčili, da smo dobili serijo končnih koncentracij, in sicer smo uporabili 5×10^{-3} M, 4×10^{-3} M, 3×10^{-3} M, 2×10^{-3} M in 1×10^{-3} M raztopino CaCl_2 v celični suspenziji.

3.2.2 Raztopina bleomicina

Založno raztopino bleomicina v koncentraciji $2,12 \times 10^{-3}$ M smo pripravili iz Bleomycin medac (Medac, Wedel, Nemčija) in destilirane vode. Alikvote po 200 μl smo shranili pri -20 °C do uporabe, za vsak poskus smo odmrznili novo raztopino. Založno raztopino smo tik pred poskusom serijsko redčili z destilirano vodo do končnih koncentracij $1,4 \times 10^{-6}$ M, $1,4 \times 10^{-7}$ M, $1,4 \times 10^{-8}$ M, $1,4 \times 10^{-9}$ M in $1,4 \times 10^{-10}$ M bleomicina v celični suspenziji.

3.3 ELEKTROPORACIJA V PRISOTNOSTI RAZTOPINE CaCl_2 *IN VITRO*

Celicam v eksponentni fazi rasti smo odstranili gojišče, jih sprali z 10 ml PBS in nato dodali 5 ml raztopine tripsina, da so se odlepile od podlage in jih sprali z 10 ml gojišča v

50 ml centrifugirko. Celice smo s centrifugiranjem (1500 rpm, 5 minut, sobna temperatura) (THERMO, Heareus MULTIFUGE 1S-R Centrifuge, Waltham, MA, ZDA), ločili od tripsina in gojišča. Supernatant smo odstranili in celice resuspendirali v 5 ml hladnega (4 °C) elektroporacijskega pufra (125 mmol/l saharoza, 10 nmol/l K_2HPO_4 , 2,5 mmol/l KH_2PO_4 , 2 mmol/l $\text{MgCl}_2 \times 6\text{H}_2\text{O}$) in jih ponovno centrifugirali (1500 rpm, 5 minut). Supernatant smo zopet odstranili in celice resuspendirali v 150 – 200 μl (glede na velikost peleta, 150 μl za $5 \cdot 10^6$ celic) hladnega elektroporacijskega pufra in celično suspenzijo hranili od tega koraka naprej na ledu. Celice smo 100x redčili (10 μl celične suspenzije v 990 μl PBS), jih prešteli s pomočjo hemocitometra in za tem natančno izmerili še volumen celične suspenzije. S pomočjo dobljenih podatkov smo izračunali, s kolikšnim volumnom elektroporacijskega pufra moramo celično suspenzijo razredčiti, da pripravimo primerno koncentracijo celic. Za eno elektroporacijo moramo imeti 1×10^6 celic v 40 μl elektroporacijskega pufra. Pripravili smo šest mikrocentrifugirk, v vsako odpipetirali 88 μl pripravljene celične raztopine in jih dali na led. Tik pred elektroporacijo smo kontrolni skupini dodali 22 μl destilirane vode, ostalim petim skupinam pa po 22 μl različnih koncentracij raztopine CaCl_2 in s pipetiranjem dobro premešali vsebino mikrocentrifugirke. Za vzorec brez elektroporacije smo 50 μl celične suspenzije prenesli direktno na testno ploščo s 24 vdolbinicami (Ultra low attachment 24-well plate, Corning) in ji dodali 1 ml ustreznega gojišča. Za vzorec z elektroporacijo smo preostalih 50 μl suspenzije najprej prenesli med dve vzporedni ploščati elektrodi iz nerjavečega jekla z razmikom 2 mm, povezani s pulznim generatorjem GT-01 (Fakulteta za elektrotehniko, Univerza v Ljubljani, Ljubljana, Slovenija). Nato smo dovedli 8 pravokotnih električnih sunkov (razmerje med amplitudo in razdaljo 1300 V/cm, trajanje 100 μs in frekvenca 1 Hz). Elektroporirano kapljico smo stresli v vdolbinico testne plošče in ji po 5 minutni inkubaciji na sobni temperaturi dodali 1 ml ustreznega gojišča. Med posameznimi elektroporacijami smo elektrodi spirali v 70 % etanolu in ju dobro obrisali s sterilno gazo.

Za pozitivno kontrolo smo uporabili citostatik bleomicin v naraščajočih koncentracijah po enakem protokolu kot za elektroporacijo z raztopino CaCl_2 .

3.3.1 Test citotoksičnosti

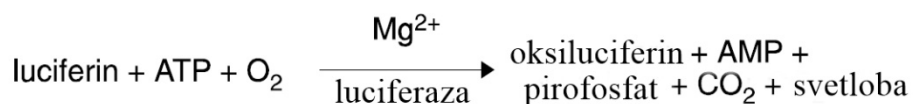
Pred nasajanjem celic (1×10^6 celic) na dve mikrotitrski plošči s 96 vdolbinicami (Corning), smo jih morali razredčiti, in sicer za skupine brez elektroporacije po 1000 celic/vdolbinico, za skupine z elektroporacijo pa po 2000 celic/vdolbinico. Za vsako od dvanajstih skupin smo si v 15 ml centrifugirkah (Falcon, Thermo Fisher Scientific) pripravili količino suspenzije celic za 30 vdolbinic. Za skupine brez elektroporacije smo odpipetirali po 30 μl celične suspenzije v 2970 μl gojišča in za skupine z elektroporacijo 60 μl celične suspenzije v 2940 μl gojišča. Vsebinsko centrifugirke smo dobro premešali, jo prenesli v kadičko, nato pa z 8-kanalno pipeto prenesli po 100 μl celične suspenzije v dvanajst (kontrola) oziroma šestnajst vdolbinic testne plošče s 96 vdolbinicami. V štiri vdolbinice smo dali po 100 μl gojišča brez celic, kar smo uporabili za odštevanje ozadja. Obe plošči smo dali v inkubator na 37 °C in 5 % atmosfero CO_2 za 72 ur.

Po 72-urni inkubaciji smo izmerili viabilnost celic po elektroporaciji v prisotnosti raztopine CaCl_2 ali bleomicina z reagentom PrestoBlue™ Cell Viability Reagent (Invitrogen, Thermo Fisher Scientific). Reagent vsebuje resazurin, ki se v metabolno

aktivnih celicah reducira v fluorescenčni rezorufin. Po 10 μl reagenta smo dodali v vsako vdolbinico in po 30 minutah inkubacije pri 37 °C in vlažni 5 % atmosferi CO_2 izmerili intenziteto fluorescence pri 535 (ekscitacija)/595 (emisija) nm s čitalcem mikrotiterskih plošč (Infinite 200, Tecan, Männendorf, Švica). Dobljenim vrednostim vsake vdolbinice smo odšteli ozadje in za vsako skupino izračunali delež preživelih celic, tako da smo vrednosti fluorescenčnega signala normalizirali na vrednosti kontrolne skupine.

3.3.2 Določanje znotrajcelične koncentracije ATP

Po elektroporaciji celic v kombinaciji z raztopino CaCl_2 ali bleomicina smo celicam dodali 1 ml primerne gojišča in jih inkubirali 1 h pri 37 °C in vlažni atmosferi s 5% CO_2 . Po inkubaciji smo celice iz testne plošče s 24 vdolbinicami prenesli v mikrocentrifugirke in jih centrifugirali (10 minut, 12.000 g) (Heraeus Fresco 21 centrifuge, THERMO), nato pa je sledila ekstrakcija znotrajceličnega ATP po protokolu Yang in sod. (2002). Supernatant z gojiščem smo odlili, pelet celic resuspendirali z 1 ml vrele destilirane H_2O , s čimer smo celice lizirali in inaktivirali ATPaze ter ostale encime, ki porabljajo ATP, nato pa dobro premešali na vibracijskem mešalniku (EV-100, Tehtnica Železniki). Mikrocentrifugirke smo takoj dali na led in jih znova centrifugirali 5 minut pri 4 °C (12.000 g) ter jih nato hranili na ledu do analize (največ 1 h). Koncentracijo znotrajceličnega ATP smo določali z Molecular probes® ATP Determination Kit (Invitrogen), ki temelji na aktivnosti luciferaze za tvorbo svetlobe ob prisotnosti ATP po naslednji reakciji:



Najprej smo izmerili luminiscenco ozadja, tako da smo v bele testne plošče s 96 vdolbinicami (Corning) napipetirali po 100 μl standardne reakcijske raztopine, ki smo jo predhodno pripravili po navodilih proizvajalca in pomerili luminiscenco ozadja s čitalcem mikrotiterskih plošč Infinite 200, ki smo mu predhodno odstranili filter za emisijo. Nato smo pripravili standardne raztopine ATP v koncentracijah 1×10^{-9} M, 10×10^{-9} M, 50×10^{-9} M, 1×10^{-7} M, 5×10^{-7} M, 1×10^{-6} M in 5×10^{-4} M ter izmerili luminiscenco. Dobljenim vrednostim smo odšteli luminiscenco ozadja in naredili umeritveno krivuljo. Za določitev ekstrahirane znotrajcelične koncentracije ATP smo v vdolbinice prenesli po 10 μl supernatanta in dodali 90 μl standardne reakcijske raztopine ter takoj izmerili luminiscenco. Za vsako skupino smo iz količine nastale svetlobe s pomočjo umeritvene krivulje izračunali delež ATP in vrednosti normalizirali glede na kontrolne skupine.

3.3.3 Barvanje po Giemsi

Po elektroporaciji celic in 5-minutni inkubaciji na sobni temperaturi smo takoj pripravili tudi citološke preparate, ki smo jih diferencialno barvali po Giemsi. Uporabili smo štiri skupine celic, in sicer kontrolno skupino, skupino z raztopino CaCl_2 , EP in EP z raztopino CaCl_2 . Uporabili smo IC_{50} koncentracijo, to je koncentracija CaCl_2 , ki povzroči odmrtnost 50 % celic. Za pripravo preparatov smo celice razredčili v PBS pufru, da smo dobili po 4000 celic v 80 μl PBS. Suspenzije smo takoj nanесли na citospin in jih centrifugirali v citocentrifugi (Shandon Cytospin II Cytocentrifuge, Shandon, Thermo Fisher Scientific) 4 minute pri 1000 obratih na minuto s filtrom za odvečno tekočino (Shandon filter cards,

Thermo Fisher Scientific). Objektna stekla (Superfrost™ Plus Microscope Slides, Thermo Fisher Scientific) smo nato sušili na zraku vsaj 30 minut. Zatem smo jih inkubirali v absolutnem metanolu 15 minut, odlili metanol in jih sprali z vodo. Sledilo je barvanje z razredčenim barvilom Giemsa (Merck Milipore, Merck, Nemčija), ki smo ga sproti pripravili iz 8,5 ml fosfatnega pufra (Merck) in 1,5 ml barvila ter ga nakapali na objektna stekla, barvilo smo pustili delovati 15 minut. Objektna stekla smo dobro sprali pod tekočo vodo in jih vsaj 30 minut sušili na zraku. Na objektna stekla smo nato nanegli medij za pokrivanje (Coverslipping Resin, Tissue-Tek, Sakura Finetek Europe, Alphen aan den Rijn, Nizozemska) in jih pokrili s krovnimi stekelci. Morfologijo celic smo si ogledali pod svetlobnim mikroskopom BX-51 (Olympus, Hamburg, Nemčija) in slike zajeli z digitalno kamero DP72 CCD (Olympus).

3.4 TEST NASTANKA KAPILARAM PODOBNIH STRUKTUR ENDOTELIJSKIH CELIC

Po elektroporaciji endotelijskih celic HUVEC v prisotnosti raztopine CaCl_2 smo preverili tudi učinek na nastanek kapilaram podobnih struktur endotelijskih celic pri IC_{50} koncentraciji. Za test smo uporabili plošče za spremljanje angiogeneze s 15 vdolbinicami (μ -Slide Angiogenesis; Ibidi, München, Nemčija) (Slika 9), katerih dno smo prekrili z ekstraktom zunajceličnega matriksa, izoliranega iz mišjega Engelbreth-Holm-Swarm sarkoma (Matrigel; BD Matrigel™ Basement Membrane Matrix; BD Biosciences). Endotelijske celice začnejo v stiku s podlago iz Matrigela migrirati in tvoriti povezave, da nastanejo strukture podobne kapilaram.



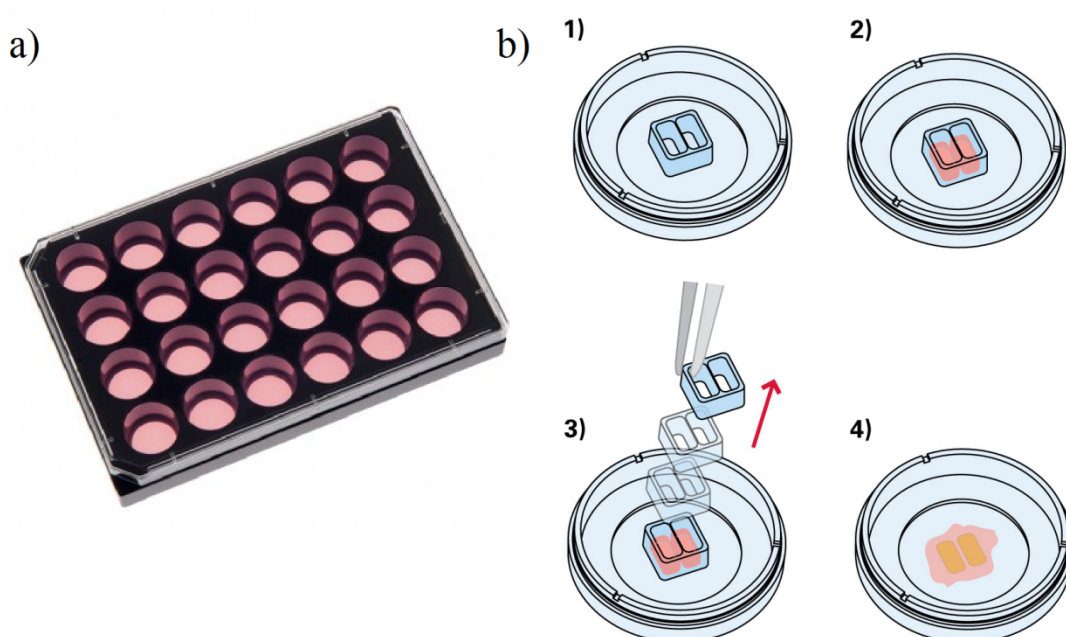
Slika 9: μ -Slide Angiogenesis ploščica za spremljanje angiogeneze.

Pred elektroporacijo smo dno vdolbinic μ -Slide ploščic prekrili z 11 μl Matrigela in ploščice inkubirali pol ure pri 37 °C v vlažni atmosferi s 5% CO_2 , da se je strdil. Za test smo uporabili štiri skupine, in sicer kontrolno skupino brez elektroporacije, skupino z elektroporacijo (EP), skupino z raztopino CaCl_2 brez elektroporacije ter skupino z raztopino CaCl_2 in elektroporacijo. Za poskus smo uporabili koncentracijo IC_{50} (3×10^{-3} M raztopina CaCl_2). Po elektroporaciji in 5-minutni inkubaciji celic na sobni temperaturi smo celice ponovno prešteli s hemocitometrom in $2,4 \times 10^4$ celic v 50 μl ustreznega gojišča takoj nasadili v vdolbinice μ -Slide ploščic. Po nasaditvi smo celice inkubirali 2 – 3 ure pri 37 °C in v vlažni atmosferi s 5 % CO_2 do nastanka kompleksov kapilaram podobnih struktur ter jih nato pobarvali s fluorescenčnim barvilom za žive celice (Calcein-AM Bioreagent, suitable for fluorescence; Sigma-Aldrich). Slike preparatov smo zajemali z digitalno kamero Olympus DP72 CCD (Olympus), povezano z invertnim mikroskopom Olympus

IX-70 (Olympus) z ustreznimi filtri (filter za ekscitacijo: 460-490 nm; filter za emisijo: 515 nm).

