

# Električno polje u liječenju tumora

---

Novak, Denaj

Master's thesis / Diplomski rad

2020

Degree Grantor / Ustanova koja je dodijelila akademski / stručni stupanj: **University of Zagreb, Faculty of Pharmacy and Biochemistry / Sveučilište u Zagrebu, Farmaceutsko-biokemijski fakultet**

Permanent link / Trajna poveznica: <https://um.nsk.hr/um:nbn:hr:163:484515>

Rights / Prava: [In copyright](#) / [Zaštićeno autorskim pravom.](#)

Download date / Datum preuzimanja: **2024-11-28**



Repository / Repozitorij:

[Repository of Faculty of Pharmacy and Biochemistry University of Zagreb](#)



**Denaj Novak**

# **Električna polja u liječenju tumora**

## **DIPLOMSKI RAD**

Predan Sveučilištu u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijskom fakultetu

Zagreb, 2020 godina.

Ovaj diplomski rad je prijavljen na kolegiju Biofizika Sveučilišta u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta i izrađen na Zavodu za biofiziku pod stručnim vodstvom doc. dr. sc. Erima Bešića.

Zahvaljujem svom mentoru doc. dr. sc. Erimu Bešiću na stručnom vodstvu, pomoći i strpljenju pri izradi ovog diplomskog rada.

Također zahvaljujem svojim roditeljima na podršci koju su mi pružili.

# SADRŽAJ

<b>1. UVOD</b> .....	<b>1</b>
1.1 Porijeklo tumora.....	1
1.2 Vrste tumora.....	4
1.3 Dijagnoza tumora.....	8
<b>2. OBRAZLOŽENJE TEME</b> .....	<b>12</b>
<b>3. MATERIJALI I METODE</b> .....	<b>13</b>
<b>4. REZULTATI I RASPRAVA</b> .....	<b>14</b>
4.1 Električna polja u liječenju tumora.....	14
4.2 Elektroporacija.....	16
4.2.1 Vrste elektroporacija.....	18
4.2.2 Mikroelektroporacija i nanoelektroporacija.....	21
4.3 Ireverzibilna elektroporacija.....	22
4.3.1 Kliničke studije.....	24
4.4 Elektrokemoterapija.....	26
4.4.1 Bleomicin.....	27
4.4.2 Cisplatin.....	29
4.5 Genska Terapija.....	31
<b>5. ZAKLJUČAK</b> .....	<b>35</b>
<b>6. LITERATURA</b> .....	<b>36</b>
<b>7. SAŽETAK</b> .....	<b>42</b>
<b>8. TEMELJNA DOKUMENTACIJSKA KARTICA</b>	
<b>9. BASIC DOCUMENTATION CARD</b>	

# 1. Uvod

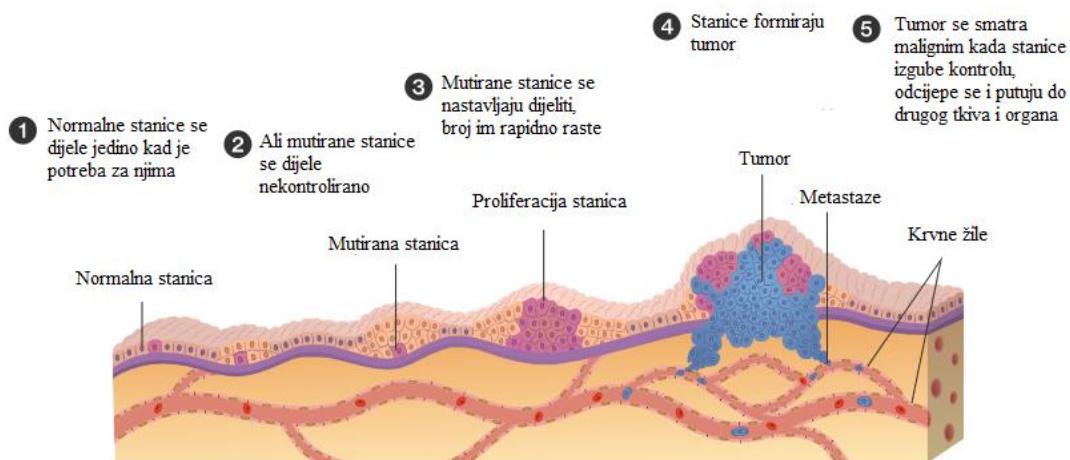
## 1.1 Porijeklo tumora

Rak je naziv dat prema zbirci srodnih bolesti. Kod svih vrsta raka neke se tjelesne stanice počinju dijeliti bez zaustavljanja i šire se u okolna tkiva. Uobičajeno, ljudske stanice rastu i dijele se tako da formiraju nove stanice onako kako ih tijelo treba. Kad stanice ostare ili postanu oštećene, umiru, a nove stanice zauzimaju svoje mjesto. Kada se rak ipak razvije, taj se uredan proces raspada. Kako stanice postaju sve više nenormalne, stare ili oštećene stanice opstaju kada trebaju umrijeti, a nove stanice nastaju kada nisu potrebne. Te se dodatne stanice mogu podijeliti bez zaustavljanja i mogu tvoriti izrasline nazvane tumori. (cancer.gov)

Rak je genetska bolest - uzrokovan je promjenom na genima koji kontroliraju funkcionalnost naših stanica, naročito kako se one dijele i rastu. Oni također mogu nastati tijekom života osobe, kao rezultat grešaka koje nastaju dijeljenjem stanica ili zbog oštećenja DNK uzrokovanog određenim izlaganjem okolišu. (cancer.gov)

Sve što može uzrokovati da se normalna tjelesna stanica razvija nenormalno, može uzrokovati karcinom; Opće kategorije uzrokovanih rakom ili uzročnici su sljedeće: izloženost kemijskim ili toksičnim spojevima, ionizirajućem zračenju, nekim patogenima i ljudskoj genetici. (medicinenet.com)

Rak svake osobe ima jedinstvenu kombinaciju genetskih promjena. Kako rak i dalje raste, uslijedit će dodatne promjene. Čak i unutar istog tumora različite stanice mogu imati različite genetske promjene. Genetske promjene koje pridonose raku imaju tendenciju da utječu na tri glavne vrste gena - proto-onkogene, gene za supresiju tumora i gene za popravak DNA (cancer.gov).



