

UNIVERZA V LJUBLJANI  
BIOTEHNIŠKA FAKULTETA  
ODDELEK ZA BIOLOGIJO

Rosana HUDEJ

**VPLIV RUTENIJEVE SPOJINE KP1019 IN  
ELEKTROPORACIJE NA PREŽIVETJE  
TUMORSKIH CELIČNIH LINIJ B16F1 IN CHO**  
*in vitro*

DIPLOMSKO DELO

Univerzitetni študij

Ljubljana, 2008

UNIVERZA V LJUBLJANI  
BIOTEHNIŠKA FAKULTETA  
ODDELEK ZA BIOLOGIJO

Rosana HUDEJ

**VPLIV RUTENIJEVE SPOJINE KP1019 IN ELEKTROPORACIJE NA  
PREŽIVETJE TUMORSKIH CELIČNIH LINIJ B16F1 IN CHO *in vitro***

DIPLOMSKO DELO  
Univerzitetni študij

**THE INFLUENCE OF THE RUTHENIUM COMPOUND KP1019 AND  
ELECTROPORATION ON THE VIABILITY OF TUMOUR CELL  
LINES B16F1 AND CHO *in vitro***

GRADUATION THESIS  
University studies

Ljubljana, 2008

## **POSVETILO**

Svoje dosedanje in nadaljnje delo na področju odkrivanja boljših in učinkovitejših načinov zdravljenja raka posvečam svojemu pokojnemu očetu Jožetu Hudeju, ki mi je dal težko, a dragoceno izkušnjo, zaradi katere vidim smisel svojega dela v drugačni luči.

Diplomsko delo je zaključek Univerzitetnega študija biologije. Opravljeno je bilo v Laboratoriju za biokibernetiko na Fakulteti za elektrotehniko Univerze v Ljubljani.

Študijska komisija Oddelka za biologijo je za mentorja diplomskega dela imenovala prof. dr. Damijana Miklavčiča.

Komisija za oceno in zagovor:

Predsednik: prof. dr. Mihael J. TOMAN

Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Oddelek za biologijo

Član: prof. dr. Damijan MIKLAVČIČ

Univerza v Ljubljani, Fakulteta za elektrotehniko

Član: prof. dr. Gregor ANDERLUH

Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Oddelek za biologijo

Datum zagovora: 10. 9. 2008

Delo je rezultat lastnega raziskovalnega dela.

Podpisana se strinjam z objavo svoje naloge v polnem tekstu na spletni strani Digitalne knjižnice Biotehniške fakultete. Izjavljam, da je naloga, ki sem jo oddala v elektronski obliki, identična tiskani verziji.

Rosana Hudej

## KLJUČNA DOKUMENTACIJSKA INFORMACIJA

ŠD	Dn
DK	577.352(043.2)=163.6
KG	Elektrokemoterapija/elektroporacija/kemoterapevtik/KP1019/testi za določanje preživetja celic/test MTT/metoda barvanja s kristal vijoličnim/test klonogenosti
AV	HUDEJ, Rosana
SA	MIKLAVČIČ, Damijan (mentor)
KZ	SI-1000 Ljubljana, Večna pot 111
ZA	Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Oddelek za biologijo
LI	2008
IN	VPLIV RUTENIJEVE SPOJINE KP1019 IN ELEKTROPORACIJE NA PREŽIVETJE CELIČNIH LINIJ B16F1 IN CHO <i>in vitro</i>
TD	Diplomsko delo (Univerzitetni študij)
OP	VII, 42 str., 14 sl.
IJ	Sl
JI	sl/en
AI	Elektroporacija je biofizikalni pojav, pri katerem pride zaradi kratkotrajne izpostavitve celice električnemu polju dovolj visoke jakosti do izrazitega povečanja prepustnosti njene membrane. V kombinaciji s kemoterapevtikom, ki slabo prehaja celično membrano, lahko povzroči znatno povečanje citotoksičnega učinka takega kemoterapevtika. V tej diplomski nalogi smo se najprej osredotočili na primerjavo testov za določanje preživetja celic z namenom, da izberemo najprimernejšega za nadaljnje delo. V poizkusih, ki so sledili, smo na dveh celičnih linijah (B16F1, CHO) primerjali citotoksični učinek rutenijeve spojine KP1019 s citotoksičnim učinkom KP1019 v kombinaciji z elektroporacijo. Pri primerjavi različnih testov za določanje preživetja celičnih linij (test MTT, metoda barvanja s kristal vijoličnim, test klonogenosti) smo primerjali preživetje celic enega poizkusa, izmerjeno z vsemi tremi testi. Poleg tega smo rezultate primerjali tudi glede na dva različna inkubacijska časa. Primerjava je temeljila na vrednosti percentilnega ranga statističnega testa za primerjavo dveh parametrov, Studentovega t-testa. Citotoksični učinek KP1019 v kombinaciji z elektroporacijo ali brez nje smo ovrednotili s primerjavo deležev preživelih celic po različnih tretmajih glede na kontrolo, ki so jo predstavljale netretirane celice. Delež preživelih celic je bil izračunan na podlagi spektrofotometričnih meritev gostote celic v celični suspenziji. Ugotovili smo, da so rezultati preživetja celičnih linij, določeni s testom MTT in metodo barvanja s kristal vijoličnim, kljub veliki razpršenosti posameznih meritev med seboj primerljivi. Podobno smo ugotovili, da so ne glede na čas inkubacije celic rezultati preživetja celičnih linij med seboj primerljivi. V nadaljnjih poizkusih smo preučevali citotoksični učinek kemoterapevtika KP1019 in vpliv elektroporacije na citotoksični učinek KP1019. Zaradi nekontrolirane hidrolize kemoterapevtika KP1019 nam je delavna koncentracija, eden izmed ključnih dejavnikov citotoksičnosti, ostala neznana. Na podlagi rezultatov smo zaključili, da sta test MTT in metoda barvanja s kristal vijoličnim med seboj primerljiva. Tudi rezultati, izmerjeni po različnih inkubacijskih časih, so med seboj primerljivi. Vpliva elektroporacije na citotoksični učinek KP1019 nismo opazili, vendar menimo, da bi bilo smiselno poizkuse ponoviti, pri čemer bi bilo nujno upoštevati hitro hidrolizo KP1019 in ga zato raztopiti v pufri šele tik pred uporabo v poizkusu. Zaradi kompleksnosti fizikalno-kemijskih lastnosti in mehanizma delovanja KP1019 pa predlagamo ločeno preučevanje transmembranskega transporta KP1019 in njegovega citotoksičnega delovanja.

## KEY WORDS DOCUMENTATION

DN Dn  
DC 577.352(043.2)=163.6  
CX Electrochemotherapy/electroporation/chemotherapeutic/KP1019/cell viability assays/MTT assay/ crystal violet staining /clonogenic assay  
AU HUDEJ, Rosana  
AA MIKLAVČIČ, Damijan (supervisor)  
PP SI-1000 Ljubljana, Večna pot 111  
PB University of Ljubljana, Biotechnical faculty, Department of Biology  
PY 2008  
TI THE INFLUENCE OF THE RUTHENIUM COMPOUND KP1019 AND ELECTROPORATION ON THE VIABILITY OF TUMOUR CELL LINES B16F1 AND CHO *in vitro*  
DT Graduation Thesis (University studies)  
NO VII, 42 p., 14 fig.  
LA Sl  
AL sl/en  
AB Electroporation is a biophysical process at which a short-term cell exposure to a high-voltage electric field causes a prominent increase in a cell's membrane permeability. Together with a chemotherapeutic that can hardly pass the cell's membrane, electroporation can lead to a considerable increase in the cytotoxic effect of the chemotherapeutic. For the purpose of this diploma thesis we first focussed on the comparison of cell viability tests in order to find the most suitable one for our future work. During further experiments on two cell lines (B16F1, CHO) we compared the cytotoxic effect of ruthenium compound KP1019 with the cytotoxic effect of KP1019 in combination with electroporation. In order to compare different cell lines viability tests (MTT assay, crystal violet staining, clonogenic assay) we performed one experiment and compared its results of cell viability within all three tests. Besides, the results were also compared considering two different incubation times. The comparison was based on the percentile grade value of the Student t-test, a statistics test for two-parameters comparison. The cytotoxic effect of KP1019 with or without electroporation was evaluated on the basis of the percentage of the survived cells that underwent different treatments in comparison with the untreated cells. The percentage of the survived cells was calculated on the basis of spectrophotometric measurements of cell density in cell suspension. We found out that the results of the cell lines viability determined by the MTT assay and the crystal violet staining are comparable despite big differences among individual measurements. Furthermore, we discovered that regardless of the cell incubation time the results of the cell lines viability are comparable as well. In further experiments we studied the cytotoxic effect of KP1019 and the effect of electroporation on the cytotoxic effect of KP1019. Due to uncontrolled hydrolysis of KP1019 the working concentration – one of the key factors of cytotoxicity – remained unknown. Based on the results we came to the conclusion that the MTT assay and the crystal violet staining are comparable, and so are the results considering different incubation times. We did not notice any effect that electroporation could have on the cytotoxic effect KP1019. However, we consider it reasonable to repeat the experiments taking into consideration the rapid hydrolysis of KP1019 and therefore dissolving it in buffer just before its use in an experiment. Due to complexity of physico-chemical properties and mechanism of action of KP1019 we suggest separate studies of transmembrane transport of KP1019 and its cytotoxic mechanism of action.

## KAZALO VSEBINE

### POSVETILO

### KLJUČNA DOKUMENTACIJSKA INFORMACIJA II

### KEY WORDS DOCUMENTATION III

### KAZALO VSEBINE IV

### KAZALO SLIK VI

### OKRAJŠAVE IN SIMBOLI VIII

## 1 UVOD 1

### 1.1 OPREDELITEV PROBLEMA 1

### 1.2 NAMEN IN HIPOTEZE 2

## 2 PREGLED OBJAV 3

### 2.1 ELEKTROPORACIJA 3

### 2.2 KEMOTERAPIJA 6

### 2.3 ELEKTROKEMOTERAPIJA 7

#### 2.3.1 Bleomicin 8

#### 2.3.2 Cisplatin 8

#### 2.3.3 NAMI-A in KP1019 8

## 3 MATERIALI IN METODE 11

### 3.1 PRIPRAVA CELIČNE KULTURE 11

### 3.2 PRIMERJAVA TESTOV ZA DOLOČANJE PREŽIVETJA CELIC: TEST MTT, METODA BARVANJA S KRISTAL VIJOLIČNIM IN TEST KLONOGENOSTI 11

#### 3.2.1 Preživetje celic glede na čas inkubacije po opravljenem poizkusu 11

##### 3.2.1.1 Preživetje celic po testu MTT 12

##### 3.2.1.2 Preživetje celic po metodi barvanja s kristal vijoličnim 13

#### 3.2.2 Preživetje celic glede na uporabljeni test: test MTT, metoda barvanja s kristal vijoličnim in test klonogenosti 14

### 3.3 VPLIV RUTENIJEVE SPOJINE KP1019 IN ELEKTROPORACIJE NA PREŽIVETJE CELIC 14

#### 3.3.1 Vpliv rutenijeve spojine KP1019 na preživetje celic 14

#### 3.3.2 Vpliv rutenijeve spojine KP1019 in elektroporacije na preživetje celic 15

<b>4</b>	<b>REZULTATI</b>	<b>19</b>
<b>4.1</b>	<b>PRIMERJAVA TESTOV ZA DOLOČANJE PREŽIVETJA CELIC</b>	<b>19</b>
4.1.1	Preživetje celic glede na čas inkubacije po opravljenem poizkusu	19
4.1.1.1	Rezultati testa MTT	19
4.1.1.2	Rezultati barvanja s kristal vijoličnim (CV)	20
4.1.2	Rezultati primerjave metod testa MTT, metode barvanja s kristal vijoličnim (CV) in testa klonogenosti	21
<b>4.2</b>	<b>VPLIV RUTENIJEVE SPOJINE KP1019 IN ELEKTROPORACIJE NA PREŽIVETJE CELIČNIH LINIJ B16F1 IN CHO</b>	<b>22</b>
4.2.1	Rezultati citotoksičnega vpliva rutenijeve spojine KP1019	22
4.2.2	Rezultati citotoksičnega vpliva rutenijeve spojine KP1019 v kombinaciji z elektroporacijo	23
<b>5</b>	<b>RAZPRAVA IN SKLEPI</b>	<b>26</b>
<b>5.1</b>	<b>RAZPRAVA</b>	<b>26</b>
5.1.1	Primerjava testov za določanje preživetja celic	27
5.1.2	Vpliv rutenijeve spojine KP1019 in elektroporacije na preživetje celičnih linij B16F1 in CHO	29
<b>5.2</b>	<b>SKLEPI</b>	<b>33</b>
<b>7</b>	<b>VIRI</b>	<b>35</b>
<b>7.1</b>	<b>Tiskani viri</b>	<b>35</b>
<b>7.2</b>	<b>Elektronski viri</b>	<b>39</b>



## KAZALO SLIK

- Sl.: 2.1 Proces nastanka pore z elektroporacijo v odvisnosti od jakosti električnega polja. Slike od vrha navzdol prikazujejo posamezne stopnje nastanka pore pri naraščajoči jakosti električnega polja: neporirana membrana, nastanek hidrofobne pore, nastanek hidrofilne pore (reverzibilna elektroporacija), povečanje pore (ireverzibilna elektroporacija) (Miklavčič in Kotnik, 2004: 642). 4
- Sl.: 2.2 Izpostavitve celice zunanemu električnemu polju vodi v spremembe prepustnosti celične membrane. Usoda celice je odvisna od parametrov električnega polja, ki lahko povzročijo insercijo proteinov v celično membrano, vstop manjših molekul v celico, vstop večjim molekulam v celico, fuzijo celic ali plazmolizo (Miklavčič in Puc, 2006: 2). 6
- Sl.: 2.3 Strukturne formule rutenijevih (III) spojin: KP1019, NAMI-A, KP1339, KP418 (Hartinger in sod., 2006: 892). 10
- Sl.: 3.1 Elektroporator Cliniporator (Igea, Carpi, Italy). 16
- Sl.: 3.2 Elektrode, ki omogočajo generiranje homogenega električnega polja. 17
- Sl.: 3.3 Slika prikazuje zapis na zaslonu računalnika, ki je povezan z elektroporatorjem, po generiranju elektroporacijskih pulzov z elektroporatorjem Cliniporator (pulzi  $8 \times 100 \mu\text{s}$ , amplituda 160 V, frekvenca 1 Hz). 17
- Sl.: 4.1 Delež preživetja celic B16F1 v odvisnosti od jakosti električnih pulzov in inkubacijskega časa, po katerem je bil izveden test MTT. Temni simboli predstavljajo preživetje 24 h po poizkusu, svetli pa 48 h po poizkusu. Vsaka točka na sliki predstavlja povprečje treh poizkusov  $\pm$  standardna deviacija. 20
- Sl.: 4.2 Delež preživetja celic B16F1 v odvisnosti od jakosti električnih pulzov in inkubacijskega časa, po katerem je bil izveden test z barvanjem s kristal vijoličnim. Temni simboli predstavljajo preživetje 24 h po poizkusu, svetli pa 48 h po poizkusu. Vsaka točka na sliki predstavlja povprečje treh poizkusov  $\pm$  standardna deviacija. 21
- Sl.: 4.3 Delež preživetja celic B16F1 v odvisnosti od jakosti električnih pulzov, uporabljenega testa za določanje preživetja celic in inkubacijskega časa, po katerem je bil test izveden. Temni simboli predstavljajo test z barvanjem s kristal vijoličnim, svetli test MTT, črtice pa test klonogenosti. Trikotniki predstavljajo preživetje 24 h po poizkusu, kvadratki pa 48 h po poizkusu. Vsaka točka na sliki predstavlja povprečje treh poizkusov  $\pm$  standardna deviacija. 22
- Sl.: 4.4 Delež preživetja celic B16F1 in CHO v odvisnosti od časa inkubacije celic v KP1019. Bela stolpca predstavljata preživetje po 40 min inkubacije, siva pa po 24 h. Vsaka točka na sliki predstavlja povprečje treh poizkusov  $\pm$  standardna deviacija. 23