3.5 TEST CELJENJA RANE

S testom celjenja »rane« smo spremljali vpliv elektroporacije v prisotnosti raztopine CaCl_2 na sposobnost migracije celic pri IC_{50} koncentraciji. Uporabili smo posebne plošče s 24 vdolbinicami in silikonskimi vstavki (24 Culture-Inserts, Ibidi) (Slika 10). Silikonski vstavki so v obliki dveh dodatnih vdolbinic, v kateri smo nasadili celice. Po vzpostavitvi celičnega monosloja smo silikonske vstavke previdno odstranili s sterilno pinceto in tako dobili »rano« oziroma $500\ \mu\text{m} \pm 50\ \mu\text{m}$ velik razmik med nasajenimi celicami. Po odstranitvi silikonskih vstavkov smo celicam dodali ustrezno gojišče z dodanim FBS in antibiotiki ter nato pod mikroskopom spremljali celjenje »rane« oziroma migracijo celic v razmik med nasajenimi celicami.



Slika 10: Test celjenja rane. (a) Posebne plošče s 24 vdolbinicami in silikonskimi vstavki za test celjenja rane. (b) Postopek nasajanja celic in odstranitev silikonskih vstavkov s sterilno pinceto.

Sprva smo optimizirali število celic, potrebnih za vzpostavitev celičnega monosloja v 24 urah po nasajanju, in nato po odstranitvi silikonskega vstavka spremljali migracijo celic.

Optimizirano število celic HUVEC, FaDu in CHO je bilo 4×10^4 celic v 70 μl primerne gojišča. Test ni primeren za B16F1 celice, saj te začnejo migrirati šele po 30 urah po odstranitvi silikonskih vstavkov, v tem času pa začnejo tudi rasti v več plasteh in posledično odmirati.

Za test celjenja »rane« smo takoj po elektroporaciji v prisotnosti raztopine CaCl_2 v vsako vdolbinico nasadili štiri skupine celic (kontrolno skupino brez EP, skupino z EP, skupino z raztopino CaCl_2 ter skupino z EP in raztopino CaCl_2) v 70 μl primerne gojišča z dodanim FBS in antibiotiki. Po 24 urah inkubacije pri 37 °C v vlažni atmosferi 5% CO_2

oziroma po vzpostavitvi celičnega monosloja smo s sterilno pinceto previdno odstranili silikonske vstavke in v vsako vdolbinico dodali še 1 ml primerne gojišča z dodanim FBS in antibiotiki. Migracijo celic smo spremljali s slikanjem "rane" z digitalno kamero (Olympus DP72 CCD; Hamburg, Nemčija), ki je bila povezana z invertnim fluorescenčnim mikroskopom (Olympus IX-70, Hamburg, Nemčija), in sicer ob času 0 h (takoj po odstranitvi silikonskih vstavkov), nato pa na vsakih nekaj ur, dokler se »rana« ni popolnoma zacelila. Čas slikanja smo optimizirali za vsako celično linijo posebej, saj nekatere začnejo opazno migrirati šele nekaj ur po odstranitvi silikonskih vstavkov. Na zajetih slikah smo z računalniškim programom Fiji (Schindelin in sod., 2012) v vsaki časovni točki kvantificirali razmik med celicami, iz dobljenih podatkov smo za vsako skupino narisali graf odvisnosti velikosti razmika med celicami [piksel] od časa [h]. Iz enačbe linearizirane krivulje smo nato odčitali naklon krivulje, ki je predstavljal hitrost migracije celic. Stopnjo migracije celic smo za vsako skupino izračunali tako, da smo naklon krivulje poskusnih skupin normalizirali na naklon krivulje kontrolne skupine.

3.6 STATISTIČNA ANALIZA REZULTATOV

Za statistično analizo in grafični prikaz rezultatov smo uporabili program SigmaPlot Software (verzija 12.0, Systat Software, London, Velika Britanija). Za vsako proučevano skupino smo s testom Shapiro-Wilk preverili, ali so podatki normalno porazdeljeni ter izračunali aritmetično sredino in njeno standardno napako. Skupine smo med sabo primerjali z enosmerno analizo variance (One way ANOVA). S Holm-Sidakovim testom smo primerjali razlike med posameznimi skupinami. Pri vseh testih smo za statistično značilne rezultate upoštevali tiste, katerih P-vrednost je bila manjša od 0,05.

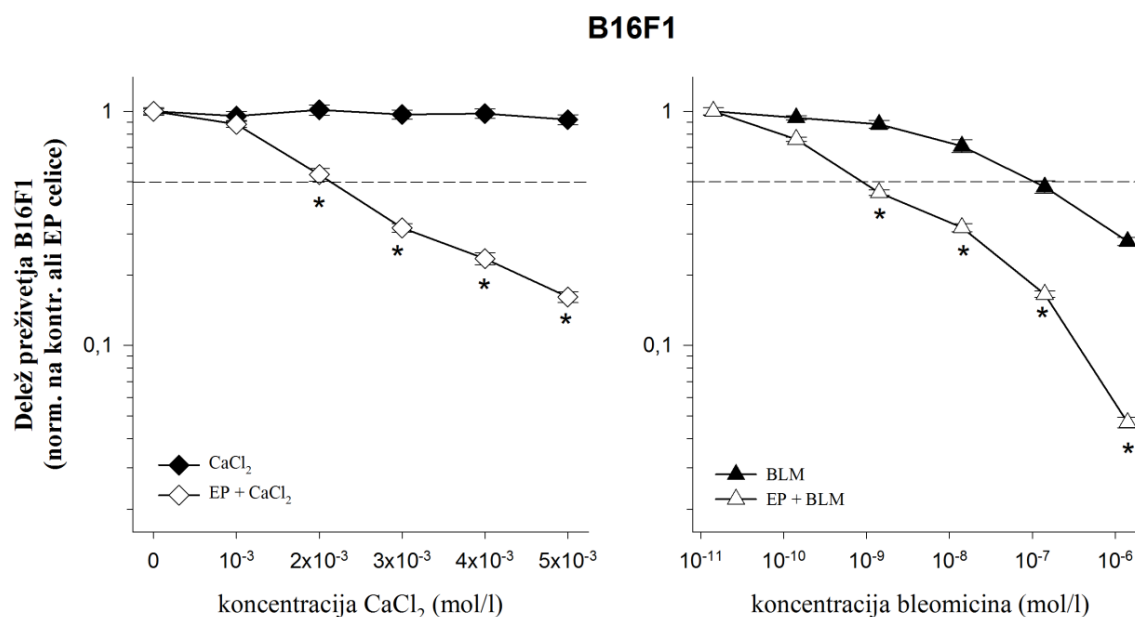
4 REZULTATI

4.1 CITOTOKSIČNI UČINEK ELEKTROPORACIJE CELIC V KOMBINACIJI Z RAZTOPINO CaCl_2

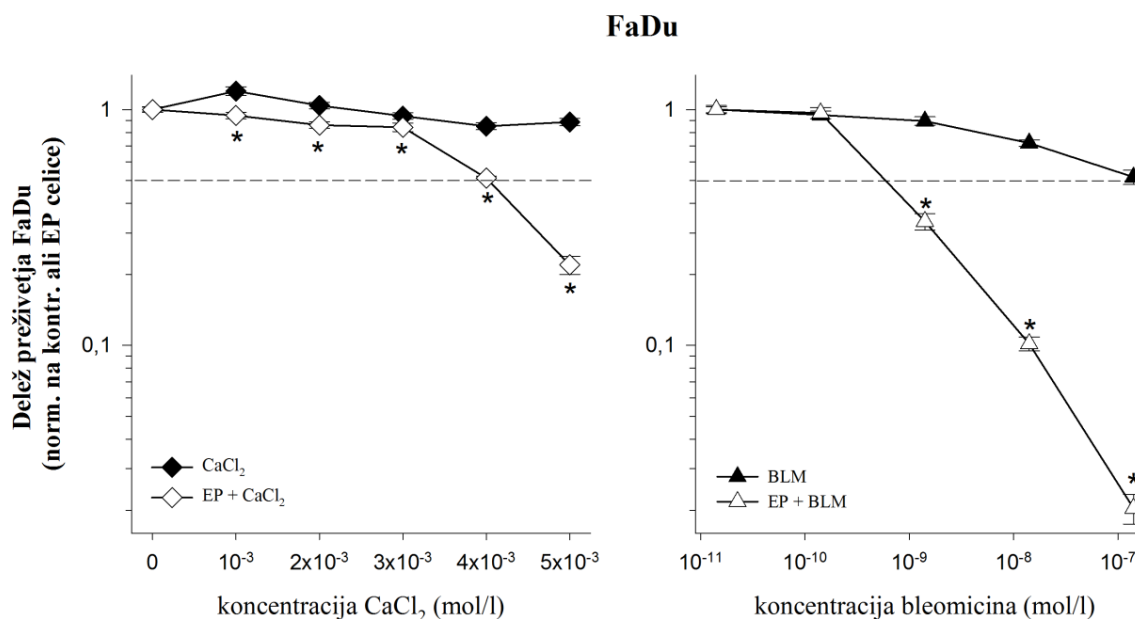
Glede na zadnje raziskave, kjer so ugotavljali, če elektroporacija v prisotnosti visokih zunajceličnih koncentracij CaCl_2 vpliva na preživetje tumorskih celic ter ima diferencialen učinek na tumorske in normalne celice, smo za poskuse izbrali štiri celične linije, dve tumorski in dve normalni. Od slednjih je bila ena izbrana endotelijska celična linija (HUVEC), s katero smo želeli posredno ugotoviti, če ima učinek tudi na tumorsko žilje. Najprej smo s testom citotoksičnosti (Slika 11–14) na vseh celicah spremljali učinek na preživetje celic 72 ur po elektroporaciji v kombinaciji z raztopino CaCl_2 . Za pozitivno kontrolo smo naredili še elektrokemoterapijo z bleomicinom po istem protokolu. Statistično značilno zmanjšano preživetje celic opazimo pri B16F1 in HUVEC celicah že pri nižjih koncentracijah CaCl_2 , medtem ko učinkuje na FaDu šele pri višjih koncentracijah, na CHO pa učinkuje šele pri najvišji uporabljeni koncentraciji. Iz pridobljenih podatkov smo izračunali IC_{50} koncentracije, ki je bila za B16F1 2.2×10^{-3} M, za HUVEC 3.1×10^{-3} M, za FaDu 4×10^{-3} M in za CHO 5×10^{-3} M CaCl_2 . Bleomicin ima močan citotoksičen učinek na vse štiri celične linije, IC_{50} koncentracija za celice CHO znaša 6.9×10^{-11} M, za HUVEC 3.9×10^{-10} M, za FaDu 5.7×10^{-10} M in za B16F1 8.7×10^{-10} M. Elektroporacija v prisotnosti raztopine CaCl_2 je najmanj citotoksično delovala na normalne celice CHO in bolj na tumorske B16F1 ter FaDu, precejšnje citotoksično delovanje pa smo dokazali tudi na endotelijskih celicah HUVEC, kar do zdaj ni bilo znano. Sama elektroporacija celic brez CaCl_2 raztopine je v povprečju pri vseh celičnih linijah znižala preživetje za ~25 % proti kontrolnim neizpostavljenim celicam.

Preglednica 1: IC_{50} koncentracije CaCl_2 in bleomicina pri elektroporaciji za posamezne celične linije.

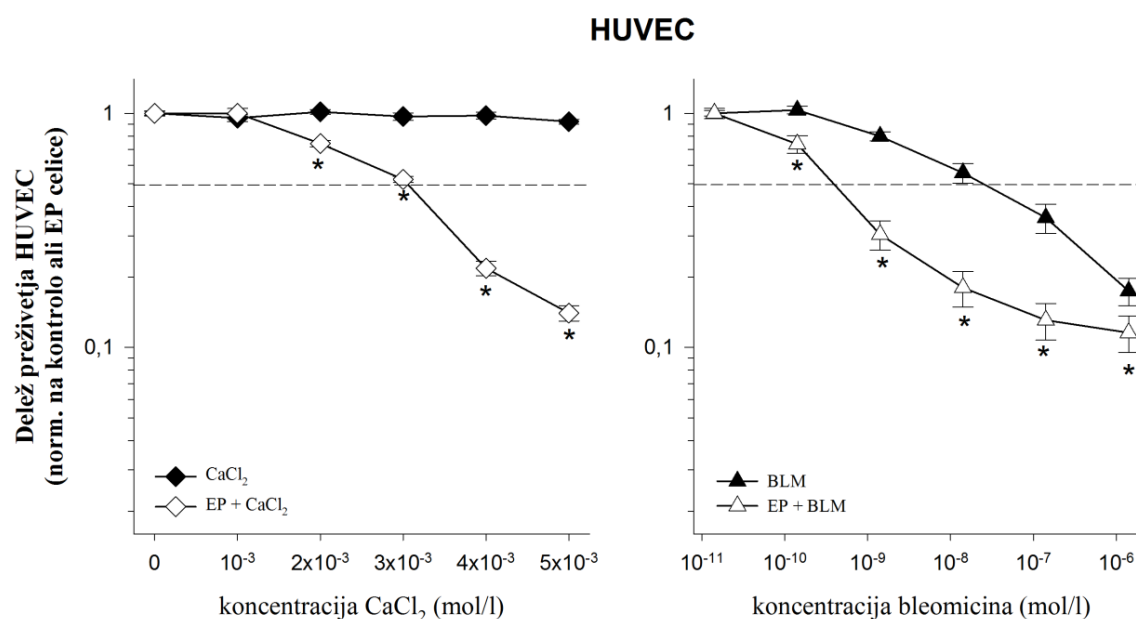
CELIČNA LINIJA	IC_{50} KONCENTRACIJA	
	bleomicin (M)	CaCl_2 (M)
B16F1	8.7×10^{-10}	2.2×10^{-3}
FaDu	5.7×10^{-10}	4×10^{-3}
HUVEC	3.9×10^{-10}	3.1×10^{-3}
CHO	6.9×10^{-11}	5×10^{-3}



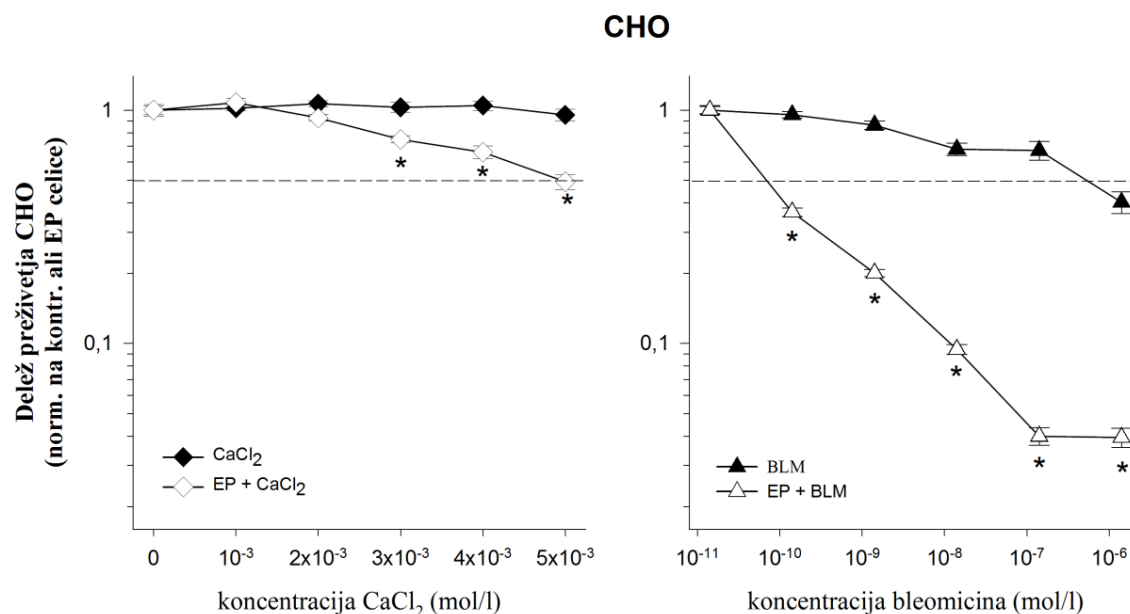
Slika 11: Test citotoksičnosti za celično linijo B16F1 72 ur po elektroporaciji v prisotnosti raztopine CaCl_2 ali elektrokemoterapiji z bleomicinom. * $p < 0,05$ med skupinami brez EP in z EP pri isti koncentraciji CaCl_2 ali bleomicina. Črtkana črta predstavlja IC_{50} koncentracijo. Koncentrationska skala pri CaCl_2 je linearna, pri bleomicinu pa logaritemska.