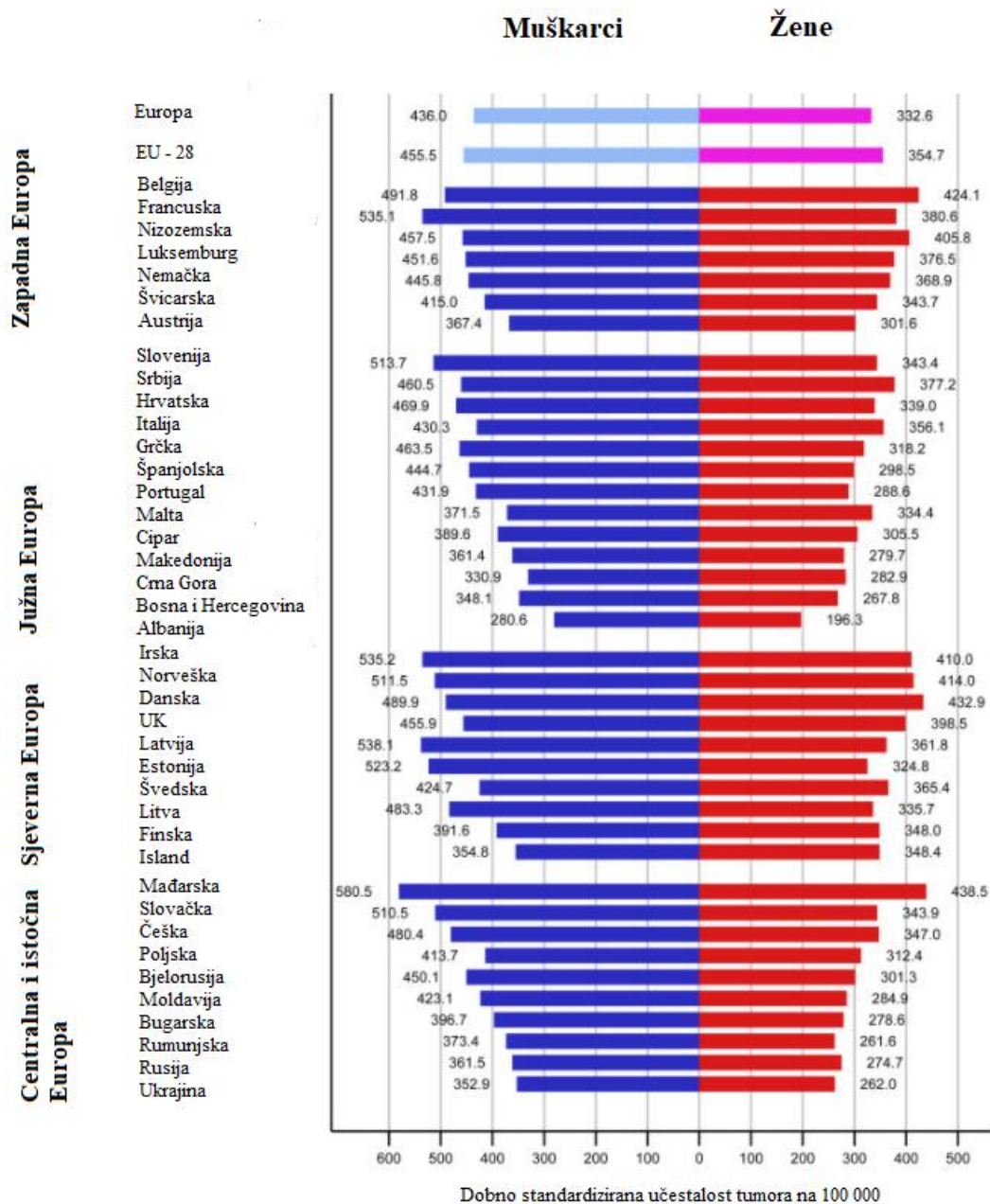
Rak započinje kada jedna ili više normalnih stanica postanu mutirane stanice, što uzrokuje njihovu razmnožavanje kada normalne stanice ne bi. Kako se mutirane stanice dijele, tvore tumor. Kad tumorske stanice steknu sposobnost oslobađanja, ulaze u krvotok ili limfne žile i napadaju druga tkiva i organe u tijelu, što rezultira metastazama.

Slika 1. Formiranje tumora i njegovo širenje u ostala tkiva (prilagođeno prema [www.coursehero.com](http://www.coursehero.com))

Proto-onkogeni su uključeni u normalan rast i diobu stanica. Međutim, kada se ti geni izmijenjene na određene načine ili su aktivniji od normalnih, oni mogu postati geni koji uzrokuju rak (ili onkogene), omogućujući stanicama da rastu i opstanu kad ne bi trebale. Geni supresorskih tumora također su uključeni u kontrolu rasta i diobe stanica. Stanice s određenim izmjenama u genima supresorskih tumora mogu se nekontrolirano podijeliti. Geni za popravak DNA uključeni su u popravljavanje oštećene DNK. Stanice s mutacijama u tim genima imaju tendenciju u razvoju dodatnih mutacija u drugim genima. Ove mutacije zajedno mogu uzrokovati da stanice postanu kancerogene. (cancer.gov)

Rak je drugi vodeći uzrok smrti na globalnoj razini, a odgovoran je za 9,6 milijuna smrtnih slučajeva u 2018. Globalno gledano, oko 1 na 6 smrtnih slučajeva je zbog raka. Otprilike 70% smrtnih slučajeva od raka dogodi se u zemljama s niskim i srednjim dohotkom. (who.int)

Oprilike jedna trećina smrtnih slučajeva od raka posljedica je 5 vodećih ponašanja i prehrambenih rizika: visoki indeks tjelesne mase, nizak unos voća i povrća, nedostatak fizičke aktivnosti, upotreba duhana i alkohol. Ekonomski utjecaj karcinoma je značajan i raste. Ukupni godišnji ekonomski trošak raka u 2010. godini procijenjen je na oko 1,16 bilijuna USD (who.int).



Slika 2. Učestalost 28 najčešćih vrsta tumora u Europi (prilagođeno prema Ferlay, 2018)

Procjenjuje se da je u Europi u 2018. godini bilo 3,91 milijuna novih slučajeva tumora (isključujući nemelanomski tumor kože) i 1,93 milijuna smrtnih slučajeva uzrokovanih tumorom. Najčešća mjesta tumora bili su; karcinomi ženske dojke (523 000 slučajeva), zatim kolorektalni (500 000), pluća (470 000) i tumor prostate (450 000). Ova četiri karcinoma predstavljaju polovicu ukupnih tumora u Europi. Najčešći uzroci smrti od tumora bili su; karcinomi pluća (388 000 smrtnih slučajeva), kolorektalnog (243 000), dojke (138 000) i karcinoma gušterače (128 000). U EU-28, procijenjeni broj novih slučajeva raka bio je približno 1,6 milijuna kod muškaraca i 1,4 milijuna kod žena, a 790 000 muškaraca i 620 000 žena umrlo je od bolesti u istoj godini (Ferlay i sur., 2018).

## 1.2 Vrste tumora

Rak koji se proširio od mjesta na kojem je prvi put započeo na drugo mjesto u tijelu naziva se metastatski rak. Liječenje može pomoći produljiti život nekih ljudi s metastatskim karcinomom. Općenito, međutim, primarni cilj liječenja metastatskog karcinoma je kontrola rasta raka ili ublažavanje simptoma koji su ga uzrokovali. Metastatski tumori mogu nanijeti ozbiljnu štetu funkcioniranju tijela, a većina ljudi koji umiru od raka umiru od metastatske bolesti.

Rak ima naziv za područje na kojem započinju i vrstu stanice od koje čine, čak i ako se širi na druge dijelove tijela. Na primjer, rak koji počinje u plućima i širi se u jetri još se naziva i karcinom pluća. Postoji i nekoliko kliničkih izraza koji se koriste za određene opće vrste raka (cancer.gov)

Postoje 3 načina na koja se rak može proširiti.