- Sl.: 4.5 Delež preživetja celic B16F1 in CHO v odvisnosti od različnih tretmajev celic. Siva stolpca predstavljata preživetje pri 40 min inkubacije celic v KP1019, bela stolpca predstavljata preživetje po elektroporaciji celic v pufu brez KP1019, črna pa po elektroporaciji celic v pufu s KP1019. Vsaka točka na sliki predstavlja povprečje treh poizkusov  $\pm$  standardna deviacija. 24
- Sl.: 4.6 delež preživetja celic B16F1 in CHO v odvisnosti od različnih tretmajev celic. Bela stolpca predstavljata preživetje po elektroporaciji celic v pufu brez KP1019, črna pa po elektroporaciji celic v pufu s KP1019. Vsaka točka na sliki predstavlja povprečje treh poizkusov  $\pm$  standardna deviacija. 25
- Sl.: 5.1 Področje reverzibilno elektroporiranih celic. Nепrekinjena črta predstavlja delež reverzibilno elektroporiranih celic, črtkana črta pa delež odmrlih celic. Osenčeno področje predstavlja področje reverzibilne elektroporacije (Kotnik in sod., 2000: 921). 27
- Sl.: 5.2 Privzem KP1019, KP1339 in KP 418 v tumorske celice SW480 (Hartinger, 2006: 896). 32

## OKRAJŠAVE IN SIMBOLI

CV test	Test, ki temelji na barvanju s kristal vijoličnim
B16F1	Tumorska celična linija metastazirajočih celic mišjega melanoma
CHO	Celična linija jajčnih celic kitajskega hrčka (Chinese hamster ovary cells)
cisplatin	<i>cis</i> -PtCl <sub>2</sub> (NH <sub>3</sub> ) <sub>2</sub>
EMEM	Gojišče za B16F1 (Eagle's minimum essential medium)
F12 HAM	Gojišče za CHO
FCS	Fetalni telečji serum (fetal cow serum)
KP1019	Indazolium <i>trans</i> -RuCl <sub>4</sub> (1 <i>H</i> -indazole) ruthenate(III)
KP1339	Natrijeva sol KP1019 – natrijev <i>trans</i> -(tetrachlorobis(1 <i>H</i> -indazole) ruthenate(III))
KP418	Imidazolium <i>trans</i> -(tetrachlorobis(1 <i>H</i> -indazole) ruthenate(III))
MTT test	Test, ki temelji na določanju celične rasti kot funkcije mitohondrijske aktivnosti
NAMI-A	Imidazolium <i>trans</i> - tetrachlorobis (DMSO-S)Imidazol
SMEM	Bogato gojišče, ki ga dodamo celicam takoj po elektroporaciji (Spinner's minimum essential medium)

## 1 UVOD

### 1.1 OPREDELITEV PROBLEMA

Rak je skupina težkih bolezni, ki so poleg infekcijskih bolezni, podhranjenosti, vojn in srčnih obolenj najpogostejši vzrok smrti ljudi na svetu. Po podatkih statističnega informacijskega sistema Svetovne zdravstvene organizacije (WHOSIS) umre zaradi raka vsako leto 7.9 milijonov ljudi, v Sloveniji 5000. Danes umre zaradi raka vsak osmi Zemljan. Te številke so se in se še vedno vztrajno večajo in po raziskavah in izračunih WHOSIS bo do leta 2015 za rakom umrl že vsak 6.6 Zemljan. V letu 2030 pa bo zaradi raka umrlo že 11.3 milijonov ljudi (Future trends ..., 2008). Že leta 1971, ko so bile te številke še precej manjše, a vseeno velike, je ameriški predsednik Richard M. Nixon sprožil tako imenovano vojno proti raku («War on Cancer»). Od takrat so raziskave namenjene razumevanju mehanizmov raka in raziskovanju novih ter uspešnejših načinov zdravljenja ene izmed najbolj aktualnih in finančno podprtih.

Rak je v osnovi genetska bolezen, ki se razvije v eni sami somatski celici kot posledica akumulacije mutacij ključnih genov, vključenih v kontrolo celičnega cikla, apoptoze in popravljalnih mehanizmov DNA. Posledica teh mutacij je transformacija celice v dolgoživo tumorsko celico z nekontrolirano celično rastjo, nekatere od njih pridobijo tudi sposobnost metastaziranja v drugih tkivih. Ker ima vsak tip rakave bolezni svojevrstne lastnosti, zahteva svojevrstno zdravljenje. Poleg tega je prav vsako rakavo obolenje edinstveno zaradi različnih naključnih kombinacij vsaj šestih naključnih mutacij, in ker imajo tumorske celice poleg neomejenega hitrega pomnoževanja tudi visoko stopnjo mutabilnosti ter posledično sposobnosti hitrega razvoja rezistence, je razvijanje uspešnih metod zdravljenja izredno težavno (Serša in sod., 2003a; Štrukelj in sod., 2007).

Onkologija, veda o novotvorbah ali tumorjih (SSKJ ..., 1998), je zaradi kompleksnosti problema, s katerim se ukvarja, postala danes ena izmed vej medicine, kjer je sodelovanje različnih bazičnih naravoslovnih ved, kot so biologija, fizika in kemija, še posebej izrazito. Ena izmed metod zdravljenja, ki je nastala kot plod takšnega sodelovanja, je tudi elektrokemoterapija. Sestavlja jo smiselna kombinacija kemoterapije in elektroporacije. Vse klinične študije so potrdile, da je elektrokemoterapija učinkovita metoda za lokalno kontrolo tumorjev pri pacientih z različnimi tipi rakavih obolenj. Zaenkrat se v klinični praksi humane medicine uporablja le za zdravljenje kutanih in subkutanih melanomov, v veterini pa jo uspešno uporabljajo pri zdravljenju cele vrste različnih rakavih obolenj (Serša in sod., 2003a).

Za uspešno elektrokemoterapijo je seveda potreben ustrezen kemoterapevtik. Zaenkrat sta v klinični uporabi le dva: bleomicin in cisplatin, preizkušajo pa se tudi nove spojine, med

katerimi zavzemajo posebno mesto rutenijeve spojine. Eden izmed najbolj perspektivnih kemoterapevtikov za klasično kemoterapijo je rutenijeva (III) spojina KP1019, njegova učinkovitost v elektrokemoterapiji pa še ni bila preverjena (Hartinger in sod., 2006).

## 1.2 NAMEN IN HIPOTEZE

Namen diplomske naloge je bil spoznati različne metode za določanje preživetja celičnih linij ter na podlagi njihove primerjave izbrati najustreznejšo za naše nadaljnje delo. V poizkusih, ki so sledili, smo želeli določiti in primerjati citotoksični vpliv same rutenijeve spojine KP1019 s citotoksičnim vplivom rutenijeve spojine KP1019 v kombinaciji z elektroporacijo na preživetje dveh celičnih linij, ene tumorske in ene normalne trajne celične linije.

Naša hipoteza je bila, da je citotoksični vpliv rutenijeve spojine KP1019 v kombinaciji z elektroporacijo na obe celični liniji večji kot citotoksični vpliv same rutenijeve spojine KP1019. Predpostavljamo, da je KP1019 potencialni kemoterapevtik tudi v elektrokemoterapiji.

## 2 PREGLED OBJAV

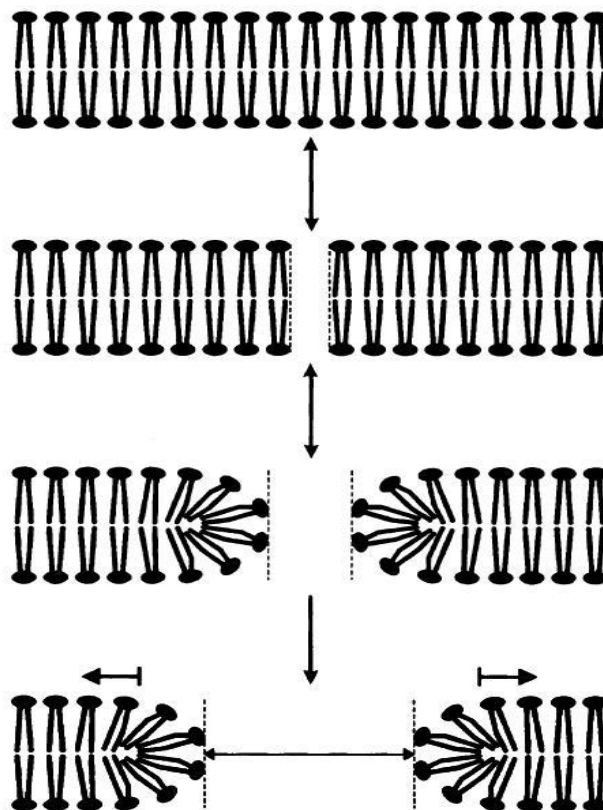
### 2.1 ELEKTROPORACIJA

Elektroporacija ali elektropermeabilizacija je biofizikalni pojav, pri katerem pride zaradi kratkotrajne izpostavitve celice električnemu polju dovolj visoke jakosti do izrazitega povečanja prepustnosti membrane (Neumann in Rosenheck, 1972; Neumann, 1989, 1999; Lebar in sod., 1998; Kotnik in sod., 2005).

Sprememba prepustnosti je posledica znatnih sprememb v strukturi membrane, katerih molekularni mehanizmi še vedno niso dobro poznani. Obstaja sicer vrsta modelov, ki opisujejo te mehanizme (Jacobs, 1975; Taupin, 1975; Sugar, 1979; Glaser, 1988; Tsong, 1991; Weaver, 1996; Lebar, 1998; Kotnik, 2005; Teissie, 2005), toda rezultati poskusov niso še nobenega povsem potrdili (Mir, 2000).

Najbolj uveljavljena razlaga pravi, da pride zaradi povišanja membranske napetosti, ki nastopi ob izpostavitvi celice zunanjemu električnemu polju, do nastanka nanometerskih hidrofilnih por v lipidnem dvosloju – od tu izraz elektroporacija (Taupin, 1975; Glaser, 1988; Chang, 1990; Lebar, 1998; Kotnik, 2005).

Strukturne spremembe v celični membrani, ki nastanejo v prisotnosti električnega polja, se pojavijo ob pragovni transmembranski napetosti, ki seveda zahteva pragovno vrednost jakosti zunanjega električnega polja. Strukturne spremembe se med prisotnostjo zunanjega električnega polja večajo oziroma množijo. To so kratkotrajne spremembe v strukturi celične membrane, ki so prisotne nekaj mikrosekund. Ko zunanje električno polje izključimo, se lahko kratkotrajne strukturne spremembe preuredijo v osnovno stanje ali pa v nekaj mikrosekundah zavzamejo stabilno konfiguracijo. Tako nastale spremembe imenujemo dolgotrajne, saj lahko traja tudi nekaj 10 minut, da se preuredijo nazaj v izhodiščno stanje (Slika 2.1) (Chernomordik, 1992; Lebar in sod., 1998; Miklavčič in Kotnik, 2004).



Slika 2.1: Proces nastanka pore z elektroporacijo v odvisnosti od jakosti električnega polja. Slike od vrha navzdol prikazujejo posamezne stopnje nastanka pore pri naraščajoči jakosti električnega polja: neporirana membrana, nastanek hidrofobne pore, nastanek hidrofilne pore (reverzibilna elektroporacija), povečanje pore (ireverzibilna elektroporacija) (Miklavčič in Kotnik, 2004: 642).

Če so vrednosti parametrov zunanjskega električnega polja, kot so amplituda pulzov, trajanje pulzov, število pulzov in ponavljalna frekvenca, optimalne, se po koncu izpostavitve prepustnost membrane postopoma vrne na začetno raven, celice pa ohranijo svoje fiziološko delovanje. V tem primeru je proces elektroporacije reverzibilen (Rols in Teissie, 1990).

V nasprotnem primeru pride do ireverzibilne elektroporacije, katere posledica je plazmoliza celic. V celični membrani pride do nepopravljivih poškodb in zato trajno povečane prepustnosti membrane. Zaradi osmotskega pritiska v celice vdira voda in celica nabreka dokler nazadnje ne počí (Hamilton in Sale, 1967; Danfelter in sod., 1998).

Z električnim poljem, ki ga ustvarimo med dvema elektrodama, na kateri dovedemo visokonapetostne električne pulze, lahko povečamo prepustnost celične membrane vsaki celici. To lahko dosežemo tako na celicah, ki rastejo v celični suspenziji, kot tudi na tistih, ki rastejo v plasti, pritrjene na steno posode; *ex vivo* na tkivih in celicah in *in vivo* na tkivih (Lebar in sod., 1998).

Dokazano je bilo, da se zaradi različnih fizikalno-kemijskih in bioloških lastnosti različne celične linije razlikujejo v svojih odzivih na enake parametre zunanega električnega polja (Čemažar in sod., 1998).

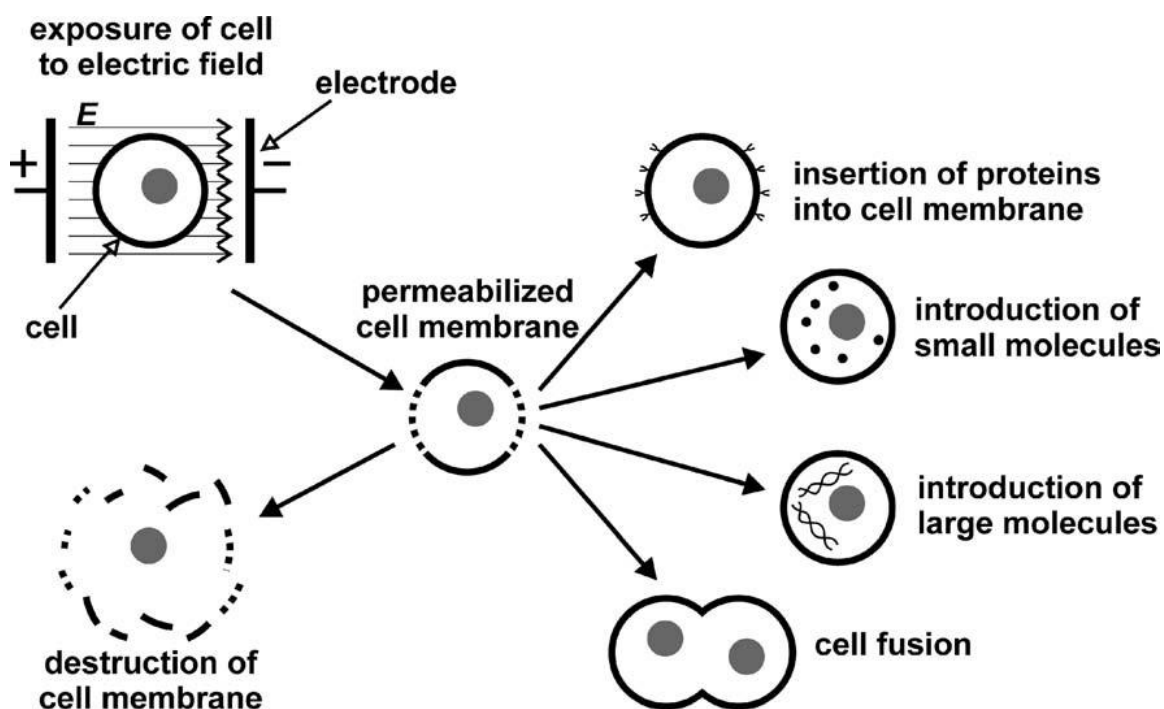
V času povišane prepustnosti celične membrane poteka neselektiven transport snovi med intra- in ekstracelularnim prostorom. Hidrofilnim snovem, za katere predstavlja membrana sicer neprehodno bariero, je tako omogočen vstop v citosol preko nastalih hidrofilnih por. Manjše molekule vstopajo v celice z difuzijo. K pretoku večjih električno nabitih molekul, kot so DNA in proteini, pa v času delovanja električnega polja in povečane prepustnosti pomembno prispeva tudi elektroforetska sila – vlečna sila, ki jo ustvarja električno polje na nabite delce (Lebar, 1998; Mir, 2000; Kotnik, 2005; Rols, 2006).

Zaradi zgoraj opisanih lastnosti je postala elektroporacija v zadnjem času standardna laboratorijska metoda. Permeabilizacija, povzročena z električnim poljem, ima namreč nekaj prednosti pred drugimi biokemičnimi metodami:

- lahko jo uporabimo na vsaki celici,
- ne prizadene celičnega preživetja,
- je specifična za celično membrano in ne prizadene membran celičnih organelov,
- povzroči le minimalne motnje membranskih funkcij (Lebar in sod., 1998).

Končni rezultat elektroporacije celic je odvisen od parametrov zunanega električnega polja in lahko povzroči vstop manjših molekul in ionov v celico, vstop večjih in nabitih molekul, vključitev molekul v celično membrano, fuzijo celic ali plazmolizo. Ti učinki se danes izkoriščajo za namene elektrokemoterapije, elektrogenske transfekcije, vnosa zdravilnih učinkovin preko kože, vključevanja proteinov v celične membrane, elektrofuzije celic in elektrosterilizacije tekoče hrane in vode (Slika 2.2) (Miklavčič in Puc, 2006).