Slika 12: Test citotoksičnosti za celično linijo FaDu 72 ur po elektroporaciji v prisotnosti raztopine CaCl_2 ali elektrokemoterapiji z bleomicinom. * $p < 0,05$ med skupinami brez EP in z EP pri isti koncentraciji CaCl_2 ali bleomicina. Črtkana črta predstavlja IC_{50} koncentracijo. Koncentrationska skala pri CaCl_2 je linearna, pri bleomicinu pa logaritemska.



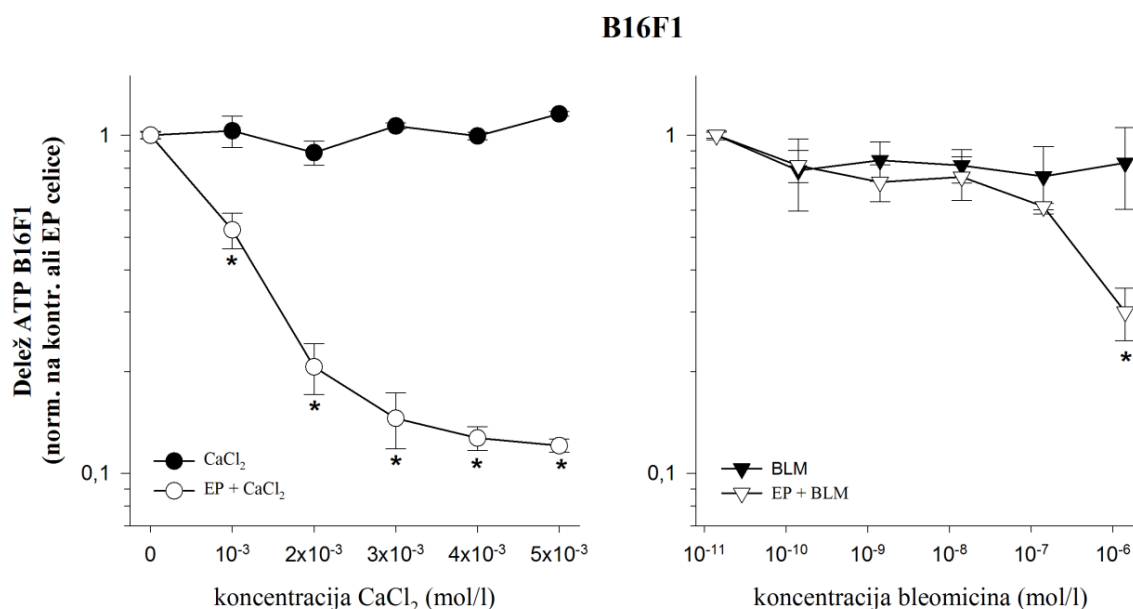
Slika 13: Test citotoksičnosti za celično linijo HUVEC 72 ur po elektroporaciji v prisotnosti raztopine CaCl_2 ali elektrokemoterapiji z bleomicinom. * $p < 0,05$ med skupinami brez EP in z EP pri isti koncentraciji CaCl_2 ali bleomicina. Črtkana črta predstavlja IC_{50} koncentracijo. Koncentracijska skala pri CaCl_2 je linearna, pri bleomicinu pa logaritemska.



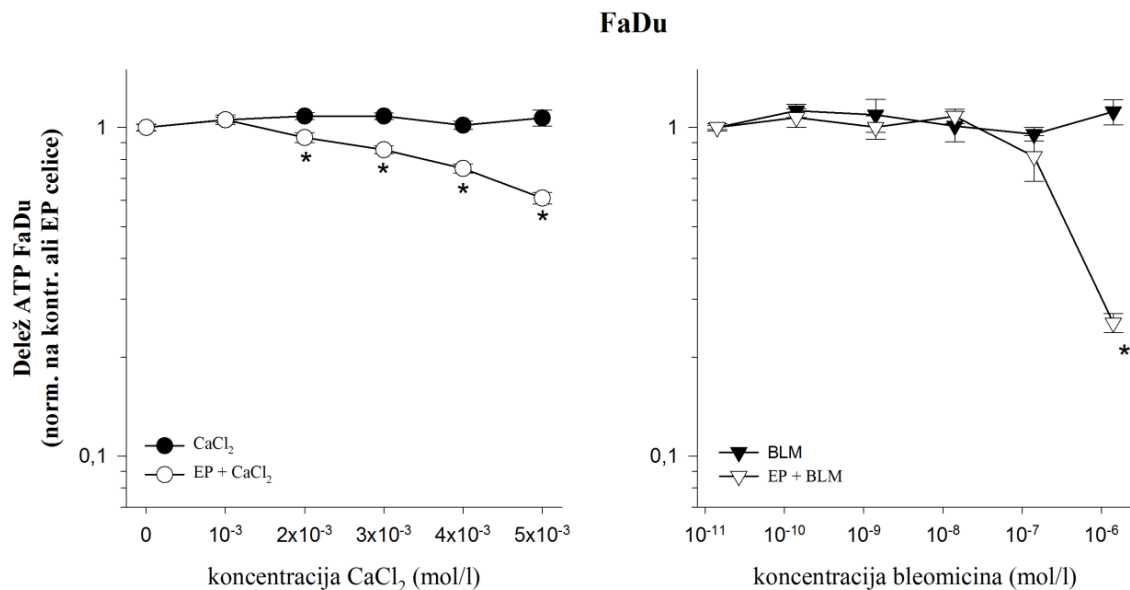
Slika 14: Test citotoksičnosti za celično linijo CHO 72 ur po elektroporaciji v prisotnosti raztopine CaCl_2 ali elektrokemoterapiji z bleomicinom. * $p < 0,05$ med skupinami brez EP in z EP pri isti koncentraciji CaCl_2 ali bleomicina. Črtkana črta predstavlja IC_{50} koncentracijo. Koncentracijska skala pri CaCl_2 je linearna, pri bleomicinu pa logaritemska.

4.2 UČINEK ELEKTROPORACIJE V KOMBINACIJI Z RAZTOPINO CaCl_2 NA ZNOTRAJCELIČNO KONCENTRACIJO ATP

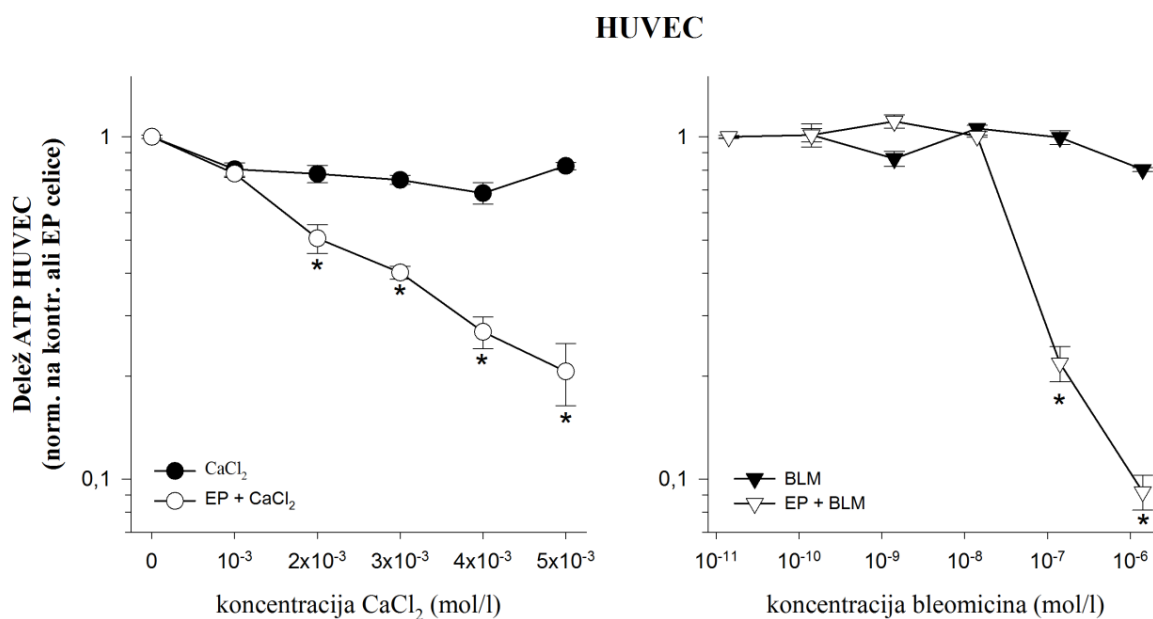
Spremljali smo tudi učinek elektroporacije na znotrajcelično koncentracijo ATP v kombinaciji z raztopino CaCl_2 , ker smo želeli raziskati ali res pride do upada ATP zaradi vdora Ca^{2+} , kot je opisano v literaturi. Koncentracijo ATP smo določali po 1 uri inkubacije, da so si celice v tem času nekoliko opomogle. Pri vseh celičnih linijah opazimo po elektroporaciji v kombinaciji z raztopino CaCl_2 znižanje znotrajcelične koncentracije ATP, ki je odvisno od koncentracije CaCl_2 in kaže podoben trend kot krivulja pri testu citotoksičnosti. Pri elektrokemoterapiji z bleomicinom koncentracija ATP pri vseh celičnih linijah strmo pade samo pri višjih koncentracijah, kjer večina celic odmre, celični liniji CHO in HUVEC sta na terapijo nekoliko bolj občutljivi kot B16F1 in FaDu (Slika 15–18). Pri vseh celičnih linijah smo opazili ~10 % znižanje znotrajcelične koncentracije ATP pri sami elektroporaciji proti kontroli. Celična linija B16F1 je bila najbolj občutljiva, ker se raven ATP močno zniža že pri najmanjši uporabljeni koncentraciji. HUVEC in CHO kažeta precej podoben trend, pri čemer je pri HUVEC nekoliko bolj strm. Najmanjši upad koncentracije ATP je pri FaDu.



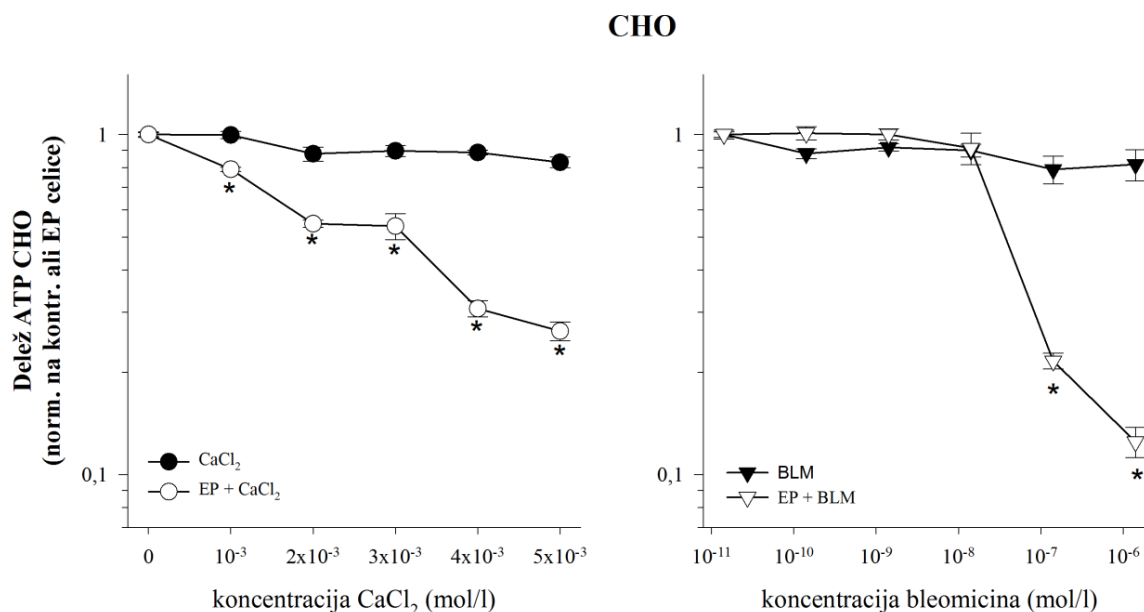
Slika 15: Delež znotrajceličnega ATP pri celični liniji B16F1 1 uro po elektroporaciji v prisotnosti raztopine CaCl_2 ali elektrokemoterapiji z bleomicinom. * $p < 0,05$ med skupinami brez EP in z EP pri isti koncentraciji CaCl_2 ali bleomicina. Koncentracijska skala pri CaCl_2 je linearna, pri bleomicinu pa logaritemska.



Slika 16: Delež znotrajceličnega ATP pri celični liniji FaDu 1 uro po elektroporaciji v prisotnosti raztopine CaCl_2 ali elektrokemoterapiji z bleomicinom. * $p < 0,05$ med skupinami brez EP in z EP pri isti koncentraciji CaCl_2 ali bleomicina. Koncentracijska skala pri CaCl_2 je linearna, pri bleomicinu pa logaritemska.



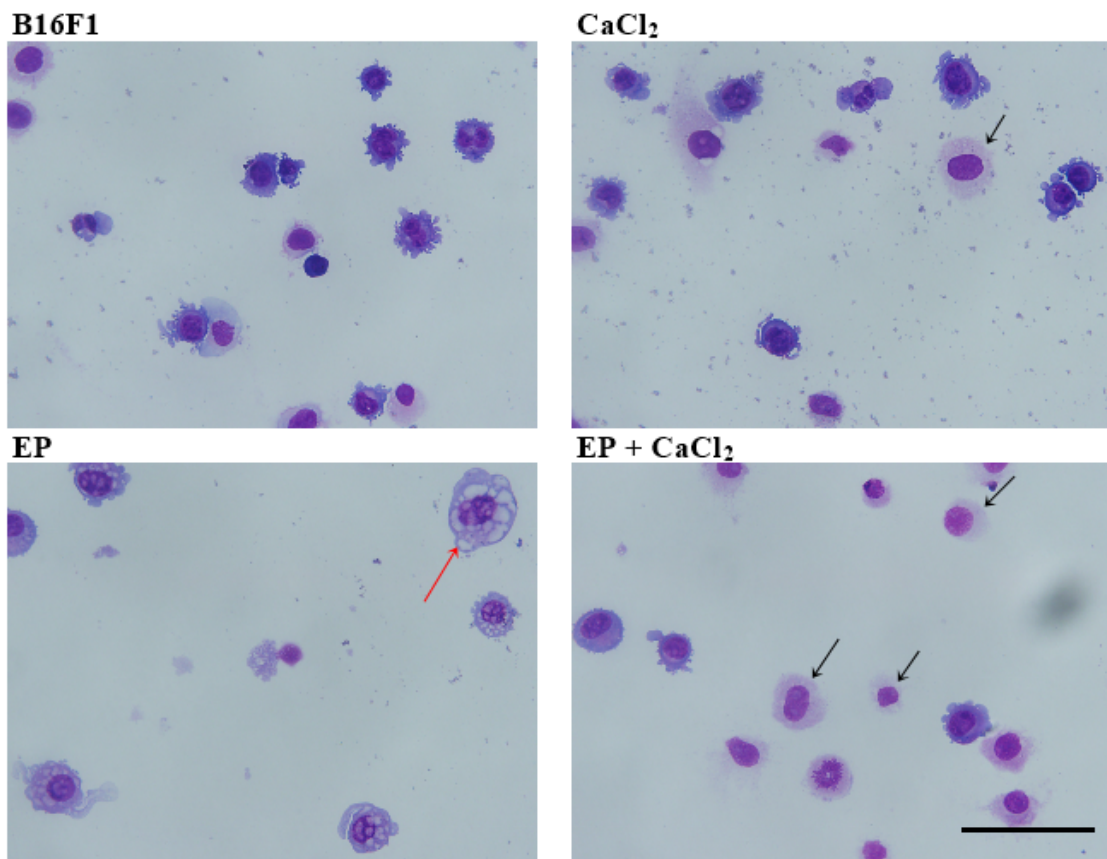
Slika 17: Delež znotrajceličnega ATP pri celični liniji HUVEC 1 uro po elektroporaciji v prisotnosti raztopine CaCl_2 ali elektrokemoterapiji z bleomicinom. * $p < 0,05$ med skupinami brez EP in z EP pri isti koncentraciji CaCl_2 ali bleomicina. Koncentracijska skala pri CaCl_2 je linearna, pri bleomicinu pa logaritemska.