1) Izravno širenje ili invazija znači da primarni tumor raste u tkiva ili strukture oko sebe. Na primjer, rak prostate može prerasti u mjehur.

2) Širenje putem limfnog sustava znači da se stanice karcinoma odvajaju od primarnog tumora i limfnim sustavom putuju u drugi dio tijela. Limfni sustav je skupina tkiva i organa koji stvaraju i pohranjuju stanice koje se bore protiv infekcija i bolesti.



3) Krvotok, ili hematogeni, širi se znači da se stanice raka odvajaju od primarnog tumora, ulaze u krvotok i putuju na novo mjesto u tijelu.

Imunološki sustav obično napada i uništava stanice raka koje putuju kroz limfni sustav ili krvotok. Ali ponekad stanice karcinoma prežive i nastane se na drugom dijelu tijela, gdje tvore novi tumor. Da bi preživio i rastao na novom mjestu, tumor mora stvoriti vlastitu opskrbu krvlju (cancer.ca).

Karcinom:

Karcinomi su najčešća vrsta raka. Formiraju se epitelnim stanicama koje su stanice koje prekrivaju unutarnju i vanjsku površinu tijela. Postoji mnogo vrsta epitelnih stanica koje često imaju oblik stupaca kad se gledaju pod mikroskopom. Karcinomi koji počinju različitim tipovima epitelnih stanica imaju specifična imena:

a) Adenokarcinom je rak koji se formira u stanicama epitela koje stvaraju tekućinu ili sluz. Tkiva s ovom vrstom epitelnih stanica ponekad se nazivaju žljezdasta tkiva. Većina karcinoma dojke, debelog crijeva i prostate su adenokarcinomi.

b) Karcinom bazalnih stanica je rak koji počinje u donjem ili bazalnom (baznom) sloju epiderme, što je vanjski sloj kože osobe.

c) Skvamozno stanični karcinom je karcinom koji nastaje u skvamoznim stanicama, a to su epitelne stanice koje leže neposredno ispod vanjske površine kože. Skvamozne stanice također linije mnogih drugih organa, uključujući želudac, crijeva, pluća, mjehur i bubrege. Skvamozne stanice izgledaju ravne, poput riblje ljuske, ako se promatraju pod mikroskopom. Skvamozno-stanični karcinomi ponekad se nazivaju epidermoidnim karcinomima.

d) Karcinom tranzicijskih stanica je karcinom koji se formira u tipu epitelskog tkiva koji se naziva prijelazni epitel ili urotelium. Ovo tkivo, koje se sastoji od mnogih slojeva epitelnih stanica koje mogu biti veće i manje, nalazi se u oblogama mokraćnog mjehura, uretera i dijela bubrega (bubrežne zdjelice) i nekoliko drugih organa. Neki karcinomi mokraćnog mjehura, uretera i bubrega karcinomi su prijelaznih stanica.

e) Sarkoma je rak kostiju i mekog tkiva, uključuje: mišiće, masno tkivo, krvne žile, limfne žile i vlaknasto tkivo. Osteosarkom je najčešći rak kostiju. Najčešći tipovi sarkoma mekog tkiva su leiomiosarkom, Kaposi sarkom, maligni fibrozni histiocitom, liposarkom i dermatofibrosarkom protuberans.

## Leukemija

Rak koji započinje u tkivu koštane srži koji tvori krv naziva se leukemija. Ovi karcinomi ne tvore solidne tumore. Umjesto toga, veliki broj nenormalnih bijelih krvnih stanica (leukemijske stanice i leukemijske blast-stanice) nakuplja se u krvi i koštanoj srži, što istiskuje normalne krvne stanice. Niska razina normalnih krvnih stanica može tijelu otežati dotok kisika u tkiva, kontrolirati krvarenje ili se boriti protiv infekcija. Postoje četiri uobičajene vrste leukemije, koje se grupiraju na temelju brzine pogoršanja bolesti (akutne ili kronične) i vrste krvnih stanica u koju rak započinje (limfoblastični ili mijeloidni).

## Limfoma

Limfom je rak koji počinje u limfocitima (T stanicama ili B stanicama). U limfomu se nenormalni limfociti nakupljaju u limfnim čvorovima i limfnim žilama, kao i u drugim organima tijela. Postoje dvije glavne vrste limfoma:

a) Hodgkin limfom - Osobe s ovom bolešću imaju abnormalne limfocite koji se nazivaju Reed-Sternbergove stanice. Ove stanice obično se formiraju iz B stanica.

b) Ne-Hodgkinov limfom - Ovo je velika skupina karcinoma koji počinju u limfocitima. Karcinom može brzo ili sporo rasti i može nastati iz B stanica ili T stanica.

## Multipli mijelom:

Višestruki mijelom je rak koji počinje u plazma stanicama, drugoj vrsti imunoloških stanica. Nenormalne stanice plazme, nazvane stanice mijeloma, nakupljaju se u koštanoj srži i tvore tumore u kostima po cijelom tijelu.

## Melanoma:

Melanom je rak koji počinje u stanicama koje postaju melanociti. Većina melanoma nastaje na koži, ali melanomi se mogu oblikovati i u drugim pigmentiranim tkivima, poput oka.

## Tumori mozga i leđne moždine:

Postoje različite vrste tumora mozga i leđne moždine. Ti su tumori imenovani na temelju vrste stanice u kojoj su se formirali i gdje se tumor najprije formirao u središnjem živčanom sustavu. Astrocitni tumor započinje u stanicama mozga u obliku zvijezda koje se nazivaju astrociti, a koje pomažu u održavanju zdravih živčanih stanica. Tumori mozga mogu biti benigni ili zloćudni.

Ostale vrste tumora:

Tumori kiselih stanica

Tumori zarodnih stanica su vrsta tumora koji počinje u stanicama koje stvaraju spermu ili jajašce. Ti se tumori mogu pojaviti gotovo bilo gdje u tijelu i mogu biti ili benigni ili zloćudni (lumenlearning.com)

Neuroendokrini tumori:

Neuroendokrini tumori nastaju iz stanica koje otpuštaju hormone u krv kao odgovor na signal živčanog sustava. Ti tumori, koji mogu stvarati hormone više od normalnih, mogu uzrokovati različite simptome. Neuroendokrini tumori mogu biti benigni ili zloćudni. (cancer.gov)

Karcinoidni tumori

Karcinoidni tumori su vrsta neuroendokrinog tumora. Oni su sporo rastući tumori koji se obično nalaze u gastrointestinalnom sustavu (najčešće u rektumu i tankom crijevu). Karcinoidni tumori mogu se proširiti na jetru ili druga mjesta u tijelu te mogu izdvajati tvari poput serotonina ili prostaglandina, uzrokujući karcinoidni sindrom. (cancer.gov)