Slika 2.2: Izpostavitve celice zunanjemu električnemu polju vodi v spremembe prepustnosti celične membrane. Usoda celice je odvisna od parametrov električnega polja, ki lahko povzročijo insercijo proteinov v celično membrano, vstop manjših molekul v celico, vstop večjim molekulam v celico, fuzijo celic ali plazmolizo (Miklavčič in Puc, 2006: 2).

Uporaba zgoraj naštetih aplikacij elektroporacije sega od temeljnih raziskav v biokemiji in molekularni biologiji prek uporabnih raziskav v biotehnologiji in farmaciji do predklinične in klinične uporabe v onkologiji in genski terapiji (Čemažar in sod., 1998; Lebar in sod., 1998; Heller, 1998, 1999; Mir, 2000, 2006; Serša in sod., 2003a, 2008; Kotnik in sod., 2005).

## 2.2 KEMOTERAPIJA

Kemoterapija je postopek zdravljenja različnih bolezni s kemičnimi sredstvi, ki posredno ali neposredno zavirajo celične delitve ali povzročijo celično smrt. Tak način zdravljenja se je uveljavil v onkologiji in postal eden izmed standardnih postopkov zdravljenja širokega spektra različnih tipov rakavih obolenj, čeprav je splošno znano, da sama metoda povzroča močne negativne stranske učinke. Intenziteta tako glavnih kot stranskih učinkov je v sorazmerju z dozo kemoterapevtika. Problem se pojavi pri tistih protitumorskih zdravilih z intracelularnim mestom delovanja, ki slabo prehajajo celično membrano. Da bi dosegli želeni učinek takega kemoterapevtika, bi morali zvišati njegovo koncentracijo v bližini celice, vendar smo omejeni z močnimi negativnimi stranskimi učinki, ki jih povzročajo visoke koncentracije teh kemoterapevtikov v telesu.

Pri kemoterapiji je, podobno kot pri drugih metodah zdravljenja raka, največji problem zagotoviti zadosten citotoksičen učinek na tumorske celice, obenem pa čimbolj zmanjšati njegovo delovanje na zdrave celice. S tega stališča je elektrokemoterapija sicer uspešna in perspektivna metoda za lokalno kontrolo tumorjev, vendar zaenkrat samo kutanih in subkutanih tumorjev. Elektrode za elektroporacijo globlje ležečih tumorjev namreč še niso bile razvite (Čemažar in sod., 1998; Heller in sod., 1998; Lebar in sod., 1998).

### 2.3 ELEKTROKEMOTERAPIJA

Elektrokemoterapija je relativno nova metoda za lokalno zdravljenje nekaterih vrst tumorjev. Temelji na uspešni kombinaciji kemoterapije in lokalne reverzibilne elektroporacije tumorskega tkiva. Vnosu kemoterapevtika v telo po določenem času sledi lokalna aplikacija električnih pulzov določenih parametrov, s katerimi reverzibilno povečamo prepustnost celičnih membran elektroporiranega tkiva in s tem omogočimo oziroma pospešimo transmembranski transport kemoterapevtika v te celice (več o elektroporaciji v podpoglavju 2.1). Posledica večje koncentracije kemoterapevtika v citosolu je tudi njegov večji citotoksični učinek. V praksi to pomeni, da z enakimi dozami kemoterapevtikov v elektrokemoterapiji dosežemo večji protitumorski učinek kot pri klasični kemoterapiji, pri čemer se stranski učinki ne potencirajo, oziroma da za enak protitumorski učinek v elektrokemoterapiji zadostujejo nižje doze kemoterapevtikov s čimer zmanjšamo njihove negativne stranske učinke.

Optimalni protitumorski efekt je dosežen, če dovajamo električne pulze v času, ko je ekstracelularna koncentracija kemoterapevtika v tumorju najvišja in je zato transport preko celične membrane do intracelularnih tarč najboljši. Pospešen transmembranski transport zviša intracelularno koncentracijo kemoterapevtika in s tem poveča njegovo citotoksičnost.

Ker elektroporacija poveča transmembranski transport samo tistih zdravil, za katere je celična membrana zelo slabo ali sploh neprepustna, so najbolj primerni kandidati za kemoterapevtike v elektrokemoterapiji kemične snovi, ki so hidrofilne in za katere ne obstaja učinkovit transportni sistem v membrani, njihovo tarčno mesto delovanja pa je v intracelularju.

Kar nekaj kemoterapevtikov je že bilo testiranih v kombinaciji z elektroporacijo *in vitro*, med njimi pa sta v klinično uporabo prišla zaenkrat le bleomicin in cisplatin (Serša in sod., 2008).

### 2.3.1 Bleomicin

Kemoterapevtik bleomicin je hidrofilen glikopeptidni antibiotik z močno omejenim transmembranskim transportom. Z difuzijo preko membrane ne more prehajati, transport z receptorsko posredovano endocitozo pa je omejen z majhnim številom transportnih proteinov, izpostavljenih na celični površini, in z dodatnim izključevanjem teh proteinov iz membrane v procesu endocitoze. V kombinaciji z elektroporacijo celic pa bleomicin skoraj prosto preide v citosol. Njegova citotoksičnost se tako poveča okrog 700-krat. Intrinzična citotoksičnost bleomicina je izredno visoka, saj je že nekaj sto molekul v notranjosti celice dovolj, da jo ubijejo. Molekule bleomicina povzročajo enojne in dvojne prelome dvojne vijačnice DNA, ki jih celica ne more popraviti. Do celične smrti, ki je posledica takih poškodb DNA in posledično fragmentiranih kromosomov, pride šele med procesom mitoze. Mitotična celična smrt je do neke mere selektivna za tumorske celice, saj se te veliko hitreje delijo kot celice normalnih tkiv (Čemažar, 1996; Mir, 2000, 2006). Bleomicin se sicer uporablja tudi v klinični praksi, vendar njegovo uporabo omejuje dejstvo, da presežek kumulativne doze v telesu povzroča hude stranske učinke, pri čemer je pljučna fibroza na prvem mestu. Izmed mnogih ostalih stranskih učinkov naj omenim še kardiovaskularne motnje, vročino, slabost in bruhanje, hiperpigmentacijo kože in oslavljen imunski sistem (Drugdex drug evaluations ..., 2008).

### 2.3.2 Cisplatin

V primeru cisplatina (*cis*-PtCl<sub>2</sub>(NH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>) je transmembranski transport le delno oviran. Pasivna difuzija predstavlja 50 % transporta, ostalih 50 % pa omogočajo transportni proteini. Njegovo tarčno mesto delovanja je DNA, kjer povzroča znotrajveržne in medveržne navzkrižne povezave in tako zavira sintezo DNK, v manjši meri pa tudi sintezo RNK in beljakovin. Elektroporacija celic poviša njegovo citotoksičnost za več kot 80-krat (Serša in sod., 1998; Mir, 2006). Tudi ta kemoterapevtik ima v klinični uporabi svoje omejitve, saj pogosto povzroča hude stranske učinke: močno slabost in bruhanje, nefrotoksičnost, ototoksičnost, hemotoksičnost in mielosupresijo, v manjši meri tudi nevrotoksičnost, anafilaktoidne reakcije, motnje elektrolitskega ravnotežja, očesno toksičnost in druge (Temeljne značilnosti zdravila ..., 2001). Poleg tega deluje samo na določen spekter rakavih obolenj, pri čemer so tumorske celice po daljši izpostavljenosti cisplatinu sposobne razviti rezistenco nanj (Mir, 2006).

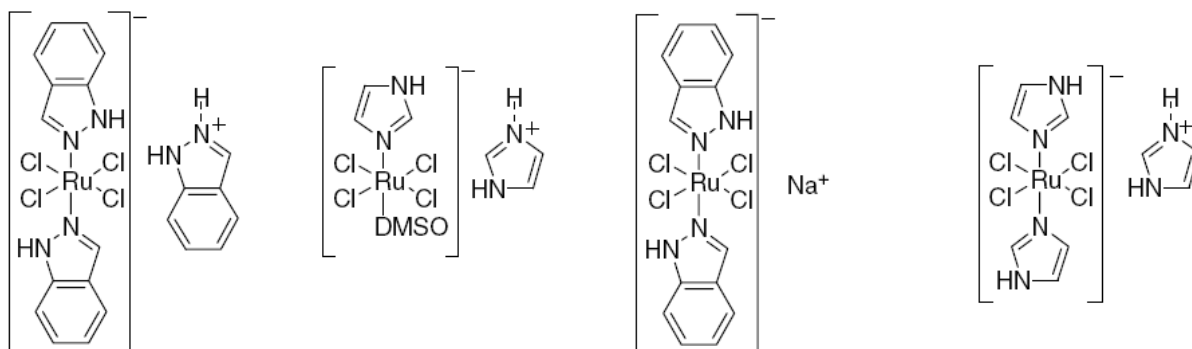
### 2.3.3 NAMI-A in KP1019

Tako za kemoterapijo kot za elektrokemoterapijo se iščejo in preizkušajo mnoge nove alternative spojin, ki bi bile bolj učinkovite. Med kemoterapevtiki, ki vsebujejo kovinske ione, so poleg platinastih (II) spojin zelo zanimive tudi rutenijeve (III) spojine. Čeprav

njihov mehanizem delovanja še ni jasen, prevladuje mnenje, da so to necitotoksični prekursorji aktivnih citotoksičnih substanc. Njihovo biološko aktivnost si zaenkrat razlagamo s teorijo aktivacije-z-redukcijo, po kateri naj bi v reducirajočem okolju potekla biotransformacija rutenija (III) v rutenij (II). Spojine z rutenijem (III) so namreč veliko bolj inertne kot njihovi analogi z rutenijem (II). Aktivne substance z enim ali več tarčnimi mesti v intracelularju so zaenkrat še neidentificirane. Med mnogimi sintetiziranimi rutenijevimi protitumorskimi spojinami sta se zaenkrat dve uspešno prebili do faze kliničnih preizkusov: NAMI-A (Imidazolium *trans*- tetrachlorobis (DMSO-S)Imidazol) in KP1019 (Indazolium *trans*- tetrachlorobis (1*H*-indazole)ruthenate(III)).

NAMI-A se veže na DNA, kjer povzroča nepopravljive poškodbe, kar vodi do mitotične celične smrti. Zanimiv je zaradi inhibitornega delovanja na metastaze *in vivo*, čeprav je *in vitro* kazal le zanemarljivo citotoksičnost. Ker je njegov transport preko membrane omejen, so Biček in sod. (2007) preučili njegovo citotoksičnost v kombinaciji z elektroporacijo *in vitro*. Pri 800 V/cm in 10  $\mu$ M NAMI-A so dosegli kar 80% upad preživetja celic, in tako pokazali potencialno uporabnost NAMI-A v elektrokemoterapiji. Nadaljnje predklinične in klinične raziskave so v teku (Biček in sod., 2007).

KP1019 je zanimiva zaradi svojega mehanizma delovanja, saj se to razlikuje od mehanizmov delovanja bleomicina in platinastih kemoterapevtikov. Rezultati raziskav so pokazali, da se večina KP1019 v ekstracelularju veže na serumske proteine, v prvi vrsti na albumin in transferin. Kompleksi z albuminom delujejo kot rezervoar neaktivnega KP1019, vezava s transferinom pa omogoča transmembranski transport tega kemoterapevtika po transferinski receptorsko posredovani endocitozi. V reducirajočem kislem okolju endosoma in/ali hipoksičnem okolju tumorja se KP1019 reducira in s tem aktivira. Njegov učinek je tako do neke mere selektiven za celice tumorja. Aktivirane molekule kemoterapevtika se v intracelularju vežejo na DNA in povzročijo prelome dvojne vijačnice ter s tem mitotično celično smrt. Poleg tega posredno z induciranjem nastanka reaktivnih kisikovih vrst povzročajo dodatne znotrajcelične poškodbe, katerih posledica je apoptoza. Kapitza (2001) je z meritvami mitohondrijskega membranskega potenciala pokazal, da v primeru KP1019 prevladuje apoptoza aktivirana po intrinzični mitohondrijski poti. Pri tem se aktivirajo proteini na mitohondrijski membrani in povzročijo naluknjanje mitohondrija, kar zaznamo v izgubi mitohondrijskega membranskega potenciala. Iz mitohondrija v citosol izhaja citokrom c, ki aktivira kaspazno kaskado, česar končni rezultat je razgradnja strukturnih proteinov, citoplazme in kromatina, razpad celice na apoptotska telesa ter fagocitoza slednjih (Dovgan in sod., 2007).



Slika 2.3: Strukturne formule rutenijevih (III) spojin: KP1019, NAMI-A, KP1339, KP418 (Hartinger in sod., 2006: 892).

Lastnosti, zaradi katerih je KP1019 tako perspektiven kemoterapevtik, so zdravljenje z malo stranskimi učinki, uspešno delovanje proti različnim tipom tumorjev, za katere se je cisplatin izkazal kot neučinkovit in izredno nizka stopnja pojavljanja rezistence. Tudi v prvi fazi kliničnih poizkusov se je KP1019 izkazal kot uspešen kemoterapevtik, saj se je v kar 5 od 6 pacientov zdravljenih s KP1019 bolezen stabilizirala, opaženi pa niso bili nikakršni stranski učinki (Kapitza, 2001, 2005; Hartinger in sod., 2006).

### 3 MATERIALI IN METODE

#### 3.1 PRIPRAVA CELIČNE KULTURE

Za poizkuse smo uporabili dve celični liniji: tumorsko celično linijo metastazirajočih celic mišjega melanoma B16F1 (European Collection of Cell Cultures, Velika Britanija) in celično linijo jajčnih celic kitajskega hrčka CHO (European Collection of Cell Cultures, Velika Britanija). Celice B16F1 smo gojili v gojišču Eagle's minimum essential medium ali EMEM (Sigma – Aldrich Chemie GmbH, Ltd Irvine, Ayrshire, UK), celice CHO pa v gojišču F-12 HAM (Sigma – Aldrich Chemie GmbH, Ltd Irvine, Ayrshire, UK). Obema gojiščema smo dodali 10 % fetalnega telečjega seruma (FCS; Sigma – Aldrich Chemie GmbH, Ltd Irvine, Ayrshire, UK), antibiotika benzil penicilin (Crystacillin, Pliva d.d., Zagreb, Croatia) in gentamicin sulfat (Gentamicin, Lek farmacevtska družba d.d., Ljubljana, Slovenija) ter 1 % (za gojišče EMEM) oziroma 0,5 % (za gojišče F-12 HAM) L-glutamina (Sigma – Aldrich Chemie GmbH, Ltd Irvine, Ayrshire, UK). Celični liniji smo gojili v inkubatorju (Kambič, Slovenija) na 37 °C v atmosferi s 5 % CO<sub>2</sub>. V logaritemski fazi rasti, ki so jo dosegle po 3–4 dneh, smo jih najprej sprali z NaCl, nato pa tripsinizirali s Trypsin-EDTA (5 g porcine tripsin/ 2 g EDTA v 0,9 % NaCl) 10-krat redčenim v HBSS (Hanks' Balanced Salt Solution brez kalcija in magnezija: Sigma – Aldrich Chemie GmbH, Ltd Irvine, Ayrshire, UK). Po približno 1,5 min, ko so se celice začele odlepljati s podlage, smo delovanje tripsina ustavili z dodatkom že prej opisanega gojišča. Število celic v pripravljene celični suspenziji smo določili s štejem v hemocitometru. S centrifugiranjem pri 1225 obratih/min, 4 °C, 5 min (Sigma, UK) smo celice ločili od gojišča in tripsina. Supernatant smo odstranili, pelet celic pa resuspendirali v nizkoprevodnem elektroporacijskem mediju (10 mM natrijev fosfatni pufer-PB, Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> / NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, pH 7.4) z 1 mM MgCl<sub>2</sub> in 250 mM saharozo, da smo pripravili celično suspenzijo s koncentracijo 20 X 10<sup>6</sup> celic/ml.

#### 3.2 PRIMERJAVA TESTOV ZA DOLOČANJE PREŽIVETJA CELIC: TEST MTT, METODA BARVANJA S KRISTAL VIJOLIČNIM IN TEST KLONOGENOSTI

##### 3.2.1 Preživetje celic glede na čas inkubacije po opravljenem poizkusu

Za primerjavo testov za merjenje preživetja celičnih linij smo celice elektroporirali. Opazovali smo vpliv jakosti električnega polja na preživetje celic. Uporabili smo celično linijo B16F1, za katero je bil vpliv električnega polja na preživetje že določen s testom klonogenosti (Kandušer in sod., 2006). Elektroporacijo smo izvedli po protokolu (glej 3.3.2), ki je primerljiv s protokolom, opisanim v članku Kandušer in sod. (2006). Uporabili smo tudi enake parametre elektroporacije: razdalja med elektrodama 2 mm, 8 pulzov, 100

$\mu\text{s}$ , 1 Hz, amplitude električnih pulzov naraščajoče za 40 V od 80 V do 400 V. Celice v kontroli nismo izpostavili električnemu polju.