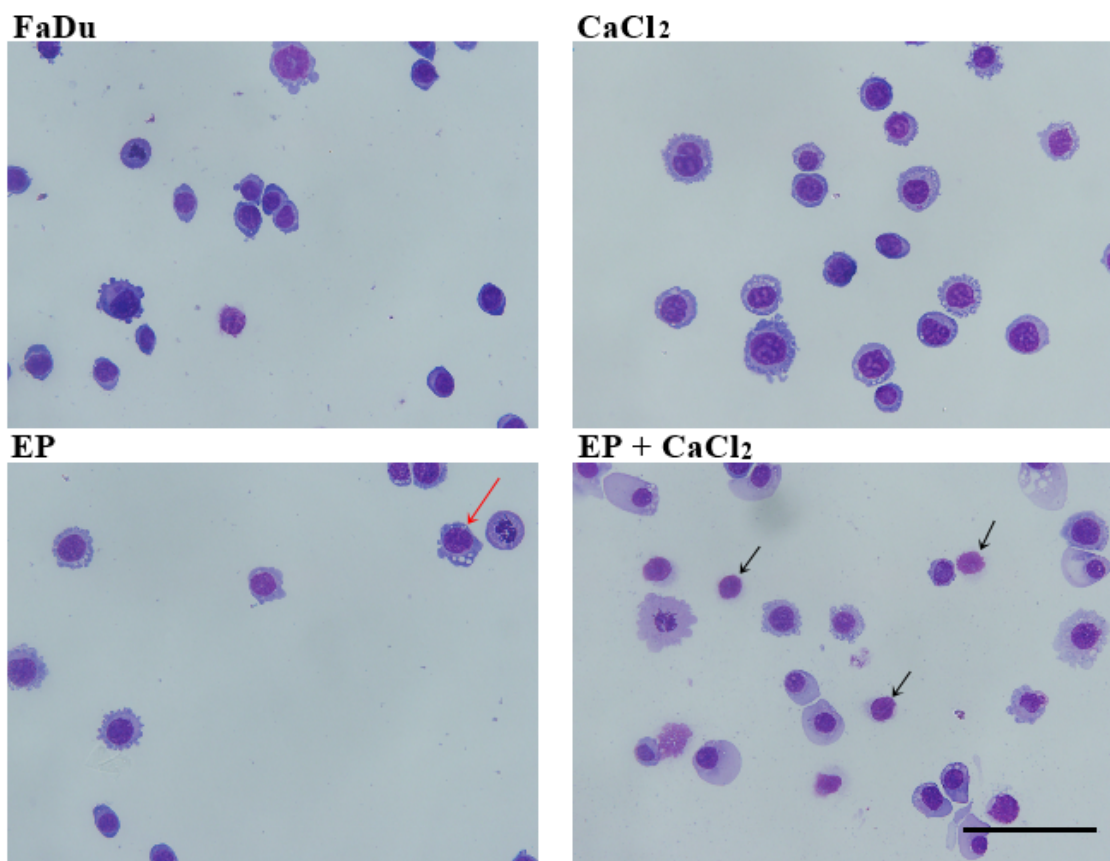
Slika 18: Delež znotrajceličnega ATP pri celični liniji CHO 1 uro po elektroporaciji v prisotnosti raztopine CaCl_2 ali elektrokemoterapiji z bleomicinom. * $p < 0,05$ med skupinami brez EP in z EP pri isti koncentraciji CaCl_2 ali bleomicina. Koncentrasijska skala pri CaCl_2 je linearna, pri bleomicinu pa logaritemska.

4.3 DOLOČEVANJE TIPA CELIČNE SMRTI Z BARVANJEM PO GIEMSI

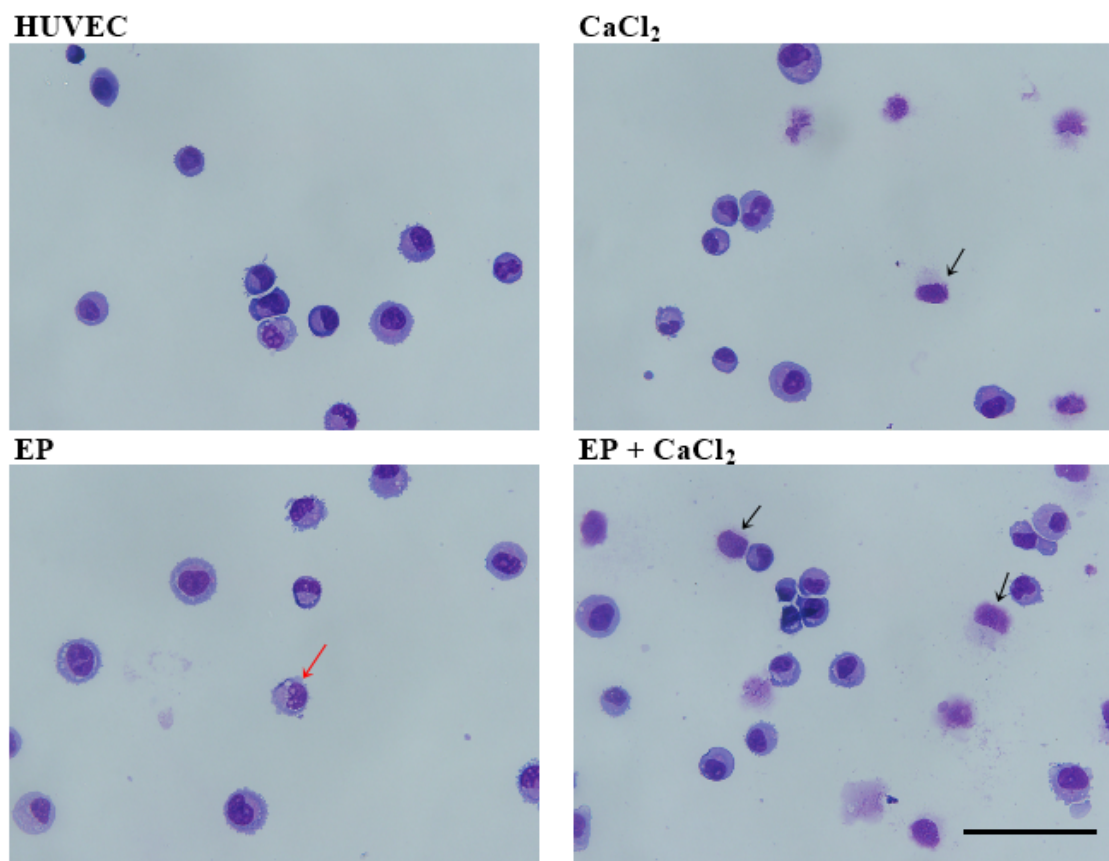
Z barvanjem po Giemsi smo želeli na osnovi morfologije določiti vrsto celične smrti, ki jo povzroči elektroporacija v prisotnosti raztopine CaCl_2 pri IC_{50} koncentraciji. Opazili smo, da terapija povzroči predvsem nekrotično celično smrt (Slika 19–22), medtem ko smo apoptozo opazili v redkih primerih. Nekrozo lahko z barvanjem po Giemsi opazimo pri celicah, ki imajo zaradi izlitja vsebine lizosomov zakisano citoplazmo. To eozin v barvilu obarva rožnato, svetlejše postane tudi jedro.



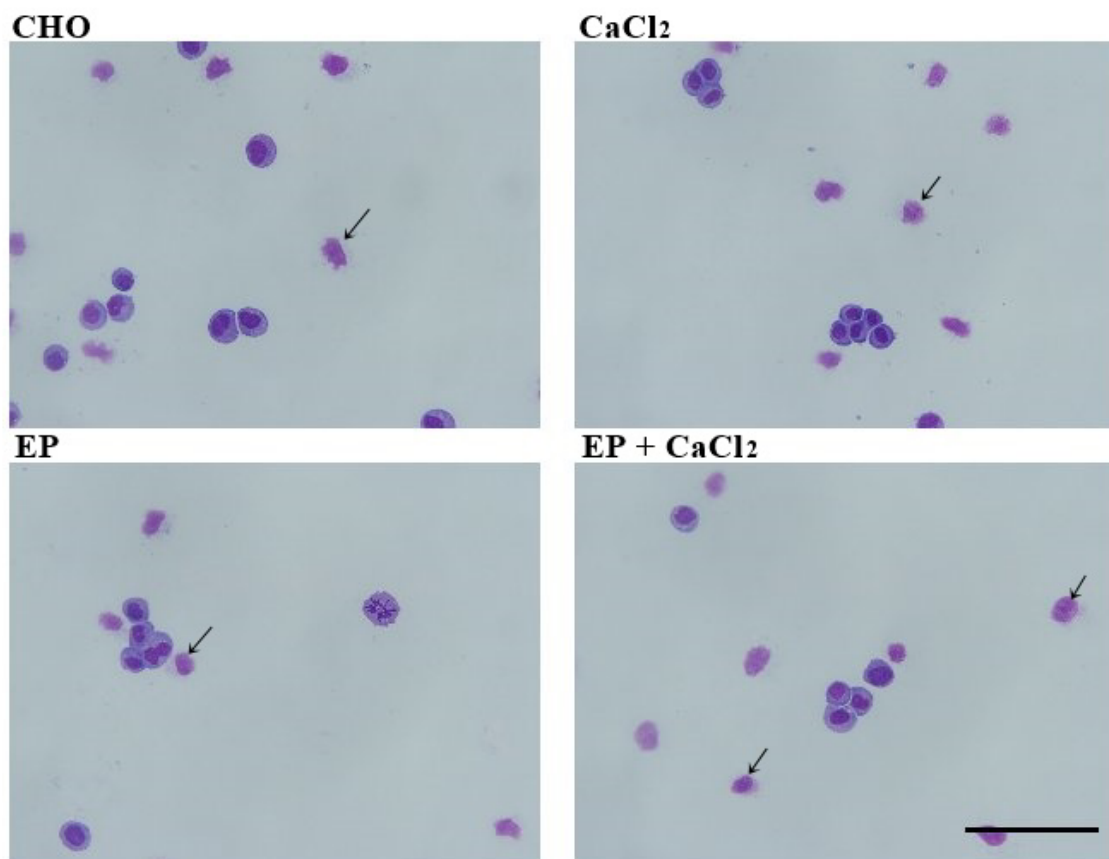
Slika 19: B16F1 celice barvane po Giemsi (Kontrolne celice (B16F1), celicam dodana raztopina CaCl_2 (CaCl_2), elektroporirane celice (EP), elektroporirane celice v prisotnosti raztopine CaCl_2 (EP + CaCl_2). S črno puščico so označene nekatere nekrotične celice, z rdečo apoptotične celice. Merilo, 200 μm .



Slika 20: FaDu celice barvane po Giemsi (Kontrolne celice (FaDu), celicam dodana raztopina CaCl_2 (CaCl_2), elektroporirane celice (EP), elektroporirane celice v prisotnosti raztopine CaCl_2 (EP + CaCl_2). S črno puščico so označene nekatere nekrotične celice, z rdečo apoptotične celice. Merilo, 200 μm .



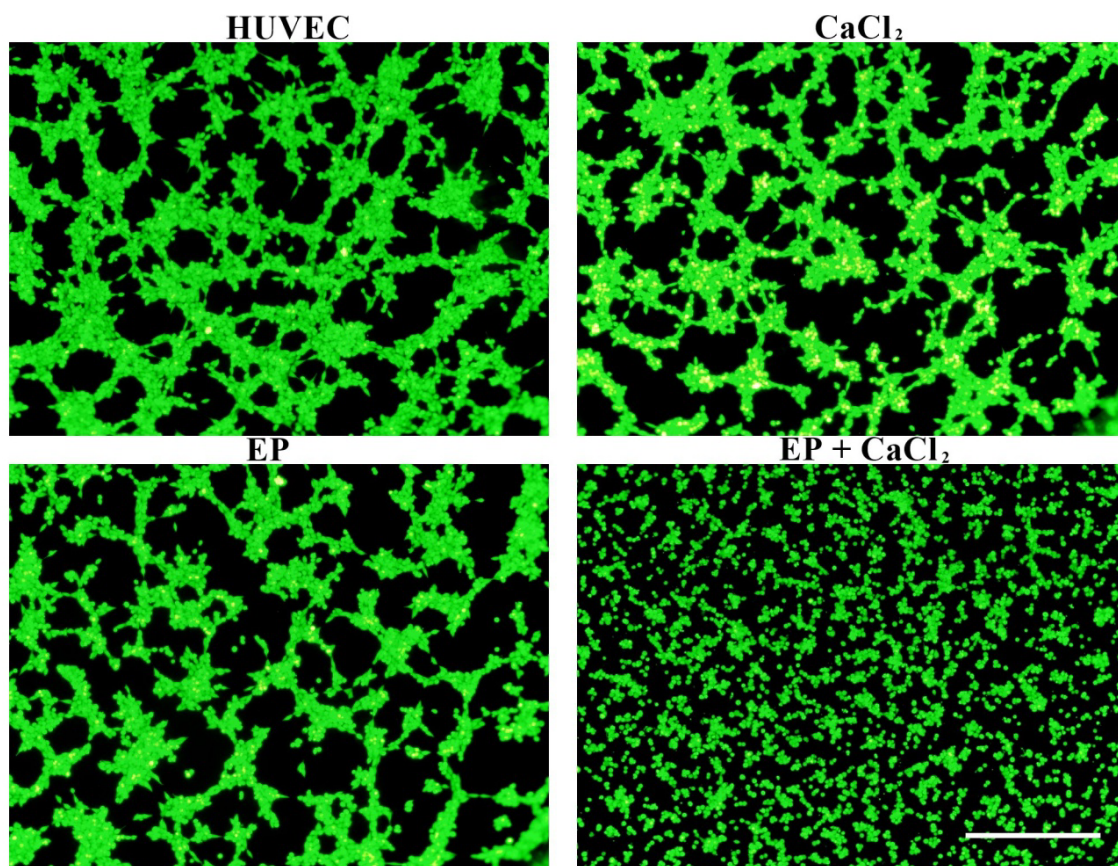
Slika 21: HUVEC celice barvane po Giemsi (Kontrolne celice (HUVEC), celicam dodana raztopina CaCl_2 (CaCl_2), elektroporirane celice (EP), elektroporirane celice v prisotnosti raztopine CaCl_2 (EP + CaCl_2). S črno puščico so označene nekatere nekrotične celice, z rdečo apoptotične celice. Merilo, 200 μm .



Slika 22: CHO celice barvane po Giemsi (Kontrolne celice (CHO), celicam dodana raztopina CaCl_2 (CaCl_2), elektroporirane celice (EP), elektroporirane celice v prisotnosti raztopine CaCl_2 (EP + CaCl_2). S črno puščico so označene nekatere nekrotične celice. Merilo, 200 μm .

4.4 UČINEK ELEKTROPORACIJE V KOMBINACIJI Z RAZTOPINO CaCl_2 NA SPOSOBNOST TVORBE KAPILARAM PODOBNIH STRUKTUR ENDOTELIJSKIH CELIC

Učinek elektroporacije v kombinaciji z raztopino CaCl_2 smo preverili tudi s testom nastanka kapilaram podobnih struktur endotelijskih celic HUVEC na Matrigelu. Ta *in vitro* test nam posredno pokaže sposobnosti angiogeneze endotelijskih celic v *in vivo* sistemih, zato smo ga uporabili za preverjanje antiangiogenega učinka kombinacije raztopine CaCl_2 z elektroporacijo na HUVEC celice. Uporabili smo 3 mM raztopino CaCl_2 , ki je pri testu citotoksičnosti pokazala 50-odstotno preživetje celic. Neizpostavljene celice, celice v 3 mM raztopini CaCl_2 in elektroporirane celice so tvorile kapilaram podobne strukture po treh urah od nasajanja na Matrigel. Iz slik, ki smo jih zajeli po barvanju s fluorescenčnim barvilom, smo opazili razlike v nastanku kapilaram podobnih struktur po elektroporaciji v kombinaciji s CaCl_2 v primerjavi s kontrolnimi skupinami. Pri terapevtski skupini smo ugotovili antiangiogeni učinek, saj se kapilaram podobne strukture niso tvorile (Slika 23).



Slika 23: Sposobnost tvorjenja kapilaram podobnih struktur HUVEC celic (Kontrolne celice (B16F1), celicam dodana raztopina CaCl_2 (CaCl_2), elektroporirane celice (EP), elektroporirane celice v prisotnosti raztopine CaCl_2 (EP + CaCl_2). Merilo, 500 μm .