## 1.3 Dijagnoza tumora

Potrebni su brojni testovi kako bi se utvrdilo da li osoba ima rak ili neko drugo stanje (poput infekcije) oponaša simptome raka. Učinkovito dijagnostičko testiranje koristi se za potvrđivanje ili uklanjanje prisutnosti bolesti, praćenje procesa bolesti te za planiranje i procjenu učinkovitosti liječenja. Dijagnostički postupci raka mogu uključivati snimanje, laboratorijske testove (uključujući testove za tumorske markere), biopsiju tumora, endoskopski pregled, operaciju ili genetsko testiranje. (standfordhealthcare.org)

Klinička kemija koristi kemijske procese za mjerenje razine kemijskih komponenata u tjelesnim tekućinama i tkivima. Najčešći uzorci koji se koriste u kliničkoj kemiji su krv i urin. Postoje brojni različiti testovi za otkrivanje i mjerenje gotovo bilo koje vrste kemijskih komponenti u krvi ili urinu. Komponente mogu uključivati glukozu u krvi, elektrolite, enzime, hormone, lipide, druge metaboličke tvari i proteine. Nekih od najčešćih laboratorijskih ispitivanja su:

- a) Krvni testovi
- b) Kompletna krvna slika
- c) Analiza mokraće
- d) Tumorski markeri (standfordhealthcare.org)

Snimanje je proces stvaranja vrijednih slika građe tijela i organa. Koristi se za otkrivanje tumora i drugih abnormalnosti, za određivanje stupnja bolesti i za procjenu učinkovitosti liječenja. Snimanje se također može koristiti za obavljanje biopsija i drugih kirurških zahvata. Postoje tri vrste snimanja koje se koriste za dijagnosticiranje raka: prenošenje slike, refleksno snimanje i emitiranje. Svaki koristi drugačiji postupak. Prijenos slike X-zrake, računalna tomografija (CT) i fluoroskopija su radiološki pregledi čije se slike dobivaju prijenosom. Pri prenosu slika nastaje snop visokoenergetskih fotona koji prolazi kroz građu tijela koja se ispituje. Zraka prolazi vrlo brzo kroz manje guste vrste tkiva poput vodenih sekreta, krvi i masti, ostavljajući zamračeno područje na rendgenskom filmu. Mišica i vezivna tkiva (ligamenti, tetive i hrskavice) izgledaju sivo. Kostí će se pojaviti bijele. (standfordhealthcare.org)

## X zrake (rendgen):

X-zrake se svrstavaju u meke X-zrake i tvrde X-zrake. Meke rendgenske zrake imaju relativno kratku valnu duljinu od oko 10 nanometara, pa spadaju u raspon elektromagnetskog spektra između ultraljubičastog svjetla i gama zraka. Tvrde rendgenske zrake imaju valnu duljinu od oko 100 pikometara. Ti elektromagnetski valovi zauzimaju isto područje EM spektra kao gama-zrake. Jedina razlika između njih je njihov izvor: X-zrake nastaju ubrzavanjem elektrona, dok gama-zrake proizvode atomska jezgra u jednoj od četiri nuklearne reakcije. Terapija x zraka koristi visokoenergetsku radijaciju da ubije stanice tumora oštećujući njihovu DNA. Ionizirajuće zračenje iz rendgenskih zraka zatvara fokusirano područje s dovoljno energije da potpuno oduzme elektrone od atoma i molekula, mijenjajući na taj način njihova svojstva. U dovoljnim dozama to može oštetiti ili uništiti stanice. Iako ovo oštećenje stanica može uzrokovati rak, također se može koristiti za borbu protiv njega. Usmjeravanjem rendgenskih zraka kod karcinoma raka može uništiti te nenormalne stanice. (livescience.com)

## Skenirana računalna tomografija (CT)

CT skener emitira niz uskih zraka kroz ljudsko tijelo. To se razlikuje od rendgenskog uređaja koji šalje samo jednu zraku zračenja. CT pregled daje detaljniju završnu sliku od rendgenske slike. Na CT detektoru rendgenskih snimača može se vidjeti stotine različitih razina gustoće. Može vidjeti tkiva u čvrstom organu. Kontrastna boja se može koristiti kako bi određeno tkivo bilo bolje vidljivo. (healthline.com)

## Magnetska rezonanca (MRI):

Magnetska rezonancija (MRI) je tehnika skeniranja za stvaranje detaljnih slika ljudskog tijela. Skeniranje koristi snažno magnetsko polje i radio valove za generiranje slika dijelova tijela koji se ne mogu dobro vidjeti uz pomoć X-zraka, CT ili ultrazvuka. To može pomoći liječnicima da vide unutar zglobova, hrskavica, ligamenata, mišića i tetiva, što pomaže u otkrivanju različitih sportskih ozljeda. (livescience.com)

MRI se također koristi za ispitivanje unutarnjih tjelesnih struktura i dijagnosticiranje različitih poremećaja, poput moždanog udara, tumora, aneurizme, ozljeda leđne moždine, multiple skleroze i problema s očima ili unutarnjim uhom. Također se široko koristi u istraživanjima za mjerenje strukture i funkcije mozga, između ostalog. (livescience.com)

Glavne razlike između CT i MRI su:

CT pretraga koristi X-zrake, ali MRI koristi magnete i radio valove.

CT pretraga ne pokazuje tetive i ligamente.

MRI je bolja za ispitivanje leđne moždine.

CT pretraga je pogodnija za rak, upalu pluća, abnormalne rendgenske zrake prsnog koša, krvarenja u mozgu, posebno nakon ozljede.

Moždani tumor je jasnije vidljiv na MRI.

CT pretraga brže pokazuje ozljede organa pa može biti prikladnija za slučajeve traume.

Slomljene kosti i kralježnici jasnije su vidljivi na CT snimci.

CT pretraga daje bolju sliku pluća i organa u prsnoj šupljini između pluća.

(medicalnewstoday.com)

Ultrazvuk:

Ultrazvučno skeniranje koristi visokofrekventne zvučne valove za stvaranje slika u unutrašnjosti tijela. Prikladna je za upotrebu tijekom trudnoće. Ultrazvučne pretrage koriste se za procjenu razvoja fetusa i mogu otkriti probleme u jetri, srcu, bubrezima ili trbuhu. Također mogu pomoći u obavljanju određenih vrsta biopsije. Dopplerov ultrazvuk može procijeniti protok krvi u žili ili krvni tlak. Može odrediti brzinu protoka krvi i bilo kakve prepreke. Ehokardiogram (EKG) je primjer Dopplerovog ultrazvuka. Može se koristiti za stvaranje slika kardiovaskularnog sustava i za mjerenje protoka krvi i pokreta srčanog tkiva u određenim točkama. Dopplerov ultrazvuk može procijeniti funkciju i stanje područja srčanih zalistaka, bilo kakve nepravilnosti u srcu, regulitaciju zalistaka ili curenje krvi iz ventila, a može pokazati i koliko srce pumpa krv. Može se koristiti i za: pregledati zidove krvnih žila provjeriti ima li DVT ili aneurizmu provjerite srce i otkucaje fetusa procijenite nakupljanje plaka i ugrušaka procijenite blokadu ili sužavanje arterija (medicalnewstoday.com)

Vrste endoskopije uključuju: Cistoskopija, kolonoskopija, endoskopska retrogradna kolangiopankreatografija (ERCP), ezofagogastroduodenoskopija, sigmoidoskopija.