Po poizkusu smo celice inkubirali v inkubatorju na 37 °C v atmosferi s 5 % CO<sub>2</sub> v osmih paralelkah 24 h in v osmih paralelkah 48 h. Po končani inkubaciji smo izmerili preživetje celic v štirih paralelkah s testom MTT (glej 3.2.1.1), v štirih paralelkah pa z metodo barvanja s kristal vijoličnim (glej 3.2.1.2). Celoten poskus smo trikrat ponovili. Rezultate smo ovrednotili na podlagi statističnega testa za primerjavo dveh parametrov, Studentovega t-testa, pri čemer sta bila primerjana parametra različna časa inkubacije celic po opravljenem poizkusu (24 h in 48 h).

### 3.2.1.1 Preživetje celic po testu MTT

MTT test temelji na spektrofotometričnem določanju celične rasti kot funkcije mitohondrijske aktivnosti v živih celicah. Z njim merimo sposobnost živih celic, da z mitohondrijsko sukcinat dehidrogenazo reducirajo topno rumeno tetrazolijevo sol (3-[4,5-dimetiltiazol-2-il]-2,5-difenil tetrazolijev bromid), raztopljeno v MTT raztopini v netopne škrlatne formazanske kristale. Te kristale nato raztopimo v MTT topilu in izmerimo absorbanco pri 570 nm. Iz absorpcije lahko direktno sklepamo na preživetje celic, saj je absorpcija v linearni odvisnosti od mitohondrijske encimske aktivnosti, ta pa v linearni odvisnosti od števila preživelih celic.

Test smo izvedli po navodilih proizvajalca (Cell growth determination kit, MTT based. For spectrophotometric determination of viable cell number. Sigma - Aldrich, USA) po postopku za celice, pritrjene na podlago, s to razliko, da smo v začetku gojišče najprej odstranili in celicam nato dodali manjši volumen 10 % MTT raztopine (MTT SOLUTION) v svežem gojišču (220  $\mu\text{l}$ ). Po 4 h inkubacije celic v inkubatorju na 37 °C v atmosferi s 5 % CO<sub>2</sub> smo raztopino odstranili, celicam pa dodali 200  $\mu\text{l}$  MTT topila (MTT SOLVENT). V roku ene ure smo izmerili absorbanco pri 570 nm in 690 nm s čitalcem mikrotiterskih plošč Tecan (Tecan infinite M200; Tecan Austria GmbH) in programom Magellan (Tecan Austria GmbH). Z absorbanco pri 690 nm smo izmerili vrednost absorpcije ozadja, ki smo jo nato odšteli od absorpcije pri 570 nm in tako dobili končno vrednost. Na podlagi dobljenih vrednosti smo izračunali delež preživetja celic glede na kontrolo za vsako amplitudo električnih pulzov posebej po formuli:

Delež preživelih celic = (abs. elektroporiranih celic / abs. kontrole) X 100 [%]

Končno vrednost deleža preživelih celic pri določeni amplitudi električnih pulzov predstavlja povprečna vrednost deležev preživelih celic treh neodvisnih poskusov  $\pm$

standardna deviacija. Rezultate preživetja celic smo predstavili s krivuljami preživetja celic v odvisnosti od amplitude električnih pulzov.

Primerjavo končnih vrednosti preživetja celic, ki so bile po poizkusu inkubirane 24 h, in celic, ki so bile inkubirane 48 h, smo ovrednotili na podlagi statističnega testa za primerjavo dveh parametrov, Studentovega t-testa. Med seboj smo primerjali preživetje celic po elektroporaciji pri določeni amplitudi električnega pulza. Za vsako amplitudo električnega pulza smo primerjali preživetje celic, dobljeno pri omenjenih dveh različnih časih inkubacije.

### 3.2.1.2 Preživetje celic po metodi barvanja s kristal vijoličnim

Protokol določanja preživetja celic z metodo barvanja s kristal vijoličnim smo povzeli po Golzio, 1999.

Metoda barvanja s kristal vijoličnim temelji na prepustnosti celične membrane za to barvilo in vezavi barvila kristal vijolično na molekule DNA. Po inkubaciji celic v barvilu se vijolično obarvajo molekule DNA tako živih kot mrtvih celic, vendar se pri nadaljnjem večkratnem spiranju vzorca s pufrom sperejo tudi vse odmrle celice, ki so se odlepile od podlage. Preživele, na podlago pritrjene celice nazadnje liziramo z očetno kislino, da dobimo homogeno vijolično obarvano raztopino, ki ji izmerimo absorbanco pri 595 nm. Izmerjeni absorpciji moramo odšteti absorpcijo ozadja, ki jo predstavlja absorpcija negativne kontrole (brez celic).

Pripravili smo 0,1 % koncentracijo barvila kristal vijolično (Sigma – Aldrich Chemie GmbH, Ltd Irvine, Ayrshire, UK) v natrijevem fosfatnem pufru (10 mM natrijev fosfatni pufer-PB,  $\text{Na}_2\text{HPO}_4 / \text{NaH}_2\text{PO}_4$ , pH 7.4).

Celicam v mikrotiterskih ploščah s 24 razdelki smo odsesali gojišče in jih sprali z 1 ml natrijevega fosfatnega pufra ter jim v vsak razdelek dodali 200  $\mu\text{l}$  raztopine kristal vijoličnega. Po končani inkubaciji 30 min na sobni temperaturi smo barvilo previdno odpipetirali in celice trikrat sprali s pufrom: prvič z 200  $\mu\text{l}$ , drugič s 500  $\mu\text{l}$ , tretjič z 1 ml. S postopnim večanjem volumna pufra smo se izognili robu zasušenega barvila na steni vsakega razdelka, ki bi sicer bistveno povečal absorbanco. Nazadnje smo celice lizirali z 1 ml 10 % očetne kisline na razdelek. Celoten postopek barvanja smo izvedli tudi na vzorcu brez celic in izmerjeno vrednost uporabili kot ozadje.

V roku ene ure smo izmerili absorpcijo pri 595 nm s čitalcem mikrotiterskih plošč Tecan (Tecan infinite M200; Tecan Austria GmbH) s programom Magellan (Tecan Austria



GmbH). Na podlagi dobljenih vrednosti smo izračunali delež preživetja celic glede na kontrolo za vsako amplitudo električnih pulzov posebej po formuli:

Delež preživelih celic = (abs. elektroporiranih celic – abs. ozadja) / (abs. kontrole – abs. ozadja) X 100 [%]

Končno vrednost deleža preživelih celic pri določeni amplitudi električnih pulzov predstavlja povprečna vrednost deležev preživelih celic treh neodvisnih poskusov ± standardna deviacija. Rezultate preživetja celic smo predstavili s krivuljami preživetja celic v odvisnosti od amplitude električnih pulzov.

Primerjavo končnih vrednosti preživetja celic, ki so bile po poizkusu inkubirane 24 h, in celic, ki so bile inkubirane 48 h, smo ovrednotili na podlagi statističnega testa za primerjavo dveh parametrov, Studentovega t-testa. Med seboj smo primerjali preživetje celic po elektroporaciji pri določeni amplitudi električnega pulza. Za vsako amplitudo električnega pulza smo primerjali preživetje celic, dobljeno pri omenjenih dveh različnih časih inkubacije.

### **3.2.2 Preživetje celic glede na uporabljeni test: test MTT, metoda barvanja s kristal vijoličnim in test klonogenosti**

Rezultate preživetja celic, ki smo jih dobili s testom MTT in z metodo barvanja s kristal vijoličnim, ter preživetje celic, določeno s testom klonogenosti (Kandušer in sod., 2006), smo primerjali na podlagi statističnega testa za primerjavo dveh parametrov, Studentovega t-testa. Med seboj smo primerjali deleže preživetja celic po elektroporaciji pri določeni amplitudi električnega pulza. Za vsako amplitudo električnega pulza smo primerjali preživetje celic, dobljeno po omenjenih treh različnih metodah, po principu vsakega z vsakim.

## **3.3 VPLIV RUTENIJEVE SPOJINE KP1019 IN ELEKTROPORACIJE NA PREŽIVETJE CELIC**

### **3.3.1 Vpliv rutenijeve spojine KP1019 na preživetje celic**

Rutenijevo spojino KP1019 v prahu (prof. dr. dr. B. K. Keppler, Univerza na Dunaju), skladiščeno v zamrzovalniku, smo raztopili v natrijevem fosfatnem pufri (pH 7.4). Zaradi slabe topnosti spojine smo po 10 min mešanju na vorteksu pripravili kar nasičeno, to je 300 µM KP1019 raztopino. V plastičnih epruvetkah smo pripravljene celične suspenziji (glej 3.1) dodali prefiltrirano raztopino KP1019, tako da smo dobili končno delovno koncentracijo 30 µM KP1019 v celični suspenziji. Kontrolni smo namesto KP1019

raztopine dodali enak volumen natrijevega fosfatnega pufru (10 mM natrijev fosfatni pufer-PB,  $\text{Na}_2\text{HPO}_4 / \text{NaH}_2\text{PO}_4$ , pH 7.4).

Celice smo izpostavili delovanju KP1019 za 40 min in 24 h. Za 40 minutno izpostavljenost celic smo pripravljeno celično suspenzijo s  $30 \mu\text{M}$  KP1019 inkubirali 40 min v plastičnih epruvtkah na sobni temperaturi. Nato smo na mikrotitersko ploščo s 24 razdelki odpipetirali ustrezno gojišče in suspenzijo inkubiranih celic s KP1019, da smo dobili v vsakem razdelku  $10^5$  celic. Celice smo v ustreznem gojišču s hranili inkubirali 24 h v inkubatorju na  $37^\circ\text{C}$  v atmosferi s 5 %  $\text{CO}_2$ .

Za 24 h izpostavljenost celic delovanju KP1019 smo morali celicam zaradi dolgotrajne inkubacije zagotoviti zadostno količino hranil že v raztopini s KP1019, zato smo celično suspenzijo s koncentracijo  $20 \times 10^6$  celic/ml namesto v pufru pripravili v ustreznem gojišču z dodanim FCS (glej 3.1). Prefiltrirano raztopino  $300 \mu\text{M}$  KP1019 smo dodali celični suspenziji, da smo dobili končno  $30 \mu\text{M}$  KP1019 v celični suspenziji z gojiščem. Celice smo inkubirali 24 h v inkubatorju na  $37^\circ\text{C}$  v atmosferi s 5 %  $\text{CO}_2$ .

Delež preživelih celic smo določali po 24 h inkubacije celic v inkubatorju na  $37^\circ\text{C}$  v atmosferi s 5 %  $\text{CO}_2$  s testom MTT (glej 3.2.1.1). Celoten poskus smo trikrat ponovili, vsakič v štirih paralelkah.

Odstotek preživelih celic pri vsaki vrednosti parametra v poizkusu smo izrazili kot kvocient med povprečno vrednostjo absorpcij tretirane skupine celic in povprečno vrednostjo absorpcij kontrolne, netretirane skupine celic.

Delež preživelih celic = (abs. tretiranih celic / abs. kontrole ) X 100 [%]

Absorpcija kontrole predstavlja torej 100 % preživetje.

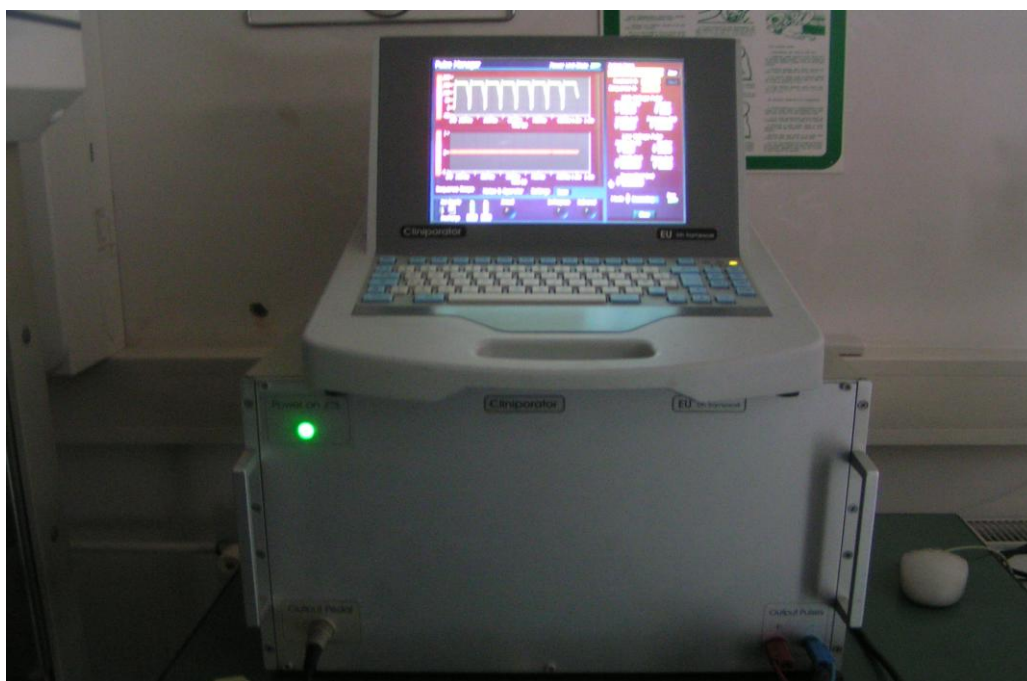
Končno vrednost deleža preživelih celic pri določenem parametru predstavlja povprečna vrednost deležev preživelih celic treh neodvisnih poskusov  $\pm$  standardna deviacija. Rezultate smo predstavili s histogramom, kjer vsak stolpec predstavlja preživetje celic pri določenem parametru, torej po določenem času izpostavljenosti  $30 \mu\text{M}$  KP1019 (0 min, 40 min, 24 h). Dobljene rezultate smo primerjali in ovrednotili na podlagi statističnega testa za primerjavo dveh parametrov, Studentovega t-testa.

### 3.3.2 Vpliv rutenijeve spojine KP1019 in elektroporacije na preživetje celic

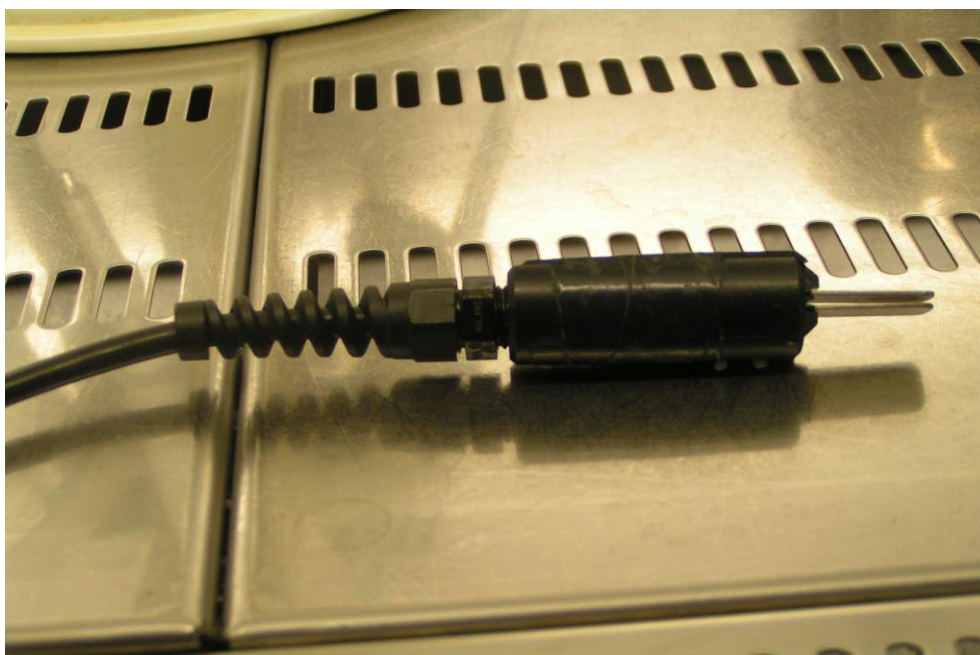
Protokol in parametre elektroporacije smo povzeli po članku Biček in sod. (2007), kjer je bil obravnavan vpliv rutenijeve spojine NAMI-A in elektroporacije na preživetje celic B16F1. Za določanje preživetja celic smo izbrali test MTT, ki se v literaturi pojavlja kot

eden izmed najpogosteje uporabljenih testov. Test MTT smo za vsak poizkus, kjer je bilo to mogoče, opravili 24 h in 48 h po opravljenem poizkusu, zato smo vsak poizkus izvedli v dveh paralelkah in celice inkubirali na dveh mikrotiterskih ploščah s 24 razdelki z ustrežno koncentracijo celic za določen čas inkubacije.