4.5 UČINEK NA SPOSOBNOST MIGRACIJE CELIC PO ELEKTROPORACIJI V KOMBINACIJI Z RAZTOPINO CaCl_2

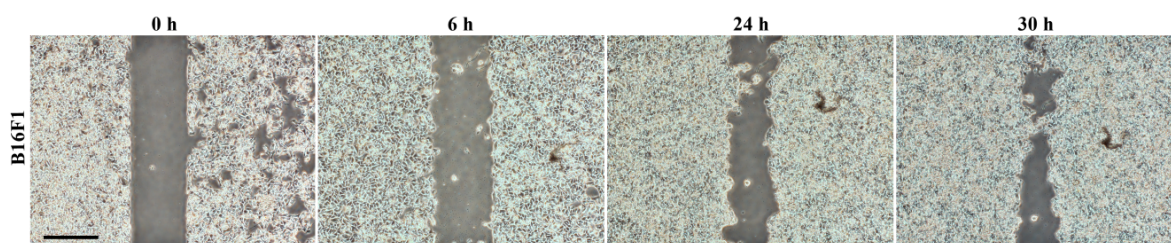
S testom celjenja »rane« smo po elektroporaciji v kombinaciji z raztopino CaCl_2 spremljali učinek na sposobnost migracije celic, kar je pomembno za metastaziranje in tvorbo žil. Za kontrolne skupine smo uporabili skupino brez in z dovedenimi električnimi pulzi in celice z raztopino CaCl_2 brez elektroporacije.

Test smo izvedli na treh celičnih linijah (HUVEC, CHO, FaDu) pri tisti koncentraciji CaCl_2 , ki je pri testu citotoksičnosti pokazala 50-odstotno preživetje celic (IC_{50}). Za celice B16F1 je ta test neprimeren, saj imajo nizek metastatski potencial in začnejo v manjši meri migrirati šele 30 ur po odstranitvi silikonskih vstavkov, v tem času pa tudi začnejo rasti v več slojih in posledično odmirati (Slika 24).

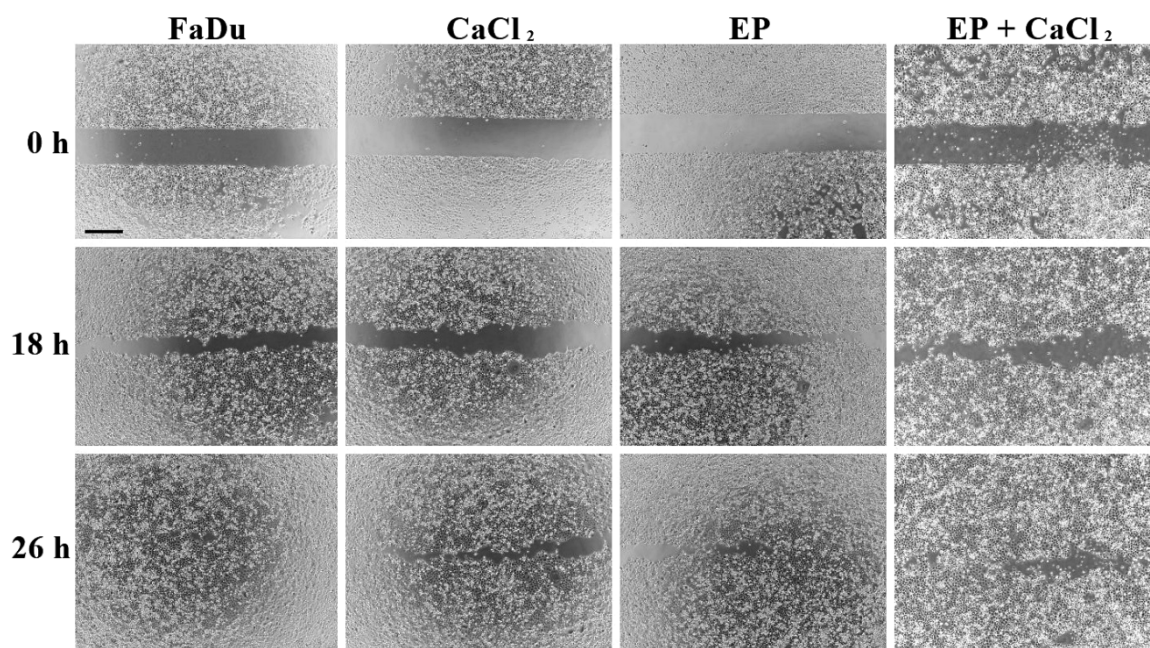
Celjenje »rane« oziroma migracijo celic v razmik med celicami smo za vsako skupino posebej spremljali z zajemanjem slik vsakih nekaj ur po odstranitvi silikonskih vstavkov, dokler se »rana« kontrolne skupine ni popolnoma zacelila. Razlike v hitrosti migracije med kontrolnimi in poskusnimi skupinami so bile opazne že iz samih posnetkov. Zajete slike smo računalniško analizirali, da smo lahko kvantificirali razlike med posameznimi skupinami vsake od uporabljenih celičnih linij ter tudi med celičnimi linijami. Iz teh

podatkov smo nato izračunali stopnjo migracije v odvisnosti od časa za vsako poskusno skupino, ki smo jo normalizirali na kontrolno skupino. Pri celični liniji FaDu (Slika 25) že iz slik lahko razberemo, da ni razlike v migraciji celic, kar smo potrdili tudi s statistično analizo stopnje migracije celic (Slika 26). Le pri celični liniji endotelnih celic HUVEC smo opazili, da je pri terapevtski skupini z elektroporacijo v kombinaciji z raztopino CaCl_2 celjenje »rane« počasnejše kot pri kontrolnih skupinah (Slika 27) in potrdili, da je statistično zmanjšana stopnja migracije celic (Slika 28). Tudi pri celični liniji CHO (Slika 29) ni opaziti razlike v migraciji, prav tako ni statistične razlike pri stopnji migracije celic (Slika 30).

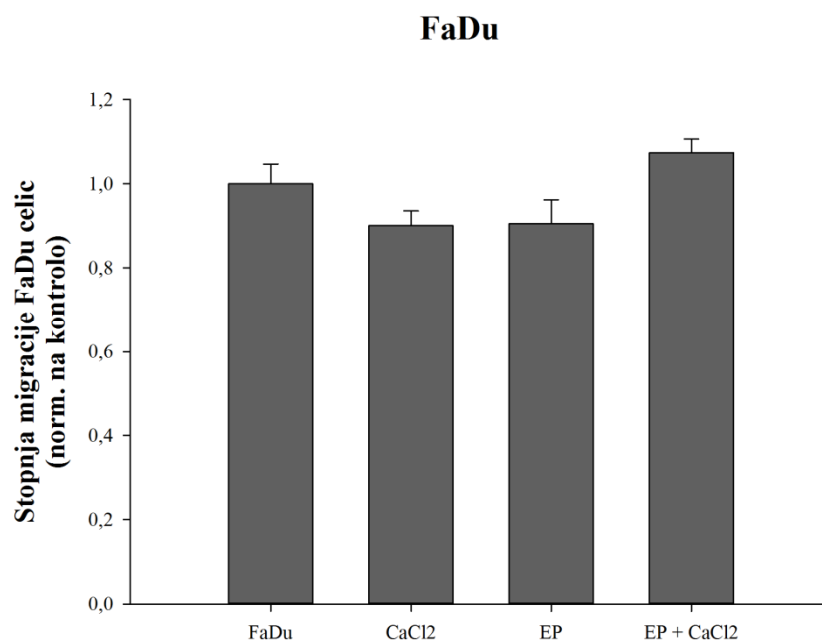
Rezultati izvedenih poskusov kažejo, da kombinacija elektroporacije z raztopino CaCl_2 ne vpliva na migracijo celic FaDu in CHO oziroma na metastaziranje tumorskih celic, smo pa skupaj s testom celjenja »rane« in testom nastanka kapilaram podobnih struktur endotelijskih celic potrdili antiangiogeno delovanje terapije na celice HUVEC.



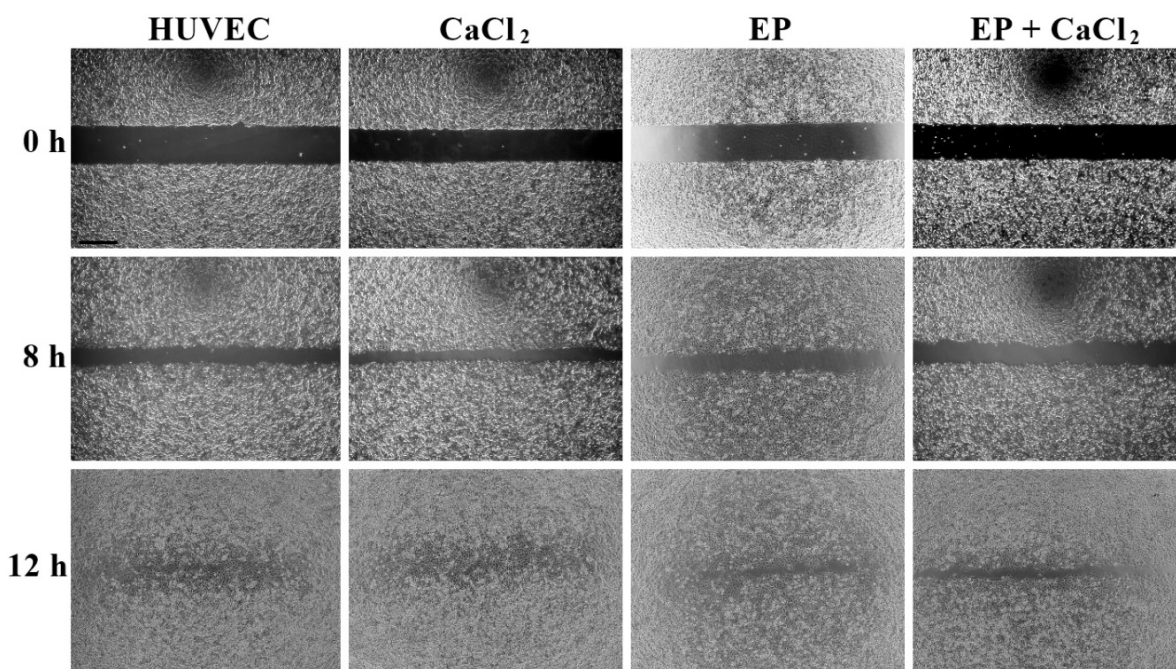
Slika 24: Celice B16F1 med optimizacijo testa celjenja »rane«. Merilo, 500 μm .



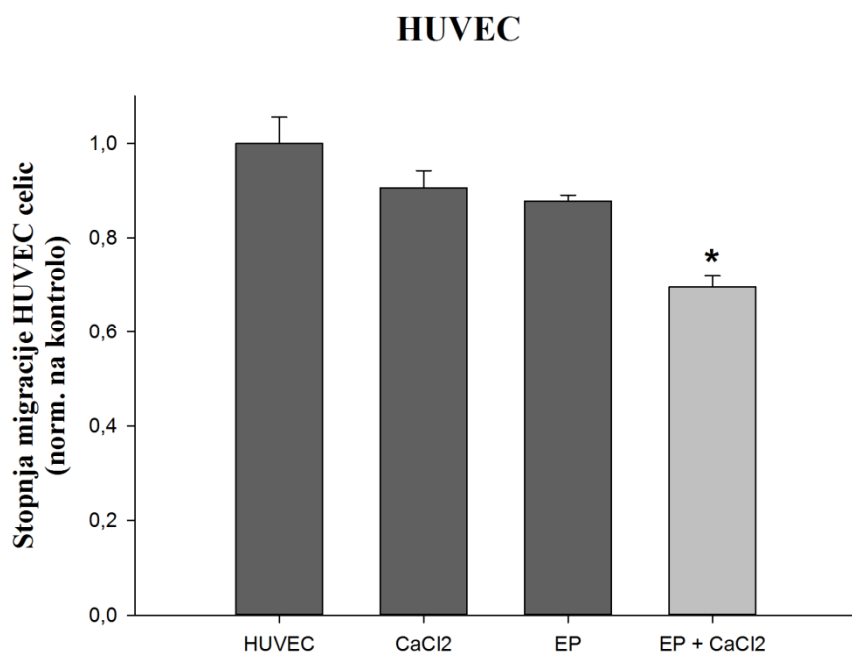
Slika 25: Migracija celic FaDu (Kontrolne celice (FaDu), celicam dodana raztopina CaCl_2 (CaCl_2), elektroporirane celice (EP), elektroporirane celice v prisotnosti raztopine CaCl_2 (EP + CaCl_2). Merilo, 500 μm .



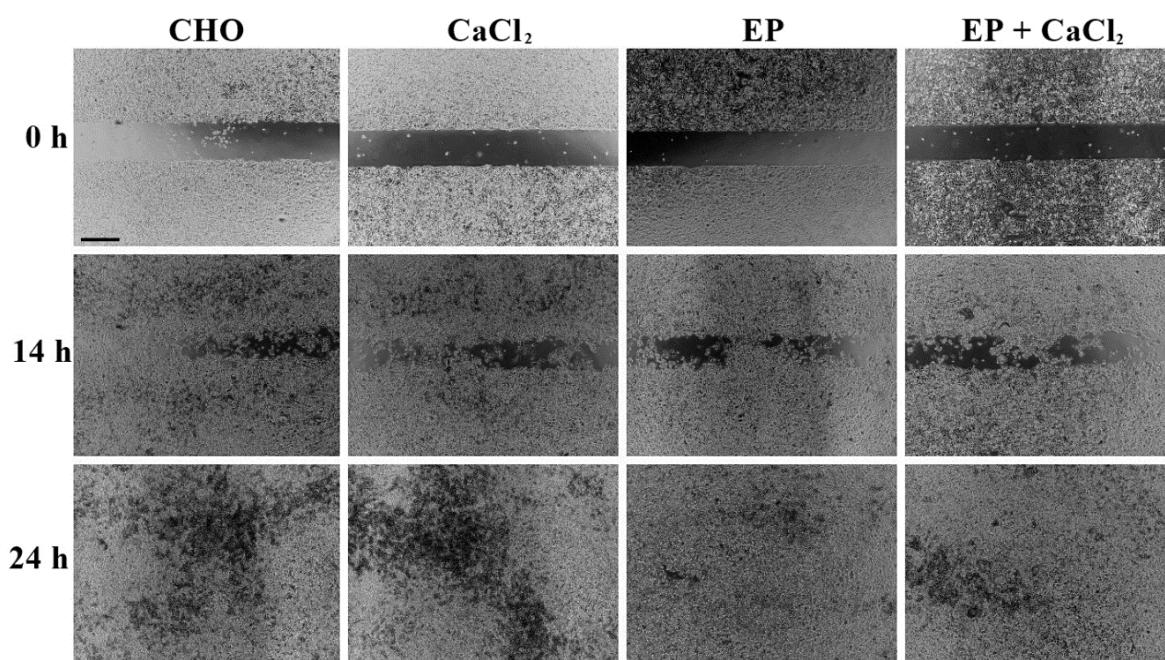
Slika 26: Stopnja migracije celic FaDu (Kontrolne celice (FaDu), celicam dodana raztopina CaCl_2 (CaCl_2), elektroporirane celice (EP), elektroporirane celice v prisotnosti raztopine CaCl_2 (EP + CaCl_2).