## Biopsija

Biopsija je postupak koji se izvodi iz tkiva ili stanica iz tijela radi ispitivanja pod mikroskopom. Neke se biopsije mogu obaviti u liječničkoj ordinaciji, dok se druge moraju obaviti u bolničkom okruženju. Osim toga, neke biopsije zahtijevaju korištenje anestetika za oštećenje područja, dok druge ne zahtijevaju sedaciju. Obično se obavljaju biopsije kako bi se utvrdilo je li tumor zloćudan ili kako bi se utvrdio uzrok neobjašnjive infekcije ili upale. (standfordhealthcare.org)

## 2. Obrazloženje teme

Tumori su drugi uzrok smrtnosti na svijetu. Mogu se podijeliti u dvije skupine: benigni i zloćudni. Benigni tumori se ne šire i ne metastaziraju u okolna tkiva i znatno su manje opasni od zloćudnih tumora. Zloćudni tumori su skloni širenju u okolna tkiva i metastaziranju.

Tretiranje tumora kemoterapeutičima često zna biti neefikasno i štetno za okolna tkiva i/ili organizam. Da bi se poboljšala efikasnost kemoterapeutika, razne terapije su korištene u cilju bolje apsorpcije, boljeg iskorištenja i sveukupno bolje kliničke slike pacijenta nakon kemoterapije.

Korištenje električnih polja u terapijama bolje dostave lijekova i/ili uništenje tumorskog tkiva počelo se istraživati u širem spektru početkom 2000-ih godina. Ona mogu biti veoma korisna bilo u pogledu bolje dostave određene supstance ciljano do tkiva, bez da oštećuje okolna tkiva, ili u direktnom uništenju ciljanog tkiva uz minimalno oštećenje okolnog tkiva .

Cilj ovog rada je prikazati utjecaj i efikasnost korištenja električnih polja u liječenju tumora, njegovom sprječavanju širenja, te sveukupnom doprinosu kod poboljšanja kvalitete i duljine života kod pacijenata sa tumorom.



### **3. Materijali i metode**

Za potrebe ovog teorijskog diplomskog rada korišteni su različite znanstvene literature, preglednici znanstvene literature (Cochrane, PubMed), znanstvene i stručne knjige i pregledavane su mrežne stranice sa stručnim sadržajem.

Primijenjeno je znanje stečeno na Farmaceutsko-biokemijskom fakultetu. U pretraživanju baza korišteni su ključni pojmovi: tumor, metastaze, električna polja, elektroporacija, ireverzibilna elektroporacija, reverzibilna elektroporacija, genska terapija.

## 4. Rezultati i rasprava

### 4.1 Električna polja u liječenju tumora

Mnoge bolesti poput imunodeficijencije, karcinoma, Parkinsonove bolesti, Alzheimerova bolest prvenstveno su potaknute poremećajem i neispravnošću stanica. Za liječenje ovih bolesti, unošenje vanjskih molekula i odgovarajućih materijala u stanice je važna strategija u dešifriranju stanica funkcije, usmjeravanju sudbina stanica i reprogramiranju stanica ponašanja za koja se očekuje da će uvelike pridonijeti normalnoj funkciji stanica i oporavku stanica tkiva. (Shi i sur., 2018)

Unatoč značajnom napretku u terapiji, rak je i dalje vodeći uzrok smrtnosti. Uz to, toksičnost tradicionalnih terapija predstavlja značajan izazov za podnošljivost i pridržavanje. Terapija tumor tretirajućim poljima, neinvazivni način liječenja protiv raka koristi izmjenična električna polja specifičnim frekvencijama i intenzitetima kako bi selektivno poremetila mitozu u stanicama karcinoma. Terapija tumor tretirajućim poljima ciljaju proteine presudne za stanični ciklus, što dovodi do zaustavljanja mitoze i apoptoze. Klinička ispitivanja tumor tretirajućih polja pokazala su se sigurno i djelotvorno u bolesnika s multiformnim glioblastomom (GBM), a FDA ga je odobrila za upotrebu u novo dijagnosticiranom i rekurentnom (Jun i sur., 2018 )

Terapija tumora tretirajućim poljima niskih intenzitet (1-3 V / cm), srednje frekvencije (100-300 kHz), izmjenjujući električna polja do tumora pomoću pretvaračkih polja smještenih na koži oko regije tijela koja sadrži tumor. Terapija tumor tretirajućim poljima utječe na metafazu, prekidajući formiranje mitotičkog vretena i anafazu, dielektroforetskom dislokacijom unutarćelijskih sastojaka, što rezultira apoptozom. Terapija tumor tretirajućim poljima je učestalo prilagođena specifičnim tipovima stanica raka. Antimitotički učinak terapije tumor tretirajućim poljima dokazan je u više staničnih linija kada je korištena odgovarajuća učestalost. Ispitivanje monoterapije tumor tretirajućim poljima fazom III u usporedbi s aktivnom kemoterapijom kod pacijenata s ponavljajućim glioblastomom utvrdilo je da je terapija tumor tretirajućim poljima povezana s minimalnom toksičnošću, boljom kvalitetom života i usporedivom učinkovitošću s kemoterapijom (Davies i sur., 2013).

Gotovo sve stanice održavaju električnu razliku između unutarnje i vanjske strane plazma membrana, generirana i regulirana sustavom ionskih pumpi i kanala u membrani, i nazvana mirujući transmembranskim naponom (TMV). U eukariotskim stanicama TMV obično varira od  $-40$  do  $-70$  mV, odnosno da je unutarnji potencijal niži od vanjskog. Kako je ovo prirodno stanje bioloških membrana, i njihovih lipida i proteina, komponente su evolucijski dobro prilagođene i u tom rasponu djeluju pod naponima. (Kotnik i sur., 2019)

Poznato je da je stanična membrana u osnovi sastavljena od lipidnog dvosloja debljine oko 5 nm, koja djeluje kao prepreka staničnim komponentama iz izvanstanične okoline. Kao električni izolator koji pokazuje izvrsna dielektrična svojstva u normalnim fiziološkim uvjetima, on održava električni potencijal ( $\sim 0,07$  V) kroz membranu zbog značajne razlike koncentracije iona između citosola i tekućine u izvanstaničnom mikro okruženju. Teoretski, elektroporacija je učinkovita strategija za stvaranje pora u staničnoj membrani primjenom potencijalne razlike kroz te membrane. Kada razlika potencijala dosegne određenu veličinu napona, vjerojatnost elektroporacije koja se događa na staničnoj membrani drastično raste. (Shi i sur., 2018).