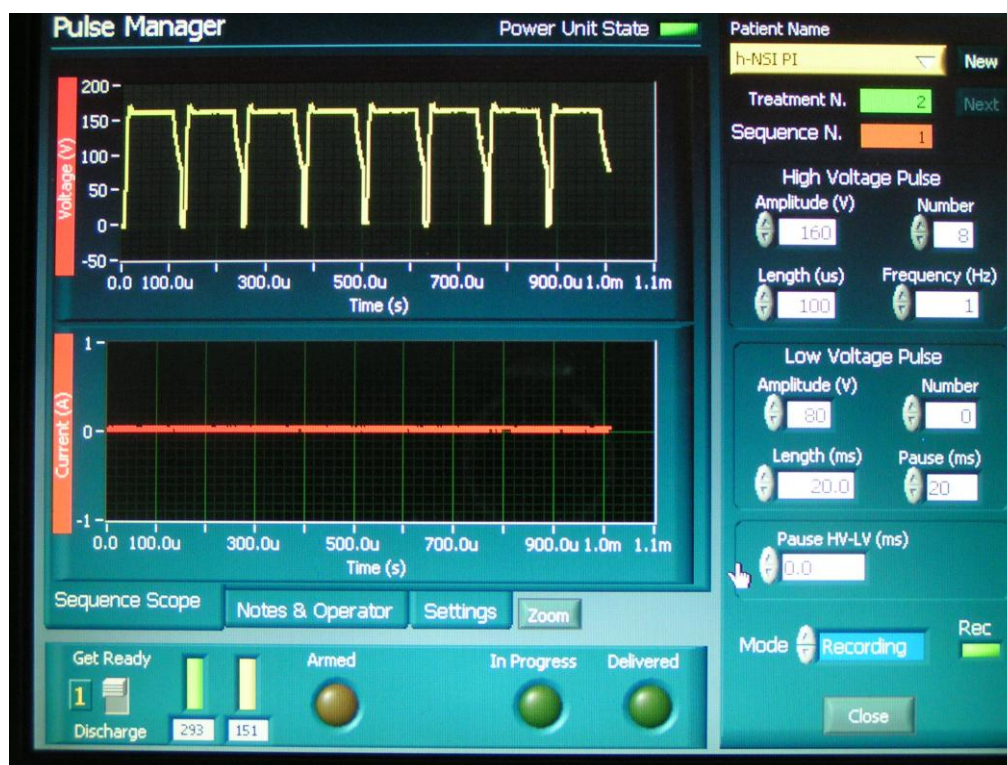
Pri poizkusih smo uporabili elektroporator Cliniporator (Igea, Carpi, Italy). 55  $\mu$ l kapljico pripravljene celične suspenzije z ali brez 30  $\mu$ M KP1019 (glej 3.3.1) smo s pipeto nanесли med vzporedni ploščati elektrodi iz nerjavečega jekla, razmaknjeni za 2 mm. Celice smo elektroporirali z vlakom osmih električnih pulzov (160 V, 100  $\mu$ s, 1 Hz). Celic v kontroli nismo izpostavili električnemu polju.



Slika 3.1 Elektroporator Cliniporator (Igea, Carpi, Italy).



Slika 3.2 Elektrode, ki omogočajo generiranje homogenega električnega polja.



Slika 3.3 Slika prikazuje zapis na zaslonu računalnika, ki je povezan z elektroporatorjem, po generiranju elektroporacijskih pulzov z elektroporatorjem Cliniporator (pulzi  $8 \times 100 \mu\text{s}$ , amplituda 160 V, frekvenca 1 Hz).

Po končani elektroporaciji smo vsako 50 µl kapljico celične suspenzije, v kateri je bilo  $10^6$  celic, odpipetirali v svoj razdelek na mikrotiterski plošči in jih za 10 minut inkubirali na 37 °C v gojišču Spinner's minimum essential medium brez kalcija (Sigma – Aldrich Chemie GmbH, Ltd Irvine, Ayrshire, UK). Nato smo na novo mikrotitersko ploščo odpipetirali ustrezno razmerje gojišča (EMEM za B16F1 oziroma F12 HAM za CHO) in inkubirane celične suspenzije, da smo dobili v vsakem razdelku  $10^5$  celic/ml za 24 h inkubacijo oziroma  $10^4$  celic/ml za 48 h inkubacijo.

Celice smo inkubirali 24 h in 48 h v inkubatorju na 37 °C v atmosferi s 5 % CO<sub>2</sub>. Po inkubaciji smo preživetje celic določili s testom MTT (glej 3.2.1.1). Celoten poskus smo trikrat ponovili, vsakič v štirih paralelkah.

Odstotek preživelih celic pri vsaki vrednosti parametra v poizkusu smo izrazili kot kvocient med povprečno vrednostjo absorpcij tretirane skupine celic in povprečno vrednostjo absorpcij kontrolne netretirane skupine celic.

Delež preživelih celic = (abs. tretiranih celic / abs. kontrole ) X 100 [%]

Absorpcija kontrole predstavlja torej 100 % preživetje.

Končno vrednost deleža preživelih celic pri določenem parametru predstavlja povprečna vrednost deležev preživelih celic treh neodvisnih poskusov ± standardna deviacija. Rezultate smo predstavili s histogramom, kjer vsak stolpec predstavlja preživetje celic pri določenem parametru (elektroporacija, elektroporacija v kombinaciji s 30 µM KP1019, 30 µM KP1019). Preživetje izmerjeno 24 h po inkubaciji smo predstavili na enem histogramu, preživetje izmerjeno po 48 h pa na drugem. Dobljene rezultate smo primerjali in ovrednotili na podlagi statističnega testa za primerjavo dveh parametrov, Studentovega t-testa.

## 4 REZULTATI

Vsi poizkusi so bili opravljeni v celičnem laboratoriju Laboratorija za biokibernetiko na Fakulteti za elektrotehniko Univerze v Ljubljani.

V uvodnih poizkusih smo se osredotočili na različne teste za merjenje preživetja celičnih linij z namenom, da izberemo najprimernejšega za nadaljnje delo. V poizkusih, ki so sledili, smo preučevali vpliv rutenijevega kompleksa KP1019 in elektroporacije na preživetje celičnih linij B16F1 in CHO.

### 4.1 PRIMERJAVA TESTOV ZA DOLOČANJE PREŽIVETJA CELIC

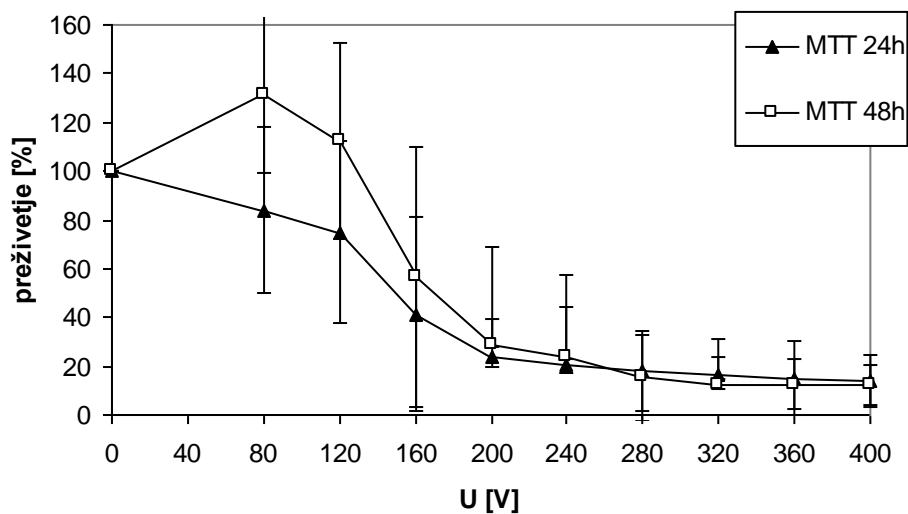
Zanimalo nas je, kakšna je primerljivost testov za merjenje preživetja celic: testa MTT, metode barvanja s kristal vijoličnim in testa klonogenosti. Primerjavo smo izvedli na meritvah deleža preživelih celic B16F1 v odvisnosti od jakosti električnega polja.

Preučevali smo, kako se rezultat izmerjenega preživetja celic, dobljen s testom MTT 24h po končanem poizkusu, razlikuje od rezultata preživetja dobljenega 48h po končanem poizkusu. Prav tako nas je zanimala razlika v rezultatih, dobljenih po metodi barvanja s kristal vijoličnim 24h in 48h po končanem poizkusu. Rezultate izmerjenega preživetja smo končno primerjali tudi med testom MTT, metodo barvanja s kristal vijoličnim in testom klonogenosti. Na podlagi statističnega testa Studentov t-test smo primerjali povprečne vrednosti deleža preživelih celic iz treh poizkusov  $\pm$  standardna deviacija. Rezultate primerjav smo podali v obliki vrednosti percentilnega ranga Studentovega t-testa s 95 % intervalom zaupanja.

#### 4.1.1 Preživetje celic glede na čas inkubacije po opravljenem poizkusu

##### 4.1.1.1 Rezultati testa MTT

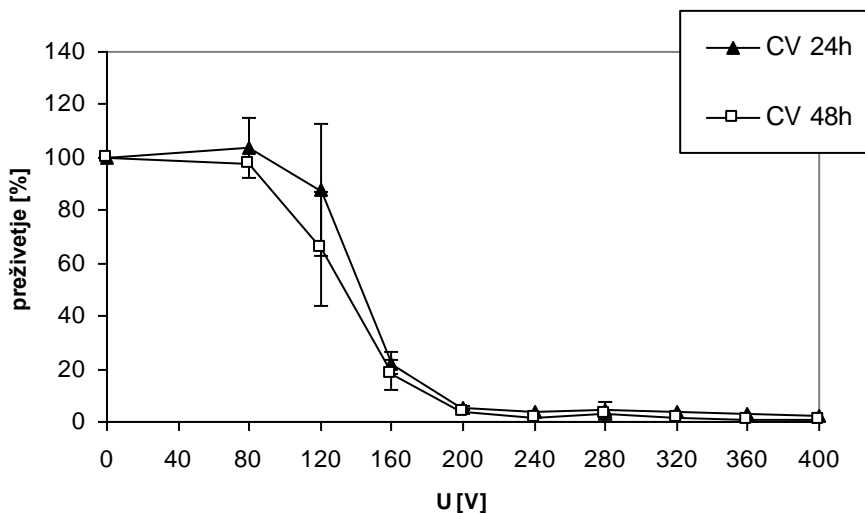
Rezultati testa MTT kažejo, da preživetje celic z amplitudo električnih pulzov ne glede na inkubacijski čas podobno pada. Največjo razliko v izmerjenem preživetju celic opazimo pri 80 V in 120 V, kjer je preživetje celic izmerjeno po 48 h celo naraslo in znatno preseгло 100 %, medtem ko je preživetje izmerjeno 24 h po elektroporaciji glede na kontrolo upadlo. Vseeno se pri nobeni amplitudi električnih pulzov vrednosti preživetji po 24 h in 48 h inkubacije statistično ne razlikujeta ( $P > 0,1$ ). Zaradi relativno velike standardne deviacije, ki je posledica majhnega števila vzorcev, pa bi bilo dobro poizkus še nekajkrat ponoviti.



Slika 4.1 Delež preživetja celic B16F1 v odvisnosti od jakosti električnih pulzov in inkubacijskega časa, po katerem je bil izveden test MTT. Temni simboli predstavljajo preživetje 24 h po poizkusu, svetli pa 48 h po poizkusu. Vsaka točka na sliki predstavlja povprečje treh poizkusov  $\pm$  standardna deviacija.

#### 4.1.1.2 Rezultati barvanja s kristal vijoličnim (CV)

Podobno kot pri testu MTT rezultati z metodo barvanja s kristal vijoličnim kažejo upad preživetja celic z naraščanjem amplitude električnih pulzov ne glede na inkubacijski čas. Preživetji celic določeni 24 h in 48 h po inkubaciji se pri nobeni amplitudi električnih pulzov statistično ne razlikujeta ( $P > 0,1$ ). Omeniti pa moramo še, da je zaradi majhnega števila vzorcev standardna deviacija relativno velika, zato bi bilo dobro poizkus še nekajkrat ponoviti.



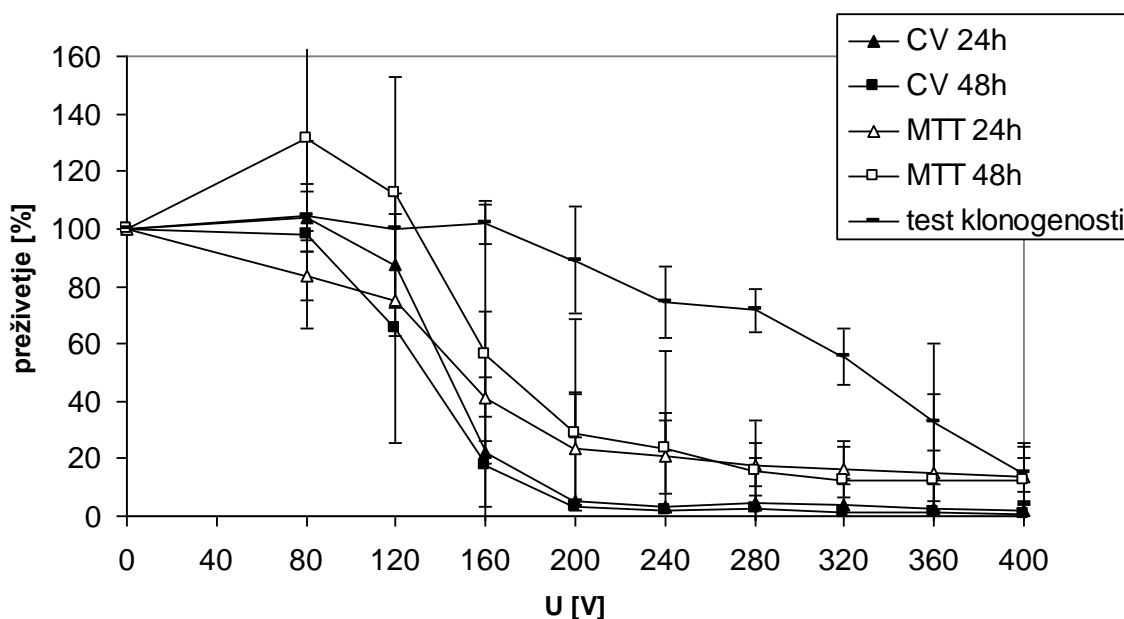
Slika 4.2 Delež preživetja celic B16F1 v odvisnosti od jakosti električnih pulzov in inkubacijskega časa, po katerem je bil izveden test z barvanjem s kristal vijoličnim. Temni simboli predstavljajo preživetje 24 h po poizkusu, svetli pa 48 h po poizkusu. Vsaka točka na sliki predstavlja povprečje treh poizkusov  $\pm$  standardna deviacija.

#### 4.1.2 Rezultati primerjave metod testa MTT, metode barvanja s kristal vijoličnim (CV) in testa klonogenosti

Po statistični primerjavi vseh rezultatov, ki smo jih dobili z obema metodama pri obeh inkubacijskih časih, ugotovimo, da se rezultati statistično med seboj ne razlikujejo ( $P > 0,1$ ). Med seboj se statistično ne razlikujejo niti vrednosti dobljene po 48 h inkubacije s testom MTT in barvanjem s kristal vijoličnim, ki sicer zavzemajo najbolj različne vrednosti.

Za razliko od tega se vrednosti preživetja celic, določene s testom klonogenosti (Kandušer in sod., 2006), ki se razlikujejo od naših vrednosti, na intervalu med 160 V in 360 V, tudi statistično razlikujejo od vseh naših rezultatov ( $P < 0,01$ ). Preživetje celic je pri Kandušer in sod. (2006) padlo pod 60 % pri 320 V, medtem ko je pri nas v vseh štirih primerih že pri 160 V. Pri Kandušer in sod. (2006) je bilo preživetje celic pri 160 V še vedno nespremenjeno (približno 100%).