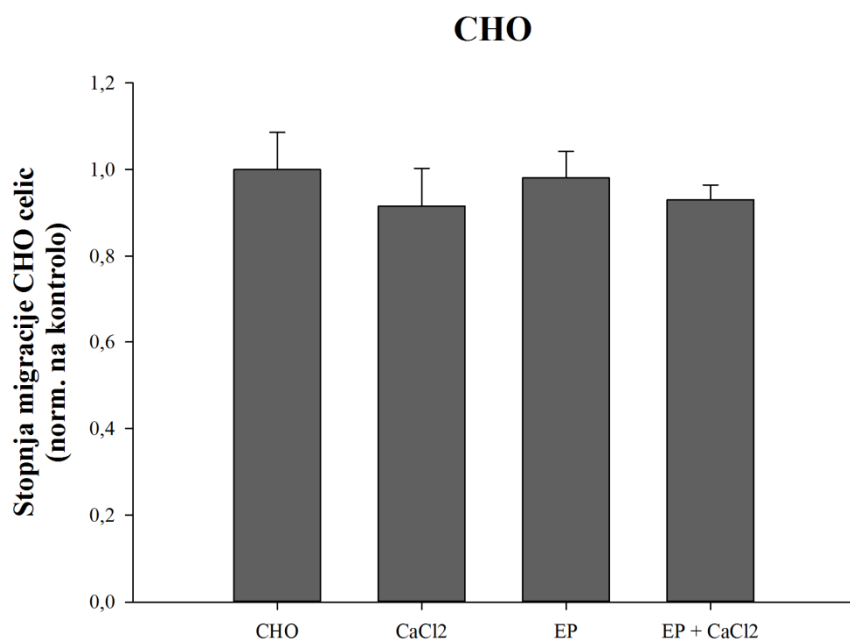
Slika 27: Migracija celic HUVEC (Kontrolne celice (HUVEC), celicam dodana raztopina CaCl_2 (CaCl_2), elektroporirane celice (EP), elektroporirane celice v prisotnosti raztopine CaCl_2 (EP + CaCl_2). Merilo, 500 μm .



Slika 28: Stopnja migracije HUVEC celic. * $p < 0,05$ proti ostalim kontrolnim skupinam (Kontrolne celice (HUVEC), celicam dodana raztopina CaCl_2 (CaCl_2), elektroporirane celice (EP), elektroporirane celice v prisotnosti raztopine CaCl_2 (EP + CaCl_2)).



Slika 29: Migracija celic CHO (Kontrolne celice (CHO), celicam dodana raztopina CaCl_2 (CaCl_2), elektroporirane celice (EP), elektroporirane celice v prisotnosti raztopine CaCl_2 (EP + CaCl_2)). Merilo, 500 μm .



Slika 30: Stopnja migracije celic CHO (Kontrolne celice (CHO), celicam dodana raztopina CaCl_2 (CaCl_2), elektroporirane celice (EP), elektroporirane celice v prisotnosti raztopine CaCl_2 (EP + CaCl_2).

5 RAZPRAVA

Ca^{2+} je pomemben in močno reguliran sekundarni sporočevalec, ki v normalnih razmerah ne prehaja skozi celične membrane. V zunajceličnem okolju ga najdemo v veliko višjih koncentracijah kakor v citosolu. Zaradi velikega koncentracijskega gradienta že zelo majhna sprememba prepustnosti celične membrane pomeni občutno povišanje znotrajcelične koncentracije Ca^{2+} . Kalcijevi ioni lahko regulirano vstopajo v celico preko različnih Ca^{2+} kanalčkov in prenašalcev, ki so v celični membrani. Kalcijevi ioni se v celici vežejo na številne proteine, presežek se transportira v različne organele, kot so endoplazemski retikel in mitohondriji, ali pa ga celica transportira iz celice z membranskimi Ca^{2+} -ATPazami ali $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ črpalkami (Clapham, 2007).

CaCl_2 oziroma Ca^{2+} je ena od učinkovin, ki je na tumorskih celicah pokazala podobno učinkovitost kot elektrokemoterapija (Frandsen in sod., 2012). V klinični uporabi je trenutno predvsem elektrokemoterapija z bleomicinom in cisplatinom (Campana in sod., 2016), potekajo pa številne raziskave o učinkovitosti drugih protitumornih učinkovin, med katerimi je tudi CaCl_2 . Med raziskovanjem potencialnih novih učinkovin je potrebno upoštevati njihove različne fizikalne in kemijske lastnosti, in ugotoviti ali lahko z elektroporacijo povečamo njihovo prehajanje v celice ter učinek na normalne celice in tkiva. Že leta 2003 so opisovali zmanjšanje preživetja celic med elektroporacijo v prisotnosti pufrov, ki vsebujejo Ca^{2+} , ali visoke zunajcelične koncentracije Ca^{2+} (Golzio in sod., 2003). Nedavne raziskave so pokazale učinkovito zmanjšanje preživetja tumorskih celic v *in vitro* poskusih, kakor tudi zmanjšanje rasti sferoidov ter tumorjev *in vivo* po elektroporaciji v kombinaciji z raztopino CaCl_2 (Hansen in sod., 2015; Frandsen in sod., 2012, 2014, 2015). Isti avtorji prav tako navajajo, da naj bi imela elektroporacija v kombinaciji z raztopino CaCl_2 manj škodljiv učinek na sosednja normalna tkiva *in vivo*. Poskuse so opravili na enajstih različnih celičnih linijah, od tega na osmih tumorskih, eni transformirani in dveh normalnih celičnih linijah. V dosedanjih raziskavah so uporabili celične linije DC-3F (celična linija transformiranih pljučnih fibroblastov kitajskega hrčka), K-562 (celična linija levkemije), LLC (celična linija Lewisovega pljučnega karcinoma) (Frandsen in sod., 2012), H69 (celična linija drobnoceličnega pljučnega karcinoma), SW780 (celična linija karcinoma sečnega mehurja), U937 (celična linija humanega limfoma) (Hansen in sod., 2015), HT29 (celična linija kolorektalnega adenokarcinoma), MDA-MB231 (celična linija adenokarcinoma dojke), HDF-n (normalna celična linija humanih dermalnih fibroblastov) (Frandsen in sod., 2015), WEHI-164 (celična linija mišjega fibrosarkoma) in L6 (normalna celična linija podganjih skeletnih mišičnih celic) (Zielichowska in sod., 2016). V navedenih raziskavah so med drugim preverjali viabilnost oziroma citotoksičnost elektroporacije pri različnih parametrih elektroporacije v kombinaciji z različnimi koncentracijami raztopine CaCl_2 in merili vsebnosti znotrajceličnega ATP po terapiji. Pri vseh tumorskih celičnih linijah so ugotovili zmanjšano preživetje celic ter znižanje koncentracije ATP, navajajo pa veliko manjši učinek na uporabljeni normalni celični liniji v primerjavi s tumorskimi. V magistrski nalogi smo zato želeli z dodatnimi *in vitro* poskusi preveriti, ali ima elektroporacija v kombinaciji z raztopino CaCl_2 res diferencialen učinek na tumorske in normalne celice. Izbrali smo dve tumorski celični liniji (mišji melanom B16F1 in humani ploščatocelični karcinom ustnega žrela FaDu) ter dve normalni celični liniji (humana endotelijska celična linija popkovnične vene HUVEC in ovarijske celice kitajskega hrčka CHO), na katerih

smo primerjali učinke elektroporacije v kombinaciji z raztopino CaCl_2 in elektrokemoterapije z bleomicinom kot pozitivno kontrolo. Po obdelavi celic smo ovrednotili citotoksičnost, znotrajcelično koncentracijo ATP, celično morfologijo in tip celične smrti z barvanjem po Giemsi, anti-angiogeni učinek na endotelijske celice in vpliv na migracijo celic, ki kaže na sposobnost zasevanja pri tumorskih celicah in sposobnost angiogeneze pri endotelijskih celicah.

5.1 TEST CITOTOKSIČNOSTI

V vseh testiranih celičnih linijah je elektroporacija v kombinaciji z raztopino CaCl_2 povzročila celično smrt v odvisnosti od uporabljene koncentracije. Za posamezne celične linije smo ugotavljali IC_{50} oziroma koncentracijo, pri kateri ugotovimo 50-odstotno preživetje celic, ki je bila za celično linijo B16F1 2.2 mM CaCl_2 , za HUVEC 3.1 mM, za FaDu 4 mM in za CHO 5 mM CaCl_2 . Za najbolj občutljivo se je izkazala celična linija B16F1, najmanj pa CHO. Na nobeno celično linijo, kjer smo celice inkubirali samo v raztopini CaCl_2 brez elektroporacije, ni bilo vidnega učinka. Citotoksičnost elektroporacije v kombinaciji z raztopino CaCl_2 smo primerjali še s pozitivno kontrolo, in sicer elektrokemoterapijo z bleomicinom. Pri tem se je izkazalo, da je elektroporacija z bleomicinom že pri nizkih koncentracijah močno citotoksična in zmanjša preživetje tako tumorskih kot normalnih celic. Prav tako tudi sam bleomicin brez elektroporacije vpliva na preživetje teh celic, vendar ne tako izrazito, medtem ko sama raztopina CaCl_2 nima takega učinka. Iz teh opazovanj lahko predpostavimo, da elektroporacija v kombinaciji z raztopino CaCl_2 , ki jo injiciramo intratumorsko, verjetno ne bi imela sistemsko in lokalno tako izrazitih neželenih stranskih učinkov na okoliška normalna tkiva kot jih ima elektrokemoterapija z bleomicinom. Ta ima močan citotoksični učinek tudi na normalne celice, prav tako v določeni meri prehaja v celice tudi brez elektroporacije, medtem ko tega pojava pri CaCl_2 ni. Ugotovili smo, da je za nekatere celične linije potrebna precej visoka koncentracija raztopine CaCl_2 , da opazimo 50-odstoten upad preživetja. Celična linija FaDu se je izkazala za nekoliko bolj odporno na dvige citosolnega Ca^{2+} , saj ima pri nižjih koncentracijah komaj viden učinek, IC_{50} nastopi šele pri 4×10^{-3} M raztopini CaCl_2 . B16F1 se je izkazala za najbolj občutljivo, kjer je koncentracija IC_{50} že pri 2×10^{-3} M raztopini CaCl_2 . Na CHO celice ima elektroporacija v kombinaciji z raztopino CaCl_2 manjši učinek (IC_{50} pri 5×10^{-3} M raztopini CaCl_2), medtem ko je IC_{50} endotelijskih celic HUVEC že pri 3×10^{-3} M raztopini CaCl_2 . Dokazali smo, da je normalna celična linija CHO res neobčutljiva, kar je v skladu z že izvedenimi raziskavami, ki so jih opravili Frandsen in sod. (2012, 2015), Hansen in sod. (2015) ter Zielichowska in sod. (2015). Vsi navajajo diferencialen učinek na normalne in tumorske celice, pri čemer naj bi bile tumorske celice občutljivejše kot normalne. V omenjenih raziskavah navajajo občutno zmanjšanje preživetja tumorskih celic pri koncentracijah CaCl_2 , ki so višje od 1×10^{-3} M, te koncentracije pa nimajo zelo očitnega učinka na normalne celične linije. Vendar se je pri naših poskusih izkazalo, da so normalne endotelijske celice HUVEC bolj občutljive kot tumorske celice FaDu, torej ne moremo trditi, da ima diferencialen učinek. Učinek terapije na endotelijske celice do sedaj še ni bil preverjen in naši rezultati bi lahko nakazovali na žilno specifično delovanje terapije.

5.2 KONCENTRACIJA ZNOTRAJCELIČNEGA ATP

Predlagani mehanizem za večjo občutljivost tumorskih celic proti normalnim na elektroporacijo v prisotnosti visokih zunajceličnih koncentracij CaCl_2 je, da pride do znižanja znotrajcelične koncentracije ATP. To naj bi se zgodilo zaradi izgube ATP skozi membrane po njihovi permeabilizaciji (Rols in Teissié, 1990), povečane porabe ATP molekul s strani ATPaz, ki aktivno črpajo Ca^{2+} in Na^+ v celične predelke (ER in mitohondrije) ali ven iz celice ter znižanja nastajanja ATP zaradi motenj mitohondrijskega metabolizma. Zaradi preobremenitve celice s Ca^{2+} in posledično povišanih potreb po energiji, da celica zopet vzpostavi ravnotežje, naj bi energijsko bolj potratne tumorske celice to težje dosegle in bi bile zato dovzetnejše za celično smrt (Frandsen in sod., 2012).

Po testu citotoksičnosti, ki smo ga opravili po 3 dneh, smo želeli ovrednotiti znotrajcelično koncentracijo ATP po elektroporaciji v kombinaciji z raztopino CaCl_2 ali po elektrokemoterapiji z bleomicinom. Opazili smo, da se po elektrokemoterapiji z bleomicinom znotrajcelična koncentracija ATP po 1 uri inkubacije močno zniža le pri najvišjih koncentracijah, kar pa je najverjetneje posledica tega, da večina celic pri teh koncentracijah odmre, kot je razvidno iz testa citotoksičnosti. Pri nižjih koncentracijah bleomicina, kjer sicer ne pride do znižanja koncentracije ATP, vendar pa na grafu citotoksičnosti vidimo, da celice tudi odmrejo, lahko sklepamo, da do celične smrti pride kasneje. Po 1 uri se tudi ne zmanjša koncentracija bleomicina v celici, torej to ne vpliva na znotrajcelično koncentracijo ATP. Bleomicin povzroča prelome DNA, ki jih celice lahko skušajo popraviti in odmrejo šele, če jim to ne uspe. Celice največkrat zaznajo napake v DNA, ko se želijo deliti, in takrat sprožijo celično smrt. Ta je v primeru delovanja bleomicina apoptoza (Tounekti in sod, 1993), pri kateri se porablja ATP, vendar se to v tako kratkem času inkubacije ne pokaže, zato nismo zaznali znižanja koncentracije ATP. Izkazalo se je, da se po elektroporaciji v prisotnosti raztopine CaCl_2 , že pri nizkih koncentracijah raztopine zniža znotrajcelična koncentracija ATP, kar je odvisno od uporabljenega odmerka, saj se pri vseh celičnih linijah občutneje zniža pri višjih koncentracijah CaCl_2 . Največji upad v primeru tumorskih celic je opazen pri B16F1, najmanj pa pri FaDu celicah, kar se tudi sklada s testom citotoksičnosti, ki je pokazal večji učinek na preživetje celic pri B16F1 celični liniji. V CHO in HUVEC celicah prav tako koncentracija ATP precej upade že pri nizkih koncentracijah CaCl_2 , vendar pri CHO celicah to nima tako močnega vpliva na preživetje, kot ga ima na HUVEC celice, kar kaže na to, da celice CHO hitreje premostijo preobremenitev s Ca^{2+} in ponovno vzpostavijo notranje ravnotežje z učinkovitim odstranjevanjem Ca^{2+} iz citosola. Izsledki se ujemajo z raziskavami Frandsenove in sod. (2015), ki navajajo, da po elektroporaciji v kombinaciji z različnimi koncentracijami raztopine CaCl_2 upade znotrajcelična koncentracija ATP pri vseh uporabljenih celičnih linijah. Ta ostane nizka še nekaj ur po sami terapiji, zaradi česar v določeni meri pade tudi viabilnost celic. Tumorske celice naj ne bi zadostile povišanim energijskim potrebam za izčrpavanje Ca^{2+} iz citosola, saj večino energije porabijo za proliferacijo in zato odmrejo.

5.3 DOLOČEVANJE TIPA CELIČNE SMRTI

V splošnem je tip celične smrti odvisen od celičnega tipa, energijskega metabolizma celice, sprožene signalne poti in samega dražljaja. V glavnem se tip celične smrti določa z vidika morfoloških lastnosti ter s pomočjo molekularnih metod. Velikokrat je odvisen od jakosti

dražljaja, prav tako pa tudi od samega energetskega stanja celice. Nizek nivo koncentracije ATP ali motena produkcija ATP navadno vodi v nekrozo (Ziegler in Groscurth, 2004). V raziskavi Zielichowska in sod. (2016) na normalnih podganjih mišičnih celicah L6 in celicah mišjega fibrosarkoma WEHI-164 navajajo, da pride v teh celicah po terapiji predvsem do apoptoze. V naši raziskavi smo želeli potrditi ugotovitve Frandsenove in sod. (2012), da elektroporacija v kombinaciji z raztopino CaCl_2 pri IC_{50} koncentraciji v glavnem povzroči nekrotično in le v manjši meri apoptotično celično smrt. To smo ugotavljali na podlagi morfoloških lastnosti celic. Apoptoza je morfološko vidna kot zaokroženje celice, zmanjšanje celičnega in jedrnega volumna (piknoza), kot pojavljanje apoptotskih teles, kondenzacija kromatina ter brstenje celične membrane. Nekrozo lahko morfološko opredelimo z nabrekanjem citoplazme in njenim izlitjem v okolico zaradi predrtja celične membrane, obsežnim brstjenjem membrane in tudi zmerno kondenzacijo jedra (Galluzzi in sod., 2007; Ulukaya in sod., 2011). Nekrotično celično smrt lahko z barvanjem po Giemsi ločimo tudi po barvi citoplazme, ki se obarva rožnato, kar pomeni, da je zaradi nabrekanja organelov prišlo do sprostitve vsebine lizosomov in do zakisanja citoplazme. Ugotovitev, da elektroporacija v prisotnosti raztopine CaCl_2 v največji meri povzroči nekrotično celično smrt, se sklada z našo hipotezo, saj je za apoptozo potrebna energija v obliki ATP, na prejšnjih poskusih pa smo dokazali, da se v celicah po terapiji koncentracija ATP močno zmanjša. To tudi pomeni, da bi s to terapijo lahko vplivali tudi na tumorske celice, ki so razvile toleranco na apoptotično celično smrt.