Iz teoretske perspektive, elektropermealizacija membrane - bilo da je to posljedica strukturnog preuređenja njegovih lipida ili kemijskih modifikacija njegovih lipida ili funkcionalne modulacije proteina ili njihove kombinacije - nije strogo određen prag voltaže da bi se ti procesi odvijali samo u električnom polju koje prelazi određenu vrijednost. Brzine ovih procesa rastu nelinearno s povećanjem amplitude polja do koje stanice su izložene. Ipak, za svaku vrstu stanica, vrstu molekula koje se transportiraju, trajanje izloženosti i određeni skup uvjeta kao što su temperatura, postoji kritična vrijednost polje koje se mora prekoračiti kako bi se transport posredovao elektropermealizacijom mogao ostvariti. Postoji i veća kritična vrijednost polja koja se ne smije premašiti ako želimo da se stanica povratno može stabilizirati, oporavati i ponovno uspostaviti funkcionalnu membranu. (Kotnik i sur., 2019)

## 4.2 Elektroporacija

Elektroporacija je učinkovita strategija za stvaranje pora u staničnoj membrani pomoću razlike potencijala duž membrane. Kad razlika potencijala dosegne točno određenu jačinu napona, vjerojatnost elektroporacije na staničnoj membrani se drastično povećava. Električno pucanje stanične membrane događa se kada transmembranski potencijal preko lipidnog sloja prijeđe preko praga koji ima kritičnu vrijednost oko 1 V. Molekule lipida unutar membrane preusmjeravaju i stvaraju male hidrofilne otvore na staničnoj membrani, koja je inače hidrofobna u nesmetanom stanju. Ova raščlamba može biti reverzibilna ili nepovratna, ovisno o tome jačini i intenzitetu električnog podražaja. (Shi i sur., 2018)

Različiti čimbenici proučavani su za modeliranje transmembranskog potencijala  $\Delta m$ . Schwanova jednadžba jedan je od najčešće korištenih modela za izračunavanje  $\Delta m$ :

$$\Delta m = -f \cdot E(t) \cdot R \cdot \cos\theta \cdot (1 - e^{-t/\tau}) \quad (1)$$

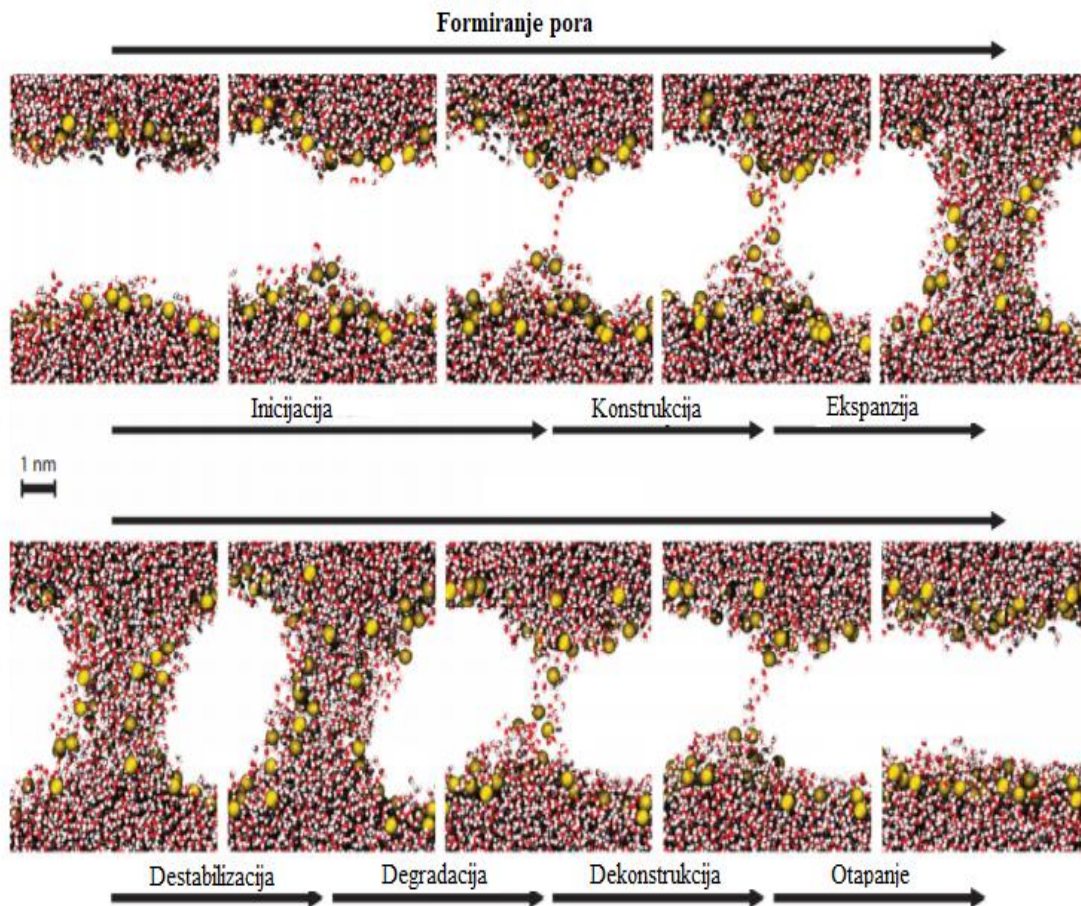
gdje je  $f$  faktor oblika ćelije (1,5 za sferne ćelije),  $E$  je primijenjeno vanjsko električno polje,  $R$  je polumjer ćelije,  $\theta$  je polarni kut između smjera  $E$  i određenog mjesta na ćeliji membrana,  $t$  je vrijeme, a  $\tau$  vremenska konstanta "kondenzatora" membrana ćelije. Stoga u stanju mirovanja mogu biti  $\tau \ll t$  i gornju jednadžbu možemo pojednostavljeno pisati:

$$\Delta m = 1,5 \cdot E \cdot R \cdot \cos\theta \quad (\text{Shi i sur., 2018})$$

Elektroporacija se široko primjenjuje za isporuku raznolikog spektra molekula od značaja za unutarstanični prostor. Konvencionalna tehnika elektroporacije za unutarstanični primjenu se vrši u paralelnim postavkama ploča u kivetama, gdje su stanične suspenzije i molekule koje se isporučuju pomiješane u vodenoj puferskoj otopini između dviju spojenih elektroda na generator visokog električnog napona, pa se zbog toga naziva skupna elektroporacija (BEP). Područje koje obuhvaća skupna elektroporacija se primarno kontrolira jakošću impulsa, dok je ukupna veličina pora veća povezano s trajanjem pulsa. (Shi i sur., 2018)

Prema teoriji stvaranja vodenih pora, koja se u najvećoj mjeri temelji na termodinamičnosti, formiranje vodenih pora pokreće se prodorom vodenih molekula u lipidni dvosloj membrane, što dovodi do preusmjeravanja susjednih lipida sa njihove polarne glave glave usmjerene prema tim molekulama vode. Nestabilne pore se tijekom trajanja nanosekunde obično mogu formirati čak i ako nema vanjskog električnog polja, ali izlaganje membrane

takvom polju smanjuje energiju potrebnu za prodiranje vode u dvosloj. U toku prvih nanosekundi, ovo prodiranje uglavnom je uzrokovano prijenosom vanjskog polja do membrane, a zatim unutar mikrosekunde, transmembransko polje pojačava se polarizacijom, što rezultira nakupljanjem induciranog transmembranskog napona. (Yarmush i sur., 2014).