Slika 4.3 Delež preživetja celic B16F1 v odvisnosti od jakosti električnih pulzov, uporabljenega testa za določanje preživetja celic in inkubacijskega časa, po katerem je bil test izveden. Temni simboli predstavljajo test z barvanjem s kristal vijoličnim, svetli test MTT, črtice pa test klonogenosti. Trikotniki predstavljajo preživetje 24 h po poizkusu, kvadrati pa 48 h po poizkusu. Vsaka točka na sliki predstavlja povprečje treh poizkusov  $\pm$  standardna deviacija.

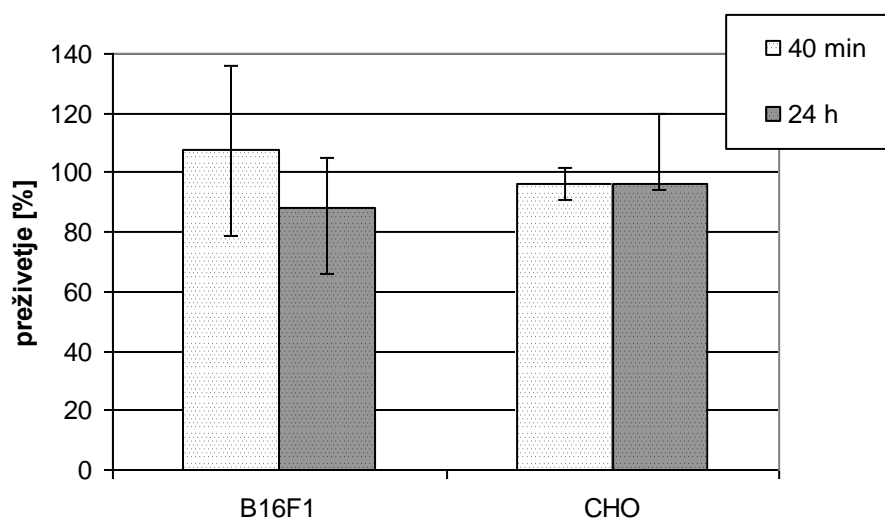
## 4.2 VPLIV RUTENIJEVE SPOJINE KP1019 IN ELEKTROPORACIJE NA PREŽIVETJE CELIČNIH LINIJ B16F1 IN CHO

Preučevali smo citotoksičen vpliv KP1019 na preživetje celic pri različnih časih izpostavljenosti celic KP1019 (0 min, 40 min, 24 h). Rezultate smo podali v obliki deleža preživelih celic  $\pm$  standardna deviacija (slika 4.4). Rezultate smo med seboj primerjali na podlagi statističnega testa Studentov t-test.

Raziskali smo tudi, kakšen je citotoksičen vpliv KP1019 v kombinaciji z elektroporacijo na preživetje celic in koliko k temu prispeva sama elektroporacija. Rezultate smo podali v obliki deleža preživelih celic  $\pm$  standardna deviacija (slika 4.5 in slika 4.6).

### 4.2.1 Rezultati citotoksičnega vpliva rutenijeve spojine KP1019

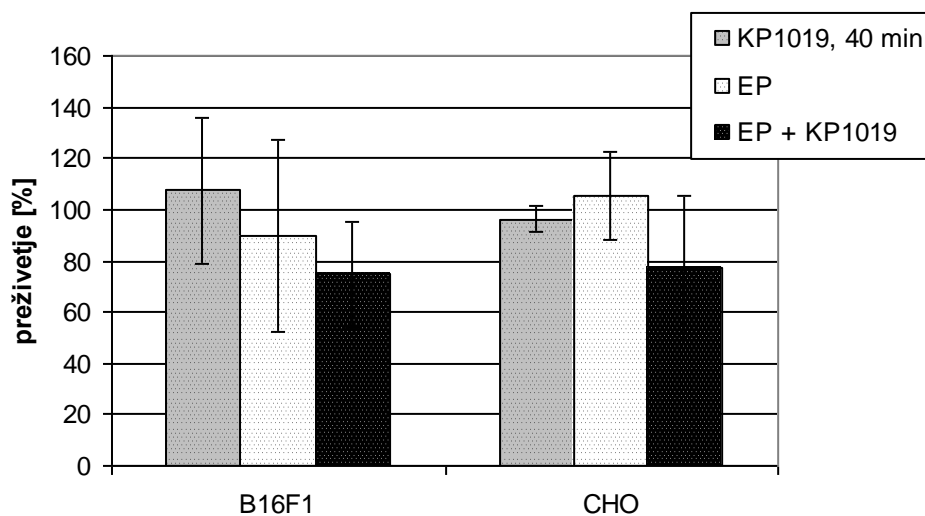
Rezultati kažejo, da se delež preživelih celic z daljšanjem časa izpostavljenosti celic (do 24 h) 30  $\mu$ M koncentraciji kemoterapevtika KP1019 statistično ne spremeni ( $P=0,7$  za B16F1 in CHO). Enako lahko ugotovimo pri obeh celičnih linijah (slika 4.4).



Slika 4.4 Delež preživetja celic B16F1 in CHO v odvisnosti od časa inkubacije celic v KP1019. Bela stolpca predstavljata preživetje po 40 min inkubacije, siva pa po 24 h. Vsak stolpec na sliki predstavlja povprečje treh poizkusov  $\pm$  standardna deviacija.

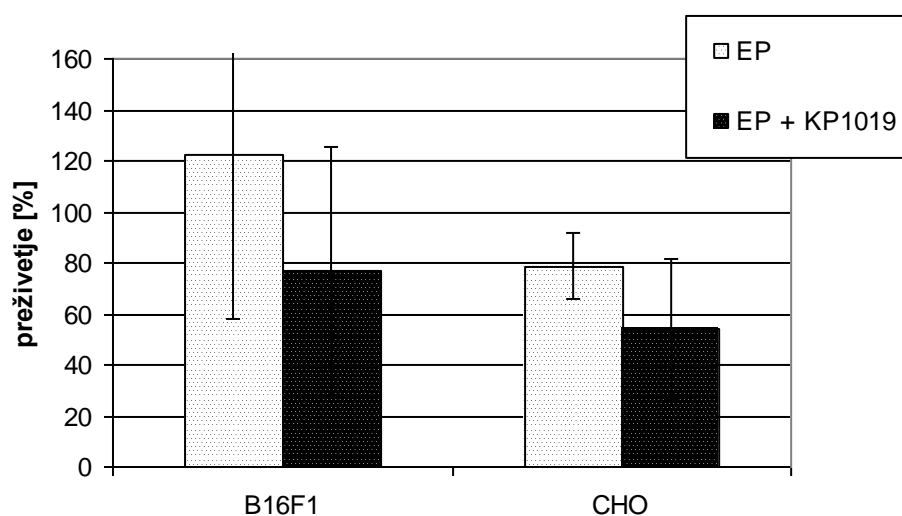
#### 4.2.2 Rezultati citotoksičnega vpliva rutenijeve spojine KP1019 v kombinaciji z elektroporacijo

Rezultati po 24 h inkubaciji celic po poizkusu pri obeh celičnih linijah nakazujejo zmanjšano preživetje celic tretiranih s KP1019 v kombinaciji z elektroporacijo, vendar statistična obdelava tega ne potrjuje. Preživetje celic tretiranih s KP1019 40 min se statistično ne razlikuje od preživetja celic tretiranih s KP1019 v kombinaciji z elektroporacijo ( $P=0,2$  za B16F1 in  $P=0,3$  za CHO). Poleg tega pri obeh celičnih linijah rezultati pokažejo, da se preživetje elektroporiranih celic statistično ne razlikuje od preživetja celic elektroporiranih ob prisotnosti KP1019 ( $P=0,6$  za B16F1 in  $P=0,2$  za CHO). Tudi primerjava preživetja med obema celičnima linijama pri posameznem parametru ni pokazala nobenih statističnih razlik ( $P=0,9$  pri EP + KP1019), (slika 4.5).



Slika 4.5 Delež preživetja celic B16F1 in CHO v odvisnosti od različnih tretmajev celic, izmerjen po 24 h inkubacije. Siva stolpca predstavljata preživetje pri 40 min inkubacije celic v KP1019, bela stolpca predstavljata preživetje po elektroporaciji celic v pufru brez KP1019, črna pa po elektroporaciji celic v pufru s KP1019. Vsak stolpec na sliki predstavlja povprečje treh poizkusov  $\pm$  standardna deviacija.

Prav tako nam rezultati po 48 h inkubaciji celic po poizkusu pri obeh celičnih linijah kažejo, da se preživetje elektroporiranih celic statistično ne razlikuje od preživetja celic elektroporiranih ob prisotnosti KP1019 ( $P=0,4$  za B16F1 in  $P=0,2$  za CHO), čeprav se kaže tendenca, da elektroporacija potencira citotoksičen učinek samega KP1019. Primerjava preživetja med obema celičnima linijama pri posameznem parametru pa tudi pri tem poizkusu ni pokazala nobenih statističnih razlik ( $P=0,5$  pri EP + KP1019), (slika 4.6).



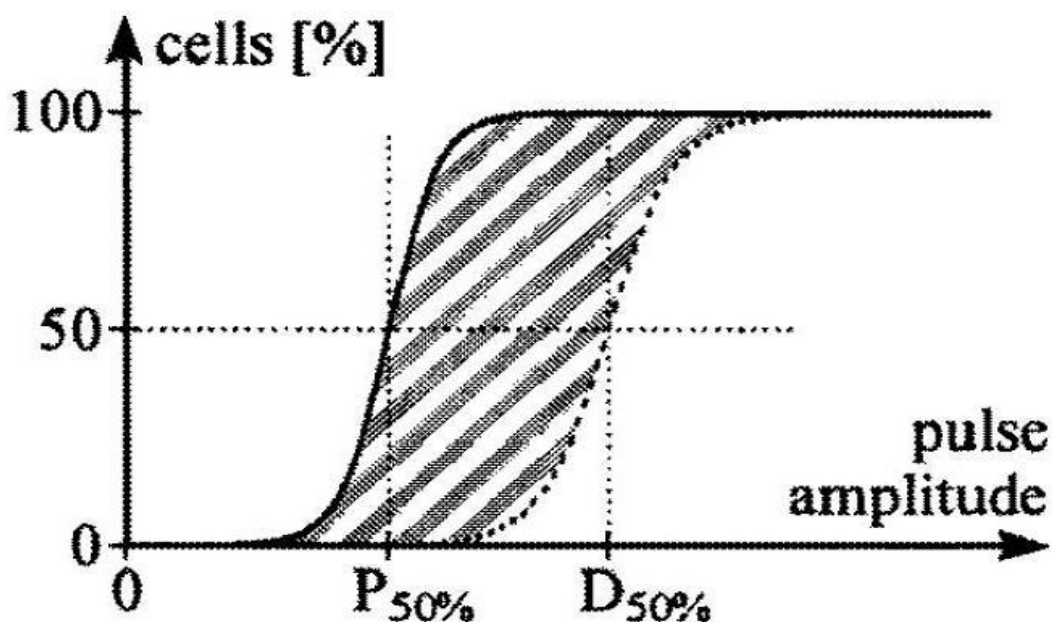
Slika 4.6 Delež preživetja celic B16F1 in CHO v odvisnosti od različnih tretmajev celic, izmerjen po 48 h inkubacije. Bela stolpca predstavljata preživetje po elektroporaciji celic v pufru brez KP1019, črna pa po elektroporaciji celic v pufru s KP1019. Vsak stolpec na sliki predstavlja povprečje treh poizkusov  $\pm$  standardna deviacija.

## 5 RAZPRAVA IN SKLEPI

### 5.1 RAZPRAVA

Namen naše naloge je bil raziskati, kako elektroporacija vpliva na citotoksični učinek rutenijeve spojine KP1019. Da bi zajeli širši spekter različnih celic, smo poizkuse izvedli na dveh celičnih linijah, eni tumorski in eni normalni trajni celični liniji. Vpliv elektroporacije na citotoksični učinek KP1019 smo ovrednotili na podlagi rezultatov preživetja celic po elektroporaciji s prisotnim KP1019 v mediju glede na preživetje celic po sami elektroporaciji oziroma po podaljšani inkubaciji celic v KP1019.

Preden smo začeli s poskusi, smo morali izbrati enega izmed testov za določanje preživetja celic in določiti optimalne parametre elektroporacije in inkubacije celic s KP1019. Da bi bil vpliv elektroporacije na citotoksičnost KP1019 jasen, smo morali določiti amplitudo električnih pulzov, pri katerih elektroporacija sama ne bi povzročila upada preživetja celic, obenem pa bi omogočila čimvečji vnos KP1019 v citosol. Iskali smo torej amplitudo električnih pulzov, pri kateri bi bilo razmerje med reverzibilno in ireverzibilno elektroporiranimi celicami čimvečje oziroma najvišjo amplitudo električnih pulzov, pri kateri preživetje celic še ne upade (slika 5.1).



Slika 5.1 Področje reverzibilno elektroporiranih celic. Neprekinjena črta predstavlja delež reverzibilno elektroporiranih celic, črtkana črta pa delež odmrlih celic. Osenčeno področje predstavlja področje reverzibilne elektroporacije (Kotnik in sod., 2000: 921).

### 5.1.1 Primerjava testov za določanje preživetja celic

Da bi izbrali test za določanje preživetja celic, ki bi nam zagotavljal najboljšo kombinacijo točnosti in natančnosti ter poleg tega omogočal preprosto in hitro delo, smo najprej naredili nekaj uvodnih poizkusov, kjer smo primerjali tri različne teste: test MTT, barvanje s kristal vijoličnim in test klonogenosti. Ugotovili smo, da se rezultati preživetja celic dobljeni s testom MTT in testom CV, statistično ne razlikujejo, medtem ko se rezultati testa klonogenosti statistično razlikujejo od rezultatov ostalih dveh metod (Sl.: 4.3). Prav tako ni statistične razlike v preživetju celic glede na inkubacijski čas celic od končanega poizkusa do merjenja preživetja. Točnost rezultatov smo ugotavljali na podlagi podatkov iz literature (Kandušer in sod., 2006).

Po pričakovanjih smo ugotovili, da je preživetje celic izmerjeno s testom MTT primerljivo z rezultati barvanja s kristal vijoličnim. Prav tako so med seboj primerljivi rezultati dobljeni po različnih inkubacijskih časih. Presenetila pa nas je statistična razlika med našimi rezultati in rezultati testa klonogenosti (Kandušer in sod., 2006). Z vsemi uvodnimi poizkusi smo namreč izmerili 40 % upad preživetja celic že pri 160 V, medtem ko bi po podatkih v literaturi pričakovali tak upad šele pri 320 V, pri 160 V pa naj upada preživetja

sploh ne bi bilo (0 %) (Sl.: 4.3). Glede na to, da smo dobili podobne rezultate s kar štirimi različnimi testi, sklepamo, da razlog za to ni neustreznost testov. Predvidevamo, da so taki rezultati posledica spremenjenih celic v subkulturi. Poizkuse smo načeloma ponavljali vsakič na novi subkulturi odmrznjenih celic določene trajne celične linije. V uvodnih poizkusih pa smo zaradi časovne stiske ponovitve izvedli sicer s časovnim zamikom nekaj dni, vendar kar na isti subkulturi. Pri tem se je neka sprememba lastnosti osnovne celične linije seveda izrazila pri vseh poizkusih. Pri primerjavi uporabljenih testov so ti rezultati vseeno uporabni, saj so bile pri vseh testih uporabljene iste celice. Neuporabni pa so ti rezultati za preverjanje točnosti uporabljenih testov in za primerjavo rezultatov z rezultati iz referenc. V ta namen bi morali poizkuse ponoviti na različnih subkulturah trajne celične linije. Glede na rezultate, ki smo jih dobili v uvodnih poizkusih, smo ocenili, da izbira testa za določanje preživetja celic in izbira amplitude električnih pulzov elektroporacije za nadaljnje poizkuse ne more temeljiti na teh rezultatih. Po pregledu literature smo se odločili za enega izmed najpogosteje uporabljenih hitrih testov za merjenje preživetja celic-test MTT, za katerega obstaja dokazana zelo visoka korelacija s testom klonogenosti pri preučevanju delovanja citostatikov (Shimoyama, 1989; Čemažar, 1996) in z radioaktivnimi tehnikami (Hussain in sod., 1993). Prav tako smo se na podlagi literature odločili za amplitudo elektroporacije 160 V na ploščatih elektrodah razmaknjenih 2 mm, kar torej pomeni pri jakosti homogenega električnega polja 800 V/cm. Pri izbranih parametrih je namreč razmerje med deležem reverzibilno elektroporiranih in deležem ireverzno elektroporiranih celic B16F1 največje (Kandušar in sod., 2006; Biček in sod., 2007).