V določeni meri opazimo nekrotične celice tudi v kontrolnih skupinah, kar je verjetno posledica kemičnih in mehanskih poškodb celic med samo pripravo preparatov in odmiranja celic zaradi normalnega celičnega cikla. Kljub temu pa je opazno, da je v terapevtski skupini delež takih celic veliko večji.

5.4 ANTIANGIOGENI UČINEK NA ENDOTELIJSKE CELICE

V tumorjih so tudi endotelijske celice, ki sestavljajo žile, te pa imajo pomemben vpliv na razvoj in napredovanje tumorjev. Za nastanek žil je potrebna migracija endotelijskih celic in njihova proliferacija, da lahko tvorijo ustrezne strukture žil. Za to uporabljamo dva testa *in vitro*, in sicer test celjenja »rane«, s katerim spremljamo migracijo celic, ter test tvorbe kapilaram podobnih struktur endotelijskih celic. Z omenjenima testoma smo preverjali antiangiogeni učinek elektroporacije v kombinaciji z raztopino CaCl_2 na endotelijske celice HUVEC. Angiogeneza je nujna za rast tumorjev in metastaziranje rakavih celic, zato je njena inhibicija zanimiv pristop pri zdravljenju raka. Pri poskusu smo ugotavljali učinek na migracijo endotelijskih celic in nastanek kapilaram podobnih struktur, ne pa tudi učinka na molekularne mehanizme, ki so pri tem vpleteni. Migracija endotelijskih celic je natančno uravnavan molekularni proces, ki vključuje dinamično koordinirane spremembe v celični adheziji, signalni transdukciji in spremembe v citoskeletni dinamiki in organizaciji (Lamalice in sod., 2007). V raziskavi smo dokazali, da se migracija endotelijskih celic HUVEC značilno zmanjša po elektroporaciji v prisotnosti raztopine CaCl_2 . Možna razlaga je učinek elektroporacije na citoskelet celic, ker dovedeni električni pulzi vplivajo na proteine citoskeleta (aktinske filamente in mikrotubule). Ti po elektroporaciji potrebujejo nekaj časa, da se organizirajo v prvotno stanje in znova omogočijo gibanje celic (Meulenberg in sod., 2012). Tudi sam Ca^{2+} vpliva na citoskelet, saj se veže na številne citoskeletne proteine in ima ključno regulatorno vlogo za normalno funkcijo in dinamiko aktinskega citoskeleta, ki je občutljiv na spremembe v citosolni koncentraciji Ca^{2+} , kar

učinjuje na kontraktilnost, proteine za ločevanje in povezovanje aktina ter s kalmodulinom regulirane proteine (Furukawa in sod., 2003). Za te procese pa je potreben tudi ATP, za katerega smo dokazali, da se njegova koncentracija v HUVEC celicah po elektroporaciji v kombinaciji z raztopino CaCl_2 pri IC_{50} zmanjša za 60 %. Prav tako smo ugotovili, da ima terapija vpliv na nastanek kapilaram podobnih struktur, kar se sklada z ugotovitvami testa celjenja »rane«, saj je tudi za ta proces potrebna migracija celic. Učinke na endotelijske celice v *in vitro* poskusih bi bilo smiselno preveriti tudi *in vivo* s preučevanjem učinka na normalno in tumorsko žilje. Razmnoževanje tumorskih celic je namreč odvisno od dostave hranil in kisika. V kolikor vsaj začasno, preko delovanja na celice tumorskega žilja, tumorske celice odrežemo od teh faktorjev, lahko tudi preko te poti vplivamo na preživetje tumorskih celic. V poskusih *in vitro* smo ugotovili, da ima elektroporacija v prisotnosti raztopine CaCl_2 antiangiogeni učinek, *in vivo* pa verjetno tudi žilno razdiralni učinek, saj se ta dva učinka pogosto prepletata.

5.5 UČINEK NA MIGRACIJO TUMORSKIH IN NORMALNIH CELIC

Poleg učinka na migracijo endotelijskih celic HUVEC smo v raziskavi preverili tudi učinek elektroporacije v kombinaciji z raztopino CaCl_2 pri IC_{50} koncentraciji na migracijo ostalih treh izbranih celičnih linij. B16F1 se je sicer izkazala za neprimerno za izbrani test celjenja »rane«, uspeli pa smo učinek preveriti na FaDu in CHO celicah. Po računalniški obdelavi slik z merjenjem površine prostora med celicami smo prišli do zaključka, da pri obeh celičnih linijah ni statistične razlike v stopnji migracije pri terapevtskih skupinah z elektroporacijo v prisotnosti raztopine CaCl_2 v primerjavi s kontrolnimi skupinami (celice brez EP, celice z EP in celice z raztopino CaCl_2). Čeprav kombinacija elektroporacije z raztopino CaCl_2 ne zmanjša stopnje migracije CHO in FaDu celic, kakor smo predpostavili, lahko različno učinkuje na migracijo glede na celični tip, kot je to v primeru delovanja na celice HUVEC. Za razjasnitev tega pojava bi bile potrebne nadaljnje raziskave. Glede na to, da z omenjenim testom celjenja »rane« ocenjujemo sposobnost zasevanja tumorskih celic, lahko iz naših rezultatov sklepamo, da elektroporacija v kombinaciji z raztopino CaCl_2 ne zmanjša sposobnosti metastaziranja tumorskih celic.

6 SKLEPI

V okviru magistrske naloge smo želeli preveriti učinke elektroporacije v kombinaciji z raztopino CaCl_2 pri različnih koncentracijah na različnih tumorskih in normalnih celičnih linijah, rezultate pa smo primerjali tudi z elektrokemoterapijo z bleomicinom. Pri tem se je izkazalo, da elektroporacija v prisotnosti raztopine CaCl_2 nima diferencialnega učinka na tumorske in normalne celice.

Izbrali smo štiri celične linije: endotelijske celice iz človeške popkovnične vene HUVEC, humane celice ploščatoceličnega karcinoma ustnega žrela FaDu, celično linijo mišjega melanoma z nizkim metastatskim potencialom B16F1 in celično linijo ovarijskih celic kitajskega hrčka CHO, na katerih smo nato preverjali učinke terapije na biološke lastnosti teh celic.

V magistrski nalogi smo dokazali:

- da ima elektroporacija v kombinaciji z raztopino CaCl_2 citotoksičen učinek na izbrane tumorske in normalne celice, saj je zmanjšano njihovo preživetje, sama raztopina CaCl_2 pa nima citotoksičnega učinka,
- da elektroporacija v kombinaciji z raztopino CaCl_2 zniža znotrajcelično koncentracijo energijsko bogate molekule ATP,
- da elektroporacija v kombinaciji z raztopino CaCl_2 povzroči večinoma nekrotično celično smrt pri vseh celičnih linijah,
- da ima elektroporacija v kombinaciji z raztopino CaCl_2 zmanjša sposobnost tvorbe kapilaram podobnih struktur endotelijskih celic HUVEC in zmanjša stopnjo njihove migracije,
- da elektroporacija v kombinaciji z raztopino CaCl_2 nima učinka na stopnjo migracije celic CHO in FaDu.

S tem smo potrdili 1. in 3. hipotezo, da elektroporacija v kombinaciji z raztopino CaCl_2 zmanjša preživetje tumorskih in normalnih celic in da zmanjša sposobnost tvorbe kapilaram podobnih struktur endotelijskih celic. Delno pa smo potrdili 2. hipotezo, saj terapija zmanjša migracijo endotelijskih HUVEC celic, ne pa tudi CHO in FaDu.

7 POVZETEK

7.1 POVZETEK

Rak je skupina bolezni, ki jih opredeljuje nekontrolirana delitev celic različnih tkiv in organov ter njihova invazija in metastaziranje v druge organe. V globalnem merilu je eden od vodilnih vzrokov smrti, kljub večanju incidence pa se manjša umrljivost, kar pomeni, da se pristopi k zdravljenju izboljšujejo. Eden od novejših pristopov lokalnega zdravljenja je elektrokemoterapija, pri kateri se uporablja kombinacijo kemoterapije in elektroporacije za povečanje prepustnosti celične membrane. S tem dosežemo povečano terapevtsko učinkovitost protitumorne učinkovine, katere prehod v celice je drugače omejen. Trenutno sta v klinični uporabi dve taki učinkovini, in sicer bleomicin ter cisplatin, potekajo pa tudi raziskave drugih učinkovin. Prednost elektrokemoterapije je v tem, da dosežemo lokalizirano toksičnost, povečano učinkovitost učinkovine in zmanjšanje sistemskih neželenih stranskih učinkov.

Elektroporacija v kombinaciji z raztopino CaCl_2 vse bolj pridobiva na veljavi za lokalno zdravljenje tumorjev. V zadnjih raziskavah se je izkazalo, da ima elektroporacija v prisotnosti visoke zunajcelične koncentracije CaCl_2 podoben učinek kot elektrokemoterapija, saj se je po terapiji efektivno zmanjšalo preživetje tumorskih celic, rast sferoidov in tumorjev, kar naj bi se zgodilo predvsem zaradi motenj v produkciji energije in posledično normalnih celičnih funkcij. Učinek terapije na tumorske in normalne celice naj bi bil različen, zaradi česar naj bi bili manjši tudi neželeni stranski učinki na normalno tkivo, ki obdaja tumor *in vivo*, kar smo želeli preveriti tudi v naši raziskavi.

Učinek elektroporacije v kombinaciji z raztopino CaCl_2 smo preverili na dveh tumorskih celičnih linijah (mišji melanom z nizkim metastatskim potencialom B16F1 in humanih celicah ploščatoceličnega karcinoma ustnega žrela FaDu) ter dveh normalnih celičnih linijah (endotelijske celice iz človeške popkovnične vene HUVEC in celično linijo ovarijskih celic kitajskega hrčka CHO). V elektroporacijskem pufru smo pripravili gosto celično suspenzijo, ki je vsebovala 1.0 – 5.0 mM raztopino CaCl_2 . Suspenzijo celic smo dali med dve vzporedni ploščati elektrodi iz nerjavečega jekla z razmikom 2 mm in dovedli osem pravokotnih električnih pulzov (1300 V/cm, 100 μs , 1 Hz). Elektrokemoterapijo z bleomicinom (1.4×10^{-11} – 1.4×10^{-6} M) smo naredili za pozitivno kontrolo. Po terapiji smo z reagentom PrestoBlue izmerili citotoksičnost, izmerili smo tudi znotrajcelično koncentracijo ATP s kompletom, ki temelji na aktivnosti luciferaze za tvorbo svetlobe ob prisotnosti ATP ter z barvanjem po Giemsi na podlagi morfologije celic določevali prevladujoč tip celične smrti. Preverili smo tudi učinek terapije na migracijo celic s testom celjenja »rane«, kjer smo spremljali zapiranje razmika med nasajenimi celicami od odstranitve silikonskih vstavkov dokler se ni razmik popolnoma zaprl. Na endotelijskih celicah HUVEC smo preverili še učinek na sposobnost tvorbe kapilaram podobnih struktur na Matrigelu.

Kombinacija elektroporacije in raztopine CaCl_2 se je izkazala za citotoksično tako za tumorske kot za normalne celične linije, pri čemer je IC_{50} za B16F1 IC_{50} 2.2 mM, za HUVEC 3.1 mM, za FaDu 4 mM in za CHO 5 mM, kar pomeni, da ni diferencialnega učinka na citotoksičnost med normalnimi in tumorskimi celicami. CHO so se res izkazale za najmanj občutljive, vendar pa smo dokazali, da deluje na endotelijske celice HUVEC.

Sama raztopina CaCl_2 nima citotoksičnega učinka. Po terapiji je prišlo do znižanja znotrajcelične koncentracije ATP, odstotek upada je bil odvisen od koncentracije CaCl_2 raztopine. Padec koncentracije ATP nekoliko sovпада s krivuljo citotoksičnosti, medtem ko je elektrokemoterapija z bleomicinom povzročila padec le pri najvišjih koncentracijah, pri katerih večina celic odmre. ATP je pomemben za normalno delovanje celice, kar se zaradi povišanih potreb po energiji tumorskih celic kaže tudi v citotoksičnem delovanju terapije. Barvanje po Giemsi je pokazalo, da elektroporacija v kombinaciji z raztopino CaCl_2 (IC_{50}) pri vseh celičnih linijah povzroči nekrotično celično smrt, saj je opaziti veliko celic z za nekrozo značilnimi morfološkimi lastnostmi. Terapija je prav tako pokazala, da ima elektroporacija v prisotnosti raztopine CaCl_2 antiangiogeni učinek, saj je bila zmanjšana stopnja migracije endotelijskih celic HUVEC in sposobnost tvorbe kapilaram podobnih struktur pri IC_{50} koncentraciji. Pri CHO in FaDu celičnima linijama terapija ni imela učinka na stopnjo migracije celic.

Elektroporacija v kombinaciji z raztopino CaCl_2 je pokazala citotoksičen in antiangiogeni učinek v *in vitro* poskusih na tumorske in normalne celice. Nadaljnje raziskave pa so potrebne, da bi bolje razumeli in ovrednotili mehanizme delovanja na več vrstah tumorskih in normalnih celic.

7.2 SUMMARY

Cancer is a group of diseases that are characterized by uncontrolled cell division, invasion and metastases on secondary sites in the body. Cancer is one of the leading causes of death in the world. Although the incidence is increasing, mortality is somewhat decreasing, which means that cancer treatment is improving. One of the novel local cancer treatments is electrochemotherapy, which uses the combination of chemotherapeutic drug and electroporation. Application of electric pulses causes reversible permeabilisation of cell membranes, which allows the entry of poorly permeating chemotherapeutic drugs. Most commonly used drugs for electrochemotherapy are bleomycin and cisplatin, but many other substances are also being tested *in vitro* and *in vivo*, one of such is also calcium. By performing local electroporation, drug delivery of hydrophilic drugs in tumors and their cytotoxicity can be considerably potentiated with less adverse side effects on normal tissues.

Calcium electroporation is gaining on its value as anti-cancer treatment. Recent studies demonstrated that calcium electroporation effectively reduced survival of cancer cells, growth of spheroids and tumors. Calcium is a tightly regulated second messenger that is involved in regulation of transcription, proliferation, metabolism, apoptosis, necrosis, migration, and many other cellular processes. Introducing calcium into the cell cytosol by electroporation has been associated with severe disruption of cell energy production and therefore normal cell functions. The effect might be differential for cancer and normal cells, thus calcium electroporation could have limited adverse effects on the surrounding normal tissue *in vivo*. Therefore, further studies comparing the effect of calcium electroporation on tumor and normal cells are needed, which was the aim of this study.

We evaluated the effect of calcium electroporation on two cancer cell lines (B16F1 mouse melanoma and FaDu human pharyngeal squamous cell carcinoma) and on two normal cell lines (HUVEC human endothelial cell line and CHO Chinese hamster ovary cell line). Dense cell suspension was prepared in electroporation medium containing 1.0 – 5.0 mM calcium chloride (CaCl_2), placed between two flat parallel stainless steel electrodes with a 2-mm gap and subjected to eight square-wave electric pulses (1300 V/cm, 100 μs , 1 Hz). Electrochemotherapy with bleomycin (1.4×10^{-11} – 1.4×10^{-6} M) was used as a positive control. After treatment, we evaluated cytotoxicity with Presto Blue viability assay, measured ATP concentration with ATP determination kit, based on luciferase bioluminescence activity when exposed to ATP, evaluated cell morphology and type of cell death with giemsa staining. We also evaluated effect on cell migration with wound healing assay and anti-angiogenic effect on HUVEC endothelial cells with tube formation assay on Matrigel.