Životni ciklus električno uzrokovane pore u lipidnom dvosloju. Stupnjevi formiranja i nestajanja pora su prikazani po redu kako nastaju, ali nisu vremenski ekvivalentni. Formacija počinje s uspostavljanjem električnog polja, a nestajanje počinje sa prestankom djelovanja električnog polja. Samo molekule vode i atomi fosfora su prikazani na slici.

Slika 1. Formiranje i nestanak pora uzrokovanih električnim polje (prilagođeno prema Kotnik, 2019)

Elektroporacija se može primijeniti jednako na sve vrste stanica i u svim fazama staničnog ciklusa. Kolateralna šteta elektroporacijom može biti ozbiljna u usporedbi s nekim drugim fizičkim metodama. Kada se elektroporacijsko polje primjenjuje kroz kožu pomoću površinskih elektroda, kožni edemi su česta posljedica. Elektroporacija jezgre zahtijeva daljnji korak korištenjem većeg praga napona i kraće duljine impulsa (nukleoporacija). Iako je princip elektroporacije primjenjiv na sve vrste stanica, njegova učinkovitost ovisi o električnim

svojstvima stanica. Manje stanice zahtijevaju jače polje. Stanice s manje provodnim sadržajem poput adipocita, su manje osjetljive. Tako bi pragovi za različite stanice u heterogenom tkivu varirali. Otkriveno je da formulacija DNA s određenim vrstama polimera povećava učinkovitost elektroporacije i da u nekim slučajevima smanjuje toksičnost vezanu za liječenje. Anionski polimeri, uključujući poli-L-glutamat, poliakrilnu kiselinu, poli-L-aspartat, dekstran sulfat i pektin poboljšavaju prijenos gena posredovanog elektroporacijom u skeletnom mišiću (Bolhassani i sur., 2014).

## 4.2.1 Vrste elektroporacija

Kada se na stanice primjenjuju električni impulsi, opažaju se 2 različita fenomena: reverzibilna elektroporacija (EP) i ireverzibilna elektroporacija (IRE), koji se oboje koriste u kliničkoj praksi. Reverzibilna elektroporacija povećat će propusnost stanične membrane i otvoriti put za molekule koje su prevelike da bi prešle na staničnu membranu (DNA, RNA) ili olakšali ulazak stanica hidrofilnim molekulama (bleomicin, cisplatin). Ove molekule jednom kada prođu staničnu membranu, pokazuju svoj učinak na ponovno zatvaranje stanice. Suprotno tome, IRE ( $> 600 \text{ V / cm}$ ) koristi se kao netermalni oblik ablacije mekog tkiva u kliničkoj rutini. Ireverzibilna elektroporacija staničnih membrana dovodi do poremećaja stanične homeostaze, a time u konačnici do apoptoze u tretiranom tkivu. Ova metoda ablacije tkiva našla je široku upotrebu za uništavanje malignog tkiva (Probst i sur., 2018).

Tablica 1. Stupnjevi elektropermeabilizacije (Kotnik i sur., 2019).

Stupnjevi	Vremensko trajanje
<b>Inicijacija:</b> Kada transmembranska voltaža (TMS) pređe "kritičnu" vrijednost, električna propusnost i vodljivost membrane se počinje značajno povećavati	Nanosekunde (vodljivost) Mikrosekunde (propusnost)
<b>Širenje:</b> Sve dok TMS ostaje iznad "kritične" vrijednosti, propusnost i vodljivost su prisutne i/ili se povećavaju	Do kraja podražaja (do nekoliko milisekundi)
<b>Djelomičan oporavak:</b> Nakon što TMS padne ispod "kritične" vrijednosti, električna vodljivost i propusnost membrane se počinje	Mikrosekunde (provodljivost) Milisekunde (propusnost)

drastično padati, ali ne potpuno, stabilizira se na povećanoj vrijednosti koji se može detektirati još uvijek dopuštajući membransku difuziju iona i molekula	
<b>Ponovno formiranje:</b> Membrana postepeno vraća svoj fiziološki stupanj nepropusnosti (osim ako šteta nije ireverzibilna i stanica je izgubila sposobnost za funkcioniranje)	Sekunde do minute (20-37 stupnjeva celzija) Satima (4 stupnja celzija)
<b>Sjećanje:</b> Čak i nakon potpunog zatvaranja membrane, stanica može iskusiti promjene u fiziološkim procesima i reakcijama na podražaje prije nego se konačno vrati u prvobitno stanje	Satima

Postoje četiri opća neprekidna područja jakosti električnog polja koja mogu biti najbolje karakterizirana srodnim molekularnim transportom i funkcioniranjem stanice:

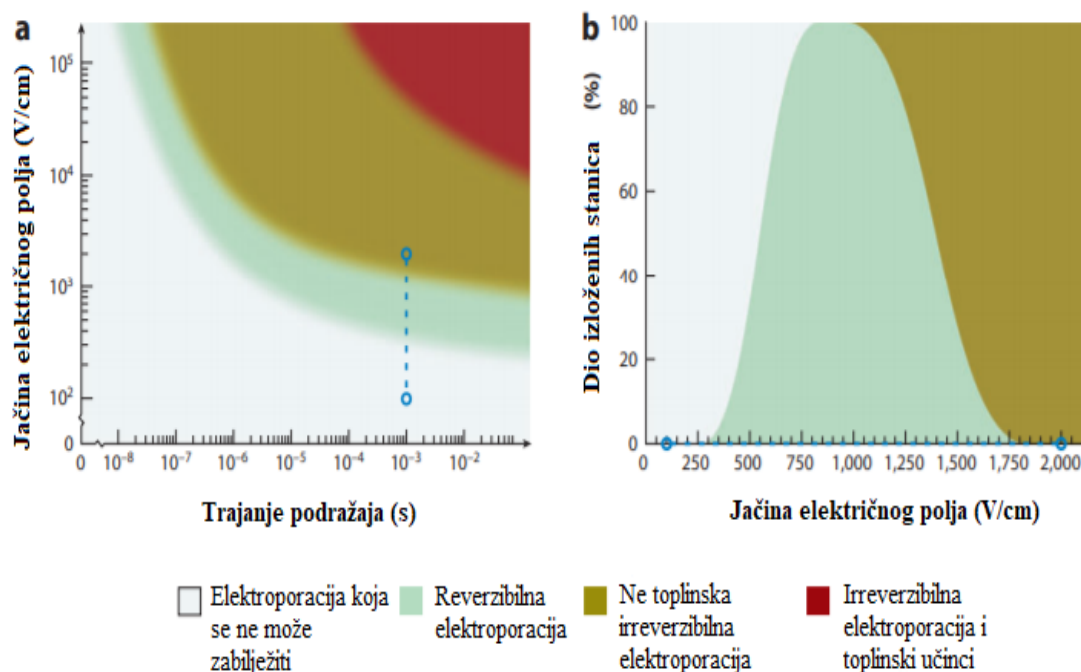
1) Nema elektroporacije koja se može otkriti: ovo je najniži raspon i onaj u kojem nema uočenog molekulskog transporta.

2) Reverzibilna elektroporacija: Ovdje se formiraju privremeni i ograničeni putevi za molekularni transport, ali nakon završetka električnog impulsa transport prestaje, a stanice ostaju sposobne za funkciju.