Našo pozornost je pritegnilo različno preživetje celic, izmerjeno pri različnih inkubacijskih časih s testom MTT pri 80 V in prav tako pri 120 V (slika 4.3). Pričakovali smo namreč, da bo preživetje pri teh amplitudah električnih pulzov nespremenjeno in da razlike med rezultati različnih testov in različnih inkubacijskih časov ne bodo velike. Izkazalo pa se je ravno nasprotno. Razpon med najmanjšim in največjim deležem preživetja je bil prav na tem intervalu največji in je zavzemal kar 50 % preživetja kontrole (80–130 % pri 80 V in 65–115 % pri 120 V). Menimo, da je razlog za tako različne rezultate preživetja uporaba testov, ki temeljijo na zelo različnih celičnih mehanizmih in lastnostih. Pri testu CV namreč določamo preživetje na podlagi dejstva, da so žive celice pritrjene, mrtve pa ne. Test CV v bistvu izmeri delež pritrjenih celic (glej 3.2.1.2), medtem ko nam test MTT izmeri delež metabolno aktivnih celic (glej 3.2.1.1). Prav ta razlika pa se najbolj izrazi pri nižjih vrednostih zunanjšega električnega polja, ki za celice pomenijo stresni dejavnik, ne pa tudi citocidnega. Test MTT zato 24 h po elektroporaciji, ko so celice še vedno v lag fazi celične rasti z zmanjšano metabolno aktivnostjo, pokaže upad »preživetja« celic zaradi upada metabolne aktivnosti celic izpostavljenih stresu elektroporacije. Po 48 h, ko

preživele celice preidejo v eksponencialno fazo rasti z izrazito povečano metabolno aktivnostjo kot posledico stresa, pa s testom MTT določimo izrazito povečano »preživetje«. S testom CV ne dobimo tako različnih vrednosti glede na inkubacijski čas. Preživele celice so namreč v enaki meri pritrjene na podlago ne glede na to, v kateri fazi celične rasti se nahajajo.

Poleg že omenjenih ponovitev poizkusov določanja preživetja celic s testom MTT in metodo barvanja s kristal vijoličnim, bi bilo zanimivo preizkusiti tudi nove teste. Bolj natančna naj bi bila metoda, ki združuje tri običajno ločene teste: barvanje z nevtral rdečim, test MTT in barvanje s kristal vijoličnim, ki si sledijo eden za drugim na istih celicah. Metoda je na račun natančnosti dolgotrajnejša (Chiba in sod., 1998). Zelo hitro in natančno pa je določanje preživetja celic na podlagi merjenja celokupne citosolne mRNA, ki je dokazano tudi v dobri korelaciji z rezultati testa MTT. Rezultate pri tem testu dobimo že po 12 h, kar je občutno hitreje kot pri testu MTT, kjer je za to potrebnih 48 h. Zaradi hitrosti testa in posledično krajše inkubacije je njegova prednost tudi manjša poraba gojišča (Miura in sod., 1997).

### **5.1.2 Vpliv rutenijeve spojine KP1019 in elektroporacije na preživetje celičnih linij B16F1 in CHO**

Da bi ugotovili, ali se citotoksičnost KP1019 po elektroporaciji celic poveča, smo morali protokol poizkusa sestaviti tako, da upad preživetja celic zaradi samega KP1019 ne bi bil prevelik. V ta namen smo morali najprej določiti primerno koncentracijo KP1019, pri kateri se preživetje celic tudi po daljši izpostavljenosti KP1019 ne bi bistveno znižalo. Upoštevajoč slabo topnost KP1019 in protokol elektroporacije, smo ugotovili, da je za nas maksimalna možna delavna koncentracija KP1019 30  $\mu$ M. Ker pri tej koncentraciji tudi po 24 h preživetje celic ni upadlo, smo se odločili, da vse nadaljnje poizkuse izvedemo pri tej koncentraciji.

Amplituda električnih pulzov pri elektroporaciji je bila 160 V, ker naj bi bilo razmerje med reverzibilno in ireverzibilno elektroporiranimi celicami pri 160 V največje (Kandušer in sod. 2006). Rezultati uvodnih poizkusov nam tega niso potrdili, kar si razlagamo z mutacijo subkulture celične linije. To nam potrjujejo tudi vsi nadaljnji poizkusi, kjer se preživetje celic v kontroli, ki je bila elektroporirana pri 160 V brez KP1019, giblje med 80 in 120 %.

KP1019 deluje selektivno na tumorske celice, saj imajo te na membrani izraženih več transferinskih receptorjev, odgovornih za vnos KP1019 v celico. Pričakovali smo, da bo zato upad preživetja celic mišjega melanoma B16F1 v primerjavi s celicami CHO večji. Po naših rezultatih se po 40 min izpostavljenosti celic KP1019 preživetje med obema linijama



celic ne razlikuje. Po 24 h izpostavljenosti celic KP1019 se sicer nakazuje manjše preživetje celic B16F1, vendar statistične razlike med obema vrstama celic tudi tu ni (Hartinger in sod. 2006).

Glede na rezultate Kapitza in sod. (2005), ki je spremljal preživetje tumorskih celic SW480 in LT97 v odvisnosti od koncentracije KP1019, smo pričakovali podobne rezultate vsaj pri tumorskih celicah mišjega melanoma B16F1. Pri 30  $\mu$ M KP1019 je preživetje za SW480 50 % in za LT97 70 %, medtem ko je ostalo pri našem poizkusu preživetje tako pri celicah B16F1 kot pri celicah CHO nespremenjeno. Vzrok za to razliko je lahko preprosto v izbiri celičnih linij, po drugi strani pa ne smemo zanemariti pomena izredno variabilne stabilnosti molekule KP1019 v odvisnosti od pH in temperature. Po podatkih iz literature v vodi in na sobni temperaturi v 1 h hidrolizira samo 0,5 % molekul KP1019, medtem ko na 37 °C dosežemo 50 % hidrolizo pri pH 6.0 po 5.4 h in pri pH 7.4 (fiziološki pH) že prej kot v pol ure (Hartinger in sod., 2006). Preverili smo, v kakšnih pogojih je bila naša raztopina KP1019, in ugotovili, da je od priprave raztopine do začetka inkubacije celic morala miniti približno 1 h. Raztopina je bila sicer na sobni temperaturi, vendar v pufru s pH 7.4. Kolikšen delež KP1019 je v tem času hidroliziral in kakšna je bila dejansko končna koncentracija, v kateri smo inkubirali celice, ter koliko je to prispevalo k nezmanjšanemu preživetju celic, je na podlagi teh podatkov težko presoditi. Poizkus bi bilo smiselno ponoviti, pri čemer bi morali raztopino KP1019 pripraviti šele tik pred inkubacijo celic in tako preprečiti hidrolizo. Vprašljiva je tudi primerljivost rezultatov, dobljenih po 40 min in po 24 h inkubaciji.

Da temperatura močno vpliva na stopnjo hidrolize, ki se je pri omenjenih dveh parametrih razlikovala, smo že omenili. Celice so bile inkubirane bodisi 40 min na sobni temperaturi bodisi 24 h na 37 °C. Poleg tega imajo na stabilnost KP1019 velik vpliv serumski proteini. KP1019 z njimi namreč tvori stabilne proteinske komplekse, ki mu omogočajo prehod preko membrane. V našem poizkusu smo tiste celice, ki smo jih izpostavili KP1019 24 h, inkubirali v gojišču z 10 % FCS, tiste za 40 min pa v pufru. Če upoštevamo vsa našeta dejstva, bi pričakovali pri 24 h inkubaciji v primerjavi s 40 min veliko večji upad preživetja, še posebej pri celicah B16F1. Zato je zelo presenetljivo, da je ostalo preživetje celic nespremenjeno. Ocenili smo, da je razlog za to najverjetneje precej zmanjšana koncentracija KP1019 kot posledica hidrolize, do katere je prišlo tekom postopka priprave KP1019 pred inkubacijo celic. Druga možna razlaga je, da smo po naključju izbrali dve taki celični liniji, ki sta zaradi specifičnih celičnih mehanizmov neobčutljive na KP1019. Glede na raziskave rezistence celic na KP1019, pa je ta možnost izredno majhna (Heffeter in sod., 2005).

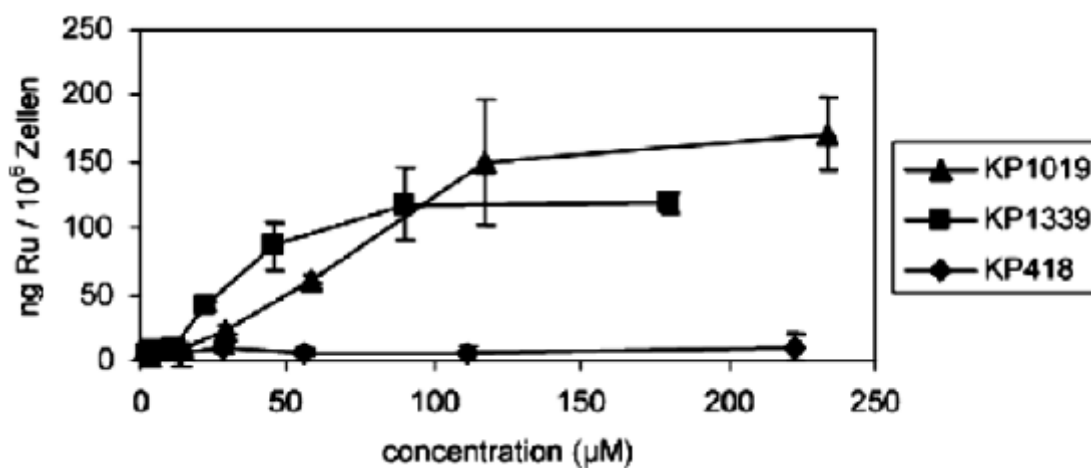
Kot že rečeno bi bilo smiselno poizkus ponoviti, upoštevajoč vsa našeta dejstva in na dodatnih celičnih linijah. Za nadaljnje raziskave v zvezi s KP1019 pa je nujno tudi natančno definirati tako vpliv temperature kot vpliv pH na stopnjo hidrolize KP1019.

V poizkusih, kjer smo preučevali vpliv elektroporacije na citotoksično delovanje KP1019, smo opazili zgolj nakazan statistično nesignifikanten upad preživetja celic, ki so bile elektroporirane ob prisotnosti KP1019. Tudi tu je lahko razlog že prej omenjena hidroliza KP1019, saj smo pri tem poizkusu uporabili isto raztopino 30  $\mu\text{M}$  KP1019, ki je imela po 1 h v neustreznem pH verjetno znižano koncentracijo KP1019. Če je bila že tako nizka koncentracija KP1019 v resnici še dodatno znižana zaradi hidrolize, bi pravzaprav vsakršen upad preživetja že lahko nakazoval potencialno uspešno uporabo elektroporacije za povečanje citotoksičnega učinka KP1019.

Rezultate, ki smo jih dobili v sklopu poizkusov za diplomsko delo, lahko primerjamo z rezultati Biček in sod. (2008), kjer smo po enakem protokolu preučevali vpliv elektroporacije na citotoksičnost KP1339 (natrijeva sol KP1019). Rezultati poizkusov s KP1339 kažejo tudi statistično signifikantno večje preživetje celic tretiranih samo z elektroporacijo ali samo s KP1339 v primerjavi s preživetjem celic tretiranih z elektroporacijo in KP1339 obenem. Rezultat je razumljiv, če upoštevamo, da je bila uporabljena koncentracija KP1339 višja (100  $\mu\text{M}$ ) in je torej tudi večji upad preživetja celic lahko posledica zgolj višje koncentracije kemoterapevtika. Kakorkoli, po rezultatih Biček in sod. (2008) elektroporacija dejansko poveča citotoksični učinek rutenijevih (III) spojin, čeprav je njen prispevek relativno majhen. Pri interpretaciji rezultatov moramo poleg dejstva, da so molekule KP1019 pri fiziološkem pH (pH 7.4) izredno nestabilne, upoštevati tudi dejstvo, da so rutenijeve (III) spojine (KP1019, KP1339) neaktivni prekursorji, ki potrebujejo za aktivacijo reducirajoče okolje. Pri običajnem transmembranskem transportu KP1019, ki poteka z receptorsko posredovano endocitozo, se molekule KP1019 aktivirajo v kislem okolju endosoma (pH  $\sim$  5.5). Ker naj bi pri elektroporaciji molekule prehajale membrano skozi pore direktno v citosol, kjer je pH  $\sim$  7.4, obstaja možnost, da se zaradi neomogočene aktivacije, kljub povečani znotrajcelični koncentraciji, preživetje celic ne bi bistveno zmanjšalo. Smiselno bi bilo torej ločeno raziskovati vpliv različnih dejavnikov na znotrajcelično koncentracijo KP1019 in vpliv različnih dejavnikov na njegov citotoksični učinek.

Poleg že omenjenih rutenijevih (III) spojin (KP1019, NAMI-A, KP1339) je zanimiva tudi spojina KP418 (Imidazolium trans-(tetrachlorobis(1H-indazole) ruthenate(III))), ki v kemoterapiji sicer velja za manj perspektivno zaradi oteženega transmembranskega transporta in posledično nižjega citotoksičnega učinka. Poizkus je bil narejen na tumorskih celicah SW480, ki so privzele 10-krat manj KP418 v primerjavi s KP1019 ali KP1339

(slika 5.2). Prav zaradi te lastnosti pa bi KP418 lahko bil celo bolj perspektiven kemoterapevtik v elektrokemoterapiji (glej 2.3). Vsekakor bi bilo zelo zanimivo preveriti njegov citotoksičen učinek v kombinaciji z elektroporacijo.



Slika 5.2 Privzem KP1019, KP1339 in KP418 v tumorske celice SW480 (Hartinger, 2006: 896).

Poleg omenjene hidrolize lahko na citosolno koncentracijo po elektroporaciji vpliva sam elektroporacijski medij. Za boljšo simulacijo pogojev *in vivo*, v primeru, ko kemoterapevtik injiciramo v krvni obtok, bi morali kot elektroporacijski medij uporabiti gojišče z dodanim 10 % FCS. Predvidevam, da bi uporaba takega gojišča zaradi vezave KP1019 na serumske proteine bistveno vplivala na izid poizkusa. Po eni strani bi se na ta način zaradi bistveno večje stabilnosti KP1019 v proteinskem kompleksu izognili učinku hidrolize KP1019. Po drugi strani pa pri parametrih elektroporacije, ki se običajno uporabljajo za vnos kemoterapevtikov v celice, proteinski kompleksi zaradi svoje velikosti in negativnega naboja ne bi mogli skozi pore. V tem primeru bi na citosolno koncentracijo KP1019 mogoče lahko vplivali s samimi parametri elektroporacije. Uspešno povišanje znotrajceličnega KP1019 bi lahko dosegli z elektroporiranjem celic pri parametrih, ki se uporabljajo za vnos proteinov in DNA v celice, vključujejo pa elektroporacijske pulze, zaradi katerih v membrani nastanejo pore in elektroforetske pulze, ki omogočajo vleko večjih negativnih molekul v notranjost celice. (Neumann, 1999; Rols, 2006). Seveda se tu postavlja vprašanje, ali bi se KP1019 v proteinskem kompleksu sploh lahko aktiviral in povzročil opazen upad preživetja.

Pri citotoksičnem učinku KP1019, kot ga poznamo do sedaj, je bistvenega pomena že omenjena aktivacija molekul, do katere pride z redukcijo v procesu endocitoze. Čeprav metoda elektroporacije verjetno lahko poveča znotrajcelično koncentracijo KP1019, to za povečanje citotoksičnega učinka po naših predvidevanjih ni dovolj, saj ne omogoča aktivacije KP1019. V luči iskanja učinkovitejšega načina za povečanje citotoksičnega

učinka KP1019, ki ne bi temeljil na uporabi višjih koncentracij kemoterapevtika, se nam zdijo zanimivi rezultati, do katerih so prišli Moisescu in sod. (2003). Z izpostavitvijo celic ( $10 \text{ min}^{-1} \text{ h}$ ) zunanemu električnemu polju nizkih jakosti ( $1.3\text{--}2.6 \text{ V/cm}$ ) so namreč uspeli zvišati stopnjo endocitoze *in vitro*. Kombinacija tako povečane stopnje endocitoze v prisotnosti KP1019 bi lahko, glede na poznane mehanizme delovanja KP1019, bistveno povečala njegov citotoksični vpliv. Pospešena endocitoza bi poleg pospešenega transmembranskega transporta KP1019 namreč omogočila tudi aktivacijo molekul KP1019 v kislem okolju endosomov.