Calcium electroporation was cytotoxic in both cancer and normal cell lines with IC_{50} being 2.2 mM for B16F1, 3.1 mM for HUVEC, 4 mM for FaDu and 5 mM for CHO cell line, therefore differential effect on cytotoxicity between cancer and normal cell lines was not observed. CHO cells showed to be more resilient, but we proved the effects on endothelial cells HUVEC. Calcium electroporation caused dose-dependent ATP depletion, which appears to follow same trend as cytotoxicity curve, whereas electrochemotherapy caused ATP depletion only when high concentrations of bleomycin were used, where most of the cells were dead. Giemsa staining revealed that calcium electroporation induces

mostly necrotic cell death as many eosinophilic fragmented cells were observed after staining in all cell lines. Treatment with calcium electroporation also appears to have anti-angiogenic effect, as it resulted in reduced migration in wound healing assay and reduced tube formation of HUVEC endothelial cells at IC_{50} concentration. There seems to be no effect of calcium electroporation on reducing migration of FaDu and CHO cells in wound healing assay at IC_{50} concentrations.

In our *in vitro* study we showed cytotoxic and anti-angiogenic effect of calcium electroporation on both cancer and normal cells. Further studies are needed to fully elucidate the mechanisms of action of calcium electroporation and on other cell types.

8 VIRI

- Alberts, B., D. Bray, K. Hopkin, A. Johnson, J. Lewis, M. Raff, K. Roberts, P. Walter. 2010. Essential cell biology. 3rd ed. New York, London: Garland Science: 731 str.
- Baba, A.I., C. Cătoi. Comparative Oncology. Chapter 3, Tumor Cell Morphology. Bucharest: The Publishing House of the Romanian Academy. 2007. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK9553/> (april 2016)
- Bergers, G., L.E. Benjamin. 2003. Tumorigenesis and the Angiogenic Switch. Nature Reviews Cancer, 6: 401-410
- Berridge, M.J. 1995. Calcium signalling and cell proliferation. Bioessays, 17: 491-500
- Campana, L.G., A. J. P. Clover, S. Valpione, P. Quaglino, J. Gehl, C. Kunte, M. Snoj, M. Cemazar, C. R. Rossi, D. Miklavcic, G. Sersa. 2016. Recommendations for Improving the Quality of Reporting Clinical Electrochemotherapy Studies Based on Qualitative Systematic Review. Radiology And Oncology, 50, 1: 1-13
- Cerella, C., M. Diederich, L. Ghibelli. 2010. The Dual Role of Calcium as Messenger and Stressor in Cell Damage, Death, and Survival. International Journal of Cell Biology, 1-14
- Chabot, S., S. Pelofy, J. Teissié, M. Golzio. 2013. Delivery of RNAi-Based Oligonucleotides by Electroporabilization. Pharmaceuticals, 6: 510-521
- Chung, A.S., J. Lee, N. Ferrara. 2010. Targeting the tumour vasculature: insights from physiological angiogenesis. Nature Reviews Cancer, 7: 505
- Clapham, D. E. 2007. Calcium Signaling. Cell, 131: 1047-1058
- Cross, D., J. K. Burmester. 2006. Gene Therapy for Cancer Treatment: Past, Present and Future. Clinical Medicine & Research, 4, 3: 218-227
- Dor, Y., R. Porat, E. Keshet. 2001. Vascular Endothelial Growth Factor and Vascular Adjustments to Perturbations in Oxygen Homeostasis. The American Journal of Physiology, 280, 6: 1367-1374
- Fife, C. M., J. A. Mccarroll, M. Kavallaris. 2014. Movers and Shakers: Cell Cytoskeleton in Cancer Metastasis. British Journal of Pharmacology, 171, 24: 5507-5523
- Frandsen, S. K., H. Gissel, P. Hojman, J. Eriksen, J. Gehl. 2014. Calcium Electroporation in Three Cell Lines: A Comparison of Bleomycin and Calcium, Calcium Compounds, and Pulsing Conditions. BBA - General Subjects, 1840: 1204-1208
- Frandsen, S. K., H. Gissel, P. Hojman, T. Tramm, J. Eriksen, J. Gehl. 2012. Direct Therapeutic Applications of Calcium Electroporation to Effectively Induce Tumor Necrosis. Cancer Research, 72, 6: 1336-1341

- Frandsen, S. K., L. Gibot, M. Madi, J. Gehl, M.P. Rols. 2015. Calcium Electroporation: Evidence for Differential Effects in Normal and Malignant Cell Lines, Evaluated in a 3D Spheroid Model. *PLoS ONE*, 10, 12: 1-11
- Furukawa, R., A. Maselli, S. A.M. Thomson, R. W.L. Lim, J. V. Stokes, M. Fechheimer. 2003. Calcium Regulation of Actin Crosslinking Is Important for Function of the Actin Cytoskeleton in Dictyostelium. *Journal of Cell Science*, 116, 1: 187-196
- Galluzzi, L., M.C. Maiuri, I. Vitale, H. Zischka, M. Castedo, L. Zitvogel, G. Kroemer. 2007. Cell Death Modalities: Classification and Pathophysiological Implications. *Cell Death & Differentiation*, 14, 7: 1237-1243
- Gehl, J. 2008. Electroporation for Drug and Gene Delivery in the Clinic: Doctors Go Electric. Pogl. 27 v *Electroporation Protocols: Preclinical and Clinical Gene Medicine*, Totowa: Humana Press: 351-359
- Gerber, D. E. 2008. Targeted Therapies: A New Generation of Cancer Treatments. *American Family Physician*, 77, 3: 311-319
- Giorgi, C., A. Romagnoli, P. Pinton, R. Rizzuto. 2008. Ca^{2+} Signaling, Mitochondria and Cell Death. *Current Molecular Medicine*, 8, 2: 119-130
- Golzio, M., B. Gabriel, F. Boissier, J. Deuville, M. P. Rols, J. Teissié. 2003. Calcium and Electroporabilized Cells. *Journal De La Société De Biologie*, 197, 3: 301-310
- Hanahan, D., R. A. Weinberg. 2011. Hallmarks of cancer: The next generation. *Cell*, 144, 5: 646-674
- Hanahan, D., R. A. Weinberg. 2000. The Hallmarks of Cancer. *Cell*, 100, 1: 57-70
- Hansen, E. L., E. B. Sozer, S. Romeo, S. K. Frandsen, P. T. Vernier, J. Gehl. 2015. Dose-dependent ATP depletion and cancer cell death following calcium electroporation, relative effect of calcium concentration and electric field strength. *PLoS ONE*, 10, 4: 1-12
- Hui, S.W. 2008. Overview of Drug Delivery and Alternative Methods to Electroporation. Pogl. 6 v *Electroporation Protocols: Preclinical and Clinical Gene Medicine*. Totowa: Humana Press: 91-107
- Kee, S.T., J. Gehl, E.W. Lee. 2011. Clinical aspects of electroporation. New York, Springer Science: 256 str.
- Kerbel, R., J. Folkman. 2002. Clinical translation of angiogenesis inhibitors. *Nature Reviews Cancer*, 2, 10: 727-739
- Klionsky, D.J., S.D. Emr. 2000. Autophagy as a regulated pathway of cellular degradation. *Science*, 290: 1717-1721
- Kotnik, T., P. Kramar, G. Pucihar, D. Miklavčič, M. Tarek. 2012. Cell membrane electroporation- Part 1: The phenomenon. *IEEE Electrical Insulation Magazine*, 28, 5: 14-23

- Lamalice, L., F. Le Boeuf, J. Huot. 2007. Endothelial Cell Migration During Angiogenesis. *Circulation Research*, 100: 782-794
- Langley, R. R., I. J. Fidler. 2011. The seed and soil hypothesis revisited—the role of tumor-stroma interactions in metastasis to different organs. *International Journal of Cancer*, 128, 11: 2527-2535
- Markelc, B., E. Skvarca, T. Dolinsek, V. Prevodnik Kloboves, A. Coer, G. Sersa, M. Cemazar. 2015. Inhibitor of Endocytosis Impairs Gene Electrotransfer to Mouse Muscle *in Vivo*. *Bioelectrochemistry*, 103: 111-119
- Meulenberg, C. J.W., M. Cemazar, V. Todorovic. 2012. Differential Cellular Effects of Electroporation and Electrochemotherapy in Monolayers of Human Microvascular Endothelial Cells. *PLoS ONE*, 7, 12: 1-9
- Miklavčič, D., G. Serša, E. Brecelj, J. Gehl, D. Soden, G. Bianchi, P. Ruggieri, C.R. Rossi, L.G. Campana, T. Jarm. 2012. Electrochemotherapy: Technological Advancements for Efficient Electroporation-based Treatment of Internal Tumors. *Medical & Biological Engineering & Computing*, 50, 12: 1213-1225
- Morotomi-Yano, K., H. Akiyama, K.I. Yano. 2014. Different Involvement of Extracellular Calcium in Two Modes of Cell Death Induced by Nanosecond Pulsed Electric Fields. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 555-556: 47-54
- Neumann, E., M. Schaefer-Ridder, Y. Wang, P.H. Hofschneider. 1982. Gene transfer into mouse lyoma cells by electroporation in high electric fields. *EMBO Journal*, 1, 7: 841-845
- Novaković, S., M. Hočevár, B. Jezeršek Novaković, P. Stroján, J. Žgajnar, Z. Rudolf, M. Sok. 2009. *Onkologija: raziskovanje, diagnostika in zdravljenje raka*. Ljubljana, Mladinska knjiga: 425 str.
- Orrenius, S., B. Zhivotovsky, P. Nicotera. 2003. „Calcium: Regulation of Cell Death: The Calcium-apoptosis Link.“ *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 4,7: 552
- Patergnani, S., J. M. Suski, C. Agnoletto, A. Bononi, M. Bonora, S. Marchi, S. Missiroli, F. Poletti, A. Rimessi, J. Duszynski, M. R. Wieckowski, P. Pinton. 2011. Calcium Signaling around Mitochondria Associated Membranes (MAMs). *Cell Communication & Signaling*, 9, 1: 19-29
- Pecorino, L. 2012. *Molecular biology of Cancer. Mechanisms, targets and therapeutics*. 3rd ed.. Oxford, OUP Oxford: 360 str.
- Qu, B., D. Al-Ansary, C. Kummerow, M. Hoth, E.C. Schwarz. 2011. ORAI-mediated calcium influx in T cell proliferation, apoptosis and tolerance. *Cell Calcium*, 50: 261-269
- Rabussay, D.P., P.M. Goldfarb, G.S. Nanda. 2002. Enhancing the Effectiveness of Drug-based Cancer Therapy by Electroporation (electropermeabilization). *Technology in Cancer Research and Treatment*, 1, 1: 71-82

- Rak v Sloveniji 2011. Ljubljana: Onkološki inštitut Ljubljana, Epidemiologija in register raka, Register raka Republike Slovenije, 2015.
<http://www.onko-i.si/rrs/> (februar 2016)
- Rols, M. P., J. Teissié. 1990. Electroporabilization of Mammalian Cells. Quantitative Analysis of the Phenomenon. *Biophysical Journal*, 58, 5: 1089-1098
- Rosazza, C., H. Deschout, A. Buntz, K. Braeckmans, M.P. Rols, A. Zumbusch. 2016. Endocytosis and Endosomal Trafficking of DNA After Gene Electrotransfer In Vitro. *Molecular Therapy. Nucleic Acids*, 5: 1-11
- Schindelin, J., I. Arganda-Carreras, E. Frise, V. Kaynig, M. Longair, T. Pietzsch, S. Preibisch, C. Rueden, S. Saalfeld, B. Schmid, J. Y. Tinevez, D. J. White, V. Hartenstein, K. Eliceiri, P. Tomancak, A. Cardona. 2012. Fiji: An Open-source Platform for Biological-image Analysis. *Nature Methods*, 9, 7: 676-682
- Schwarz, Eva C., Bin Qu, Markus Hoth. 2013. Review: Calcium, Cancer and Killing: The Role of Calcium in Killing Cancer Cells by Cytotoxic T Lymphocytes and Natural Killer Cells. *BBA - Molecular Cell Research*, 1833: 1603-1611
- Serša, G., D. Miklavčič, M. Čemažar, Z. Rudolf, G. Pucihar, M. Snoj. 2008. Electrochemotherapy in Treatment of Tumours. *European Journal of Surgical Oncology*, 34: 232-240
- Serša, G., B. Štabuc, M. Čemažar, D. Miklavčič, Z. Rudolf. 2000. Electrochemotherapy with Cisplatin: Clinical Experience in Malignant Melanoma Patients. *Clinical Cancer Research*, 6: 863-867
- Siemann, D.W. 2011. The Unique Characteristics of Tumor Vasculature and Preclinical Evidence for Its Selective Disruption by Tumor-Vascular Disrupting Agents. *Cancer Treatment Reviews*, 37, 1: 63-74
- Stewart, T. A., K.T.D.S. Yapa, G. R. Monteith. 2015. Review: Altered Calcium Signaling in Cancer Cells. *BBA - Biomembranes*, 1848. Part B: 2502-2511
- Tounekti, O., G. Pron, J.J. Belehradek, L.M. Mir. 1993. Bleomycin, an Apoptosis-mimetic Drug That Induces Two Types of Cell Death Depending on the Number of Molecules Internalized. *Cancer Research*, 53, 15: 5462-5469
- Ulukaya, E., C. Acilan, F. Ari, E. Ikitimur, Y. Yilmaz. 2011. A Glance at the Methods for Detection of Apoptosis Qualitatively and Quantitatively. *Turkish Journal of Biochemistry*, 36: 261-269.
- Weinberg, R. A. 2014. *The Biology of Cancer*. 2nd edition. New York: Garland Science: 960 str.
- Yamaguchi, H., J. Wyckoff, J. Condeelis. 2005. Cell migration in tumors. *Current Opinion in Cell Biology*, 17: 559-56

- Yang, N.C., W.M. Ho, Y.H. Chen, M.-L. Hu. 2002. A Convenient One-step Extraction of Cellular ATP Using Boiling Water for the Luciferin-luciferase Assay of ATP. *Analytical Biochemistry*, 306: 323-327
- Yarmush, M. L., A. Golberg, G. Serša, T. Kotnik, D. Miklavčič. 2014. Electroporation-based Technologies for Medicine: Principles, Applications, and Challenges. *Annual Review Of Biomedical Engineering*, 16: 295-320
- Zadnik, V., M. Primic Žakelj. SLORA: Slovenija in rak. *Epidemiologija in register raka*. Onkološki inštitut Ljubljana. www.slora.si (marec 2016)
- Zhivotovsky, B., S. Orrenius. 2011. Calcium and Cell Death Mechanisms: A Perspective from the Cell Death Community. *Cell Calcium*, 50: 211-221
- Ziegler, U., P. Groscurth. 2004. Morphological Features of Cell Death. *Physiology*, 19, 3: 124-128
- Zielichowska, A., M. Daczewska, J. Saczko, O. Michel, J. Kulbacka. 2016. Applications of calcium electroporation to effective apoptosis induction in fibrosarcoma cells and stimulation of normal muscle cells. *Bioelectrochemistry*, 109: 70-78
- Zong, W. X., C. B. Thompson. 2006. Necrotic Death as a Cell Fate. *Genes & Development*, 20, 1: 1-15

ZAHVALA

Najlepša hvala mentorici prof. dr. Maji Čemažar, da mi je omogočila raziskovalno delo na Oddelku za eksperimentalno onkologijo na področju, ki me zanima in poskrbela za nove izzive pri izvedbi poskusov za magistrsko delo ter da si je brez težav vzela čas za pomoč pri razlagi rezultatov in pisanju naloge.

Iz srca se zahvaljujem delovni mentorici dr. Tanji Dolinšek za vložen trud, usmerjanje in pomoč pri izvedbi eksperimentov.

Zahvaljujem se recenzentu prof. dr. Tomu Turku za natančno prebrano nalogo ter popravke in komentarje.

Zahvaljujem se tudi vsem sodelavcem na Oddelku za eksperimentalno onkologijo, ki ste mi kakorkoli pomagali pri izzivih v laboratoriju in poskrbeli za dobro vzdušje.

Moji družini, očetu Jožetu, mami Brigiti, bratu Mitji, babici, tetam in stricem sem iz srca hvaležna, da so mi vsa ta leta stali ob strani ob dobrih in slabih trenutkih ter me vzpodbujali med študijem.

Hvala vsem prijateljem, še posebej Tini in Tjaši, za vso dobro voljo.