## 5.2 SKLEPI

S primerjavo testov za določanje preživetja celic smo ugotovili, da so rezultati testov MTT in metode barvanja s kristal vijoličnim primerljivi. Poleg tega so tudi rezultati meritev, določeni po različnih inkubacijskih časih od opravljenega poizkusa do meritev med seboj primerljivi. Presenetljivo je, da je primerjava testov MTT in metode barvanja s kristal vijoličnim s testom klonogenosti iz reference pokazala statistično pomembno razliko. To si razlagamo s spremembo lastnosti subkulture osnovne trajne celične linije B16F1, do katere je prišlo med oziroma po odmrznitvi celic.

Pri preučevanju citotoksičnega vpliva  $30 \mu\text{M}$  KP1019 na celični liniji B16F1 in CHO tudi po 24 h izpostavljenosti celic kemoterapevtiku KP1019 rezultati niso pokazali statistično značilnega upada preživetja celic. Prav tako je bil statistično neznačilen upad preživetja teh celic tretiranih s  $30 \mu\text{M}$  KP1019 v kombinaciji z elektroporacijo. KP1019 v neugodnih pogojih izredno hitro hidrolizira. Ker smo presodili, da pri izvedbi poizkusov tega nismo upoštevali v zadostni meri, menimo, da bi bilo potrebno poizkuse ponoviti po spremenjenem protokolu, kjer bi preprečili hidrolizo KP1019.

## 6 POVZETEK

Elektroporacija je biofizikalni pojav, pri katerem pride zaradi kratkotrajne izpostavitve celice električnemu polju dovolj visoke jakosti do izrazitega povečanja prepustnosti njene membrane. V kombinaciji s kemoterapevtikom, ki slabo prehaja celično membrano, lahko povzroči znatno povečanje citotoksičnega učinka takega kemoterapevtika. V tej diplomski nalogi smo se najprej osredotočili na primerjavo testov za določanje preživetja celic z namenom, da izberemo najprimernejšega za nadaljnje delo. V poizkusih, ki so sledili, smo na dveh celičnih linijah (B16F1, CHO) primerjali citotoksični vpliv kemoterapevtika KP1019 s citotoksičnim vplivom KP1019 v kombinaciji z elektroporacijo.

Pri primerjavi različnih testov za določanje preživetja celičnih linij (test MTT, metoda barvanja s kristal vijoličnim, test klonogenosti) smo primerjali preživetje celic enega poizkusa, izmerjeno z vsemi tremi testi. Poleg tega smo primerjali tudi rezultate izmerjene po različnih inkubacijskih časih. Primerjava je temeljila na vrednosti percentilnega ranga statističnega testa za primerjavo dveh parametrov – Studentovega t-testa.

Primerjava citotoksičnih vplivov KP1019 v kombinaciji z elektroporacijo ali brez nje je temeljila na primerjavi spektrofotometričnih meritev gostote celic v celični suspenziji in izračunih deleža preživelih celic po različnih tretmajih glede na kontrolo, ki so jo predstavljale netretirane celice.

Ugotovili smo, da so rezultati preživetja celičnih linij določeni s testom MTT in testom CV kljub veliki razpršenosti posameznih meritev, med seboj primerljivi. Enako velja za čas inkubacije celic od opravljenega poizkusa do meritev.

Naše nadaljnje preiskave, kjer smo preučevali citotoksični vpliv kemoterapevtika KP1019 in vpliv elektroporacije na citotoksični učinek KP1019 nam niso dale nobenih oprijemljivih rezultatov. Zaradi nekontrolirane hidrolize kemoterapevtika KP1019 nam je delavna koncentracija, eden izmed ključnih dejavnikov citotoksičnosti, ostala neznan.

Na podlagi rezultatov smo zaključili, da sta testa MTT in CV med seboj primerljivi. Tudi rezultati po različnem inkubacijskem času so med seboj primerljivi.

Elektroporacija ne poveča citotoksičnega učinka 30  $\mu$ M KP1019 na celičnih linijah B16F1 in CHO. Zaradi neugodnih pogojev inkubacije pripravljene raztopine KP1019 predvidevamo, da je prišlo do znatne hidrolize KP1019, zaradi česar je bila končna koncentracija KP1019 precej znižana. Poizkus bi morali ponoviti. Za učinkovitejšo ponovitev pa bi bilo nujno upoštevati možnost hitre hidrolize KP1019 in zato raztopino pripraviti tik preden jo dodamo celicam. Zaradi kompleksnosti fizikalno-kemijskih lastnosti in mehanizma delovanja KP1019 pa predlagamo ločeno preučevanje transmembranskega transporta KP1019 in njegovega citotoksičnega delovanja.

## 7 VIRI

### 7.1 TISKANI VIRI

- Biček A., Turel I., Kandušer M., Miklavčič D. 2007. Combined therapy of the antimetastatic compound NAMI-A and electroporation on B16F1 tumour cells *in vitro*. *Bioelectrochemistry*, 71: 113–117
- Biček A., Kandušer M., Hudej R., Miklavčič D., Jakupc M., Keppler B.K., Turel I. 2008. Ruthenium-based anticancer agent in combination with electroporation exerts higher cytotoxicity than agent alone. V: Book of abstracts. 5<sup>th</sup> Conference on Experimental and Translational Oncology, Kranjska gora, 26.–30. mar. 2008. Serša G., Kos J., Turnšek L., Kranjc S., Jevnikar Z., Obermajer N. (ur.). Ljubljana, Association of Radiology and Oncology: 85
- Chang D.C., Reese T.S. 1990. Changes in membrane structure induced by electroporation as revealed by rapid-freezing electron microscopy, *Biophysical Journal*, 58, 1: 1–12
- Chernomordik L. V., 1992. Electropores in Lipid Bilayers and Cell Membranes. V: Guide to Electroporation and Electrofusion. Chang D. C., Chassy B. M., Saunders J. A., Sowers A. E. (eds.). California, Academic Press, Inc.: 63–76
- Chiba K., Kawakami K., Tohyama K. 1998. Simultaneous evaluation of cell viability by neutral red, MTT and crystal violet staining assays of the same cells. *Toxicology in vitro*, 12, 3: 251–258
- Čemažar M. 1996. Protitumorsko delovanje elektrokemoterapije z bleomicinom na tumorskih modelih *in vitro* in *in vivo*. Magistrska naloga. Univerza v Ljubljani. Medicinska fakulteta. Ljubljana: 56
- Čemažar M., Milačič R., Miklavčič D., Dolžan V., Serša G. 1998. Intratumoral cisplatin administration in electrochemotherapy: antitumor effectiveness, sequence dependence and platinum content. *Anti-Cancer Drugs*, 9: 525–530
- Danfelter M., Engstrom P., Person B., Salford L.G. 1998. Effect of high voltage pulses on survival of Chinese Hamster V-79 lung fibroblast cells. *Bioelectrochem Bioenerg* 47: 97–101

- Glaser R.W., Leikin S.L., Chernomordik L.V., Pastushenko V.F., Sokirko A.I. 1988. Reversible electrical breakdown of lipid bilayers: formation and evolution of pores. *Biochimica et Biophysica Acta*, 940: 275–287
- Golzio M. 1999. Etude biophysique du transfert de macromolécules dans les cellules animales par électropermeabilisation: These. Institut de Pharmacologie et de Biologie Structurale du CNRS, Toulouse Cedex: 204
- Hamilton W.A., Sale A.J.H. 1967. Effect of high electric fields on microorganisms II. Mechanism of action of lethal effect. *Biochim Biophys Acta*. 148: 789–800
- Hartinger C.G., Seifried S.Z., Jakupec M.A., Kynast B., Zorbas H., Keppler B.K. 2006. From bench to bedside – preclinical and early clinical development of the anticancer agent indazolium *trans*-[tetrachlorobis(1*H*-indazole)ruthenate(III)] (KP1019) or FFC14A). A review. *Journal of Inorganic Biochemistry*, 100: 891-904
- Heller R., Jaroszeski M.J., Reintgen D.S., Puleo C.A., DeConti R.C., Gilbert R.A., Glass L.F. 1998. Treatment of cutaneous and subcutaneous tumors with electrochemotherapy using intralesional bleomycin. *Cancer*, 83, 1: 148–157
- Hussain R.F., Nouri A.M.E., Oliver R.T.D. 1993. A new approach for measurement of cytotoxicity using colorimetric assay. *Journal of Immunological Methods*, 160, 1: 89–96
- Jacobs R.E., Hudson B., Andersen H.C. 1975. A theory of the chain melting phase transition of aqueous phospholipid dispersions. *The Proceedings of the National Academy of Sciences Online of the United States of America*, 72: 3993–3997
- Kandušer M., Šentjerc M., Miklavčič D. 2006. Cell membrane fluidity related to electroporation and resealing. *The European Biophysics Journal*, 35: 196–204
- Kapitza S., Jakupec M., Weiss M., Keppler B., Marian B. 2001. *Proc. Am. Assoc. Cancer Res.* 42: 214
- Kapitza S., Jakupec A. M., Uhl M., Keppler B.K., Marian B. 2005. *Cancer Letters*, 226: 115–121
- Kotnik T, Maček-Lebar A, Miklavčič D, Mir L. M. 2000. Evaluation of cell membrane electropermeabilization by means of nonpermeant cytotoxic agent. *Biotechniques* 28: 921–926

- Kotnik T., Lebar A.M., Kandušer M., Pucihar G., Pavlin M., Valič B., Miklavčič D. 2005. Elektroporacija celične membrane: teorija ter poizkusi *in vitro*. Medicinski Razgledi, 44: 81–90
- Lebar A.M., Serša G., Čemažar M., Miklavčič D. 1998. Elektroporacija. Medicinski Razgledi, 37: 339–354
- Miklavčič D., Kotnik T. 2004. Electroporation for electrochemotherapy and gene therapy. V: Rosch P. J., Markov M. S. Bioelectromagnetic Medicine, Marcel Dekker, New York, 637–656
- Miklavčič D., Puc M. 2006. Electroporation. V: Wiley Encyclopedia of Biomedical Engineering. New York, John Wiley & Sons: 1–11
- Mir L.M. 2006. Bases and rationale of the electrochemotherapy. European Journal of Cancer Supplements, 4: 38–44
- Mir L.M. 2000. Therapeutic perspectives of *in vivo* cell electropermeabilization: A review. Bioelectrochem. Bioenerg., 53: 1–10
- Miura Y., deFries R., Shimada H., Mitsuhashi M. 1997. Rapid cytotoxic and cytostatic chemosensitivity test by measuring total amount of mRNA. Cancer Letters, 116, 2: 139–144
- Moiescu M.G., Mahrouf N., Verjus M-A., Mir L.M. 2003. Modification of the rate of endocytosis of cells in culture by low intensity pulsed electric fields. V: Proceedings of the Electroporation based Technologies and Treatments. International scientific workshop and postgraduate course, Ljubljana, 19.–22. nov. 2003. Kramar P., Miklavčič D. (ur.). Ljubljana, Fakulteta za elektrotehniko: 71
- Neumann E., Rosenheck K., 1972. Permeability changes induced by electric impulses in vesicular membranes. Journal of Membrane Biology, 10: 279–290
- Neumann E., Sowers A.E., Jordan C.A. 1989. Electroporation and electrofusion in cell biology. New York, Plenum Press: 1–105
- Neumann E., Kakorin S., Tönsing K. 1999. Fundamentals of electroporative delivery of drugs and genes. Bioelectrochem. Bioenerg., 48: 1–16
- Rolls M.P., Teissie J. 1990. Electropermeabilization of mammalian cells, quantitative analysis of phenomenon. Biophysical Journal. 58: 1089–1098



- Rols M.P. 2006. Electroporation, a physical method for the delivery of therapeutic molecules into cells, *Biochimica et Biophysica Acta*, 1758: 423–428
- Serša G., Čemažar M., Rudolf Z. 2003. Application of electroporation in electrochemotherapy of tumors. V: *Proceedings of the Electroporation based Technologies and Treatments*. International scientific workshop and postgraduate course, Ljubljana, 19.–22. nov. 2003. Kramar P., Miklavčič D. (ur.). Ljubljana, Fakulteta za elektrotehniko: 32–36
- Serša G., Čemažar M., Rudolf Z. 2003. Electrochemotherapy: advantages and drawbacks in treatment of cancer patients: A review. *Cancer Therapy*, 1: 133–142
- Serša G., Miklavčič D., Čemažar M., Rudolf Z., Pucihar G., Snoj M. 2008. Electrochemotherapy in treatment of tumours. *European Journal of Surgical Oncology*, 34: 232–240
- Serša G., Štabuc B., Čemažar M., Jančar B., Miklavčič D., Rudolf Z. 1998. Electrochemotherapy with cisplatin: Potentiation of local cisplatin antitumor effectiveness by application of electric pulses in cancer patients. *European Journal of Cancer*, 34, 8:1213–1218
- Shimoyama Y., Kubota T., Watanabe M., Ishibiki K., Abe O. 1989. Predictability of in vivo chemosensitivity by in vitro MTT assay with reference to the clonogenic assay. *Journal of Surgical Oncology*, 41, 12–18
- Sugar I.P. 1979. A theory of the electric field-induced phase transition of phospholipid bilayers. *Biochimica et Biophysica Acta*, 556: 72–85
- Štrukelj B., Kos J. 2007. *Biološka zdravila: od gena do učinkovine*. Ljubljana, Slovensko farmacevtsko društvo: 673
- Taupin C., Dvolaitzky M., Sauterey C. 1975. Osmotic pressure induced pores in phospholipid vesicles. *Biochemistry*, 14: 4771–4775
- Teissie J., Golzio M., Rols M.P. 2005. Mechanisms of cell membrane electroporation: a minireview of our present (lack of ?) knowledge. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1724, 3: 270–280
- Tsong T.Y. 1991. Electroporation of cell membranes. *Biophysical Journal*, 60: 297–306

Weaver J.C., Chizmadzhev Y.A. 1996. Theory of electroporation: A review. *Bioelectrochem. Bioenerg.*, 41: 135–60

## 7.2 ELEKTRONSKI VIRI

Drugdex drug evaluations – bleomycin. Micromedex.  
[www.micromedex.com](http://www.micromedex.com) (18. avg. 2008)

Temeljne značilnosti zdravila – cisplatin. 2001. Pliva Ljubljana, farmacevtska industrija, d.o.o. (7. dec. 2001).  
[www.zdravila.com](http://www.zdravila.com) (18. avg. 2008)

Dovgan B., Marušič M. Celična smrt. 2007. Wikia (2. dec. 2007).  
[http://novebiologije.wikia.com/wiki/Celična\\_smrt](http://novebiologije.wikia.com/wiki/Celična_smrt) (29. avg. 2008)

[http://dtp.nci.nih.gov/timeline/noflash/milestones/M4\\_Nixon.htm](http://dtp.nci.nih.gov/timeline/noflash/milestones/M4_Nixon.htm)

Future trends in global mortality: major shifts in cause of death patterns. V: World Health Statistics 2008. 4<sup>th</sup> edition. WHO statistical information system, 29–31  
<http://www.who.int/whosis/whostat/2008/en/index.html> (31. avg. 2008)

Bajec A. (ur.). 1998. SSKJ (Slovar slovenskega knjižnega jezika). Slovenska akademija znanosti in umetnosti, Znanstvenoraziskovalni center SAZU, Inštitut za slovenski jezik Frana Ramovša.  
<http://bos.zrc-sazu.si/sskj.html> (31. avg. 2008)

## ZAHVALA

Zahvaljujem se prof. dr. Damijanu Miklavčiču, da me je sprejel v Laboratorij za biokibernetiko, me kot mentor vodil tekom nastajanja diplomskega dela, izzval k višjim ciljem in »ves čas verjel vame«.

Večno bom hvaležna dr. Maši Kandušer za vso strokovno pomoč in usmerjanje, konstruktivno kritiko, potrpežljivo prenašanje mojih začetniških napak, vedno prisotno dobro voljo in smeh, in seveda za usodni prevoz iz Logatca v Ljubljano nekega meglenelega spomladanskega jutra 2006.

Zahvaljujem se Ajdi Biček in prof. dr. Iztoku Turelu za sodelovanje, ter vsem iz Laboratorija za biokibernetiko na Fakulteti za elektrotehniko Univerze v Ljubljani, ki so mi bili vedno pripravljene svetovati in pomagati, še posebej hvala Marku Ušaju.

Posebna zahvala recenzentu dr. Gregorju Anderluhu, predsedniku prof. dr. Mihaelu J. Tomanu, prof. dr. Kristini Sepčič in Zdenki Repanšek za vso izkazano pripravljenost in potrpežljivost v zadnjih dneh pred zagovorom.

Nenazadnje se zahvaljujem vsem domačim in prijateljem, ki so mi vsak na svoj način pomagali, me spremljali in prenašali v času zaključevanja študija ter me vedno podpirali in spodbujali pri doseganju lastnih ciljev.