3) Netoplinška ireverzibilna elektroporacija: ovdje transport kroz membranu - posebno curenje unutarstaničnog sadržaja - previše je opsežno i/ili jako da se stanice oporave, što rezultira njihovom smrću i eventualnim raspadom. Ipak, ovdje općenito nema termičkog oštećenja stanice niti oslobođenih molekula.

4) Ireverzibilna elektroporacija popraćena toplinskim učincima: U dovoljno jakim poljima, električne struje uzrokuju porast temperature dovoljno visok za termička oštećenja stanicu kao i na oslobađanje molekula (Yarmush i sur., 2014).

Eksperimentalno utvrđena kinetika transmembranskog transporta grubo se može podijeliti u pet stupnjeva: pokretanje propusnog stanja, njegovo širenje, stabilizacija s djelomičnim oporavkom, ponovno uspostavljanje membrane i konačno postupni prestanak onoga što se naziva zaostali efekti memorije koji se odražavaju u staničnim izmjenjenim fiziološkim procesima i reakcijama na razne stresore (Kotnik i sur., 2019).



Elektroporacija i termalni učinci na stanice izložene električnim poljima. (a) Reverzibilna elektroporacija, irreverzibilna elektroporacija i termalno oštećenje nastalo zbog jačine i izloženosti električnom polju. (b) Dijelovi stanice neelektroporirani, reverzibilno elektroporirani i irreverzibilno elektroporirani zbog izloženosti električnom polju u trajanju od 1ms.

Slika 2. Utjecaj električnog polja s obzirom na jačinu i duljinu trajanja (prilagođeno prema Yarmush, 2014)

Izravna mikroskopska opažanja otkrila su da mehanizmi prijenosa tijekom elektroporacije ovise o vrsti molekula. Na primjer, male nabijene molekule kao propidijev jodid (PI), ulaze u stanice tijekom i nakon primjene električnog polja na oba pola izložena elektrodama. Negativno nabijena mala interferirajuća RNA (siRNA) molekula se, međutim, ulazi u staničnu citoplazmu isključivo na strani koja je okrenuta katodi i to samo kada se primjenjuje električno polje. Ako se doda nakon elektroporacije, siRNA je nesposobna suprimirati gene jer nije prodrla u stanice. Suprotno tome, penetracija plazmidne DNA počinje indukcijom lokalne fizičke interakcije između nukleinske kiseline i stanične membrane tijekom primjene električne polja; nakon čega slijedi sporo unutarstanično otpuštanje u citoplazmu nakon izlaganja električnom polju, a zatim putuje do jezgre. Te su razlike važne za planiranje liječenja ECT i GET (Yarmush i sur., 2014).



## 4.2.2. Mikroelektroporacija i nanoelektroporacija

### 1) Mikroelektroporacija

Mikroelektroporacija (MEP) je pokazala značajne prednosti u odnosu na BEP u pogledu kontroliranog unošenja strane tvari u stanicu tokom zadanog vremena za gotovo bilo koje stanice. Dizajniran je koncept MEP-a, membranski sustav elektroporacije sendviča kroz dobro definiran niz mikro-noževa i postignuta je veća učinkovitost isporuke, ujednačenija transfekcija gena i bolja vitalnost stanica u odnosu na uobičajeni BEP. U takvim MEP sustavima, budući da je električno polje precizno kontrolirano i fokusirano u kanalima veličine mikrometara, pojedinačnim stanicama koje su zarobljene unutar mikro otvora ili koji prolaze kroz mikrokanal mogu se elektroporirati sa mnogo manjim naponom. Koristeći prednosti mikrokanala MEP sustava, niz sustava temeljenih na MEP-ov unutarstaničnoj dostavi je razvijen.. Uz pomoć mikrofluida, stvoreni su uređaji MEP-a za poboljšanje isporuke siRNA i proteina u HeLa stanice i B stanice. Također je dizajniran trodimenzionalni MEP sustav temeljen na visokoj propusnosti magnetskih pinceta. U kombinaciji sa slabim vanjskim magnetskim poljem, takav MEP sustav trebao je ostvariti visoku propusnu transfekciju i zadržati održivost stanica. Unatoč nekoliko prednosti MEP-a, gore spomenutih sustava, precizna kontrola doziranja još nije postignuta jer dijeli slični mehanizam za isporuku s BEP-om koji se temelji na difuziji i nakupljanju sličnom endocitozi. (Shi i sur., 2018)

### 2) Nanoelektroporacija

Podošavanjem veličine otvora oko 90 nm, učinak elektroporacije na membranu bi mogao biti koncentriran na vrlo malo područje na staničnoj površini. Značajna prednost nanoelektroporacije (NEP) je precizna kontrola doze i visoka održivost stanica što se ne može postići niti jednom drugom metodom. Takva elektroporacija na bazi nanokanala uvodi sredstva brže i dublje u citoplazma. U usporedbi s konvencionalnom elektroporacijom (BEP i MEP) i drugim granskim oblicima elektroporacije, predloženo je da se mehanizam za isporuku nanokanala zasniva radije na elektroforezi sile nego na difuziji i/ili endocitozi. Međutim, jedna je slabost metode propusnost prirode tehnike, u kojoj ćelija koja se mora transficirati mora biti smještena u jednoj mikrokanal pomoću optičkih pinceta. Za tu svrhu, razvijen je uređaj sa visokom propusnošću baziran na silikonu koji se koristi za preciznu i benignu NEP transfekciju.

Potencijalne biomedicinske primjene takvog uređaja sa visokom propusnošću su: mjerenje unutarstaničnih koncentracija biomarkera kod karcinoma, preuređenje stanice, testiranje na lijekove protiv tumora itd. (Shi i sur., 2018).

Uz NEP sustav platformi, postoje još drugi načini nanoelektroporacije kao nanostub, nanonavojne cijevi i nanofontanska sonda. Nanostubne elektrode, koje ne samo da mogu zabilježiti izvanstanične i unutarstanične akcijske potencijale kultiviranih stanice, nego se mogu opetovano izmjenjivati u mjerenju unutarstaničnog i izvanstaničnog procesa ponovnog zatvaranja stanice. Također, mogu mjeriti male promjene u akcijskom potencijalu izazvanog lijekom koji pogađa ionske kanale, to je veoma obećavajuća osobina, pogotovo u pregledavanju stanice kada su one pod utjecajem vanjskih signala. Za razliku od NEP sustava, otvori nanonavojne cijevi strše u ciljnu stanicu kao šuplje nanoigle, koje otkriva da aktivne sile, poput optičke pincete ili dielektroforeze, nisu potrebe za uspostavljanje optimalnog kontakta između stanica i nanonavojne cijevi (Shi i sur., 2018).

### **4.3 Ireverzibilna elektroporacija**

Ireverzibilna elektroporacija (IRE) je tehnika koja se bavi ubijanjem nepoželjnih stanica, uglavnom stanica karcinoma, izravno, bez upotrebe bilo kakvih citotoksičnih lijekova. U ovoj se tehnici obično koristi vrlo visoko električno polje do 1000 V / cm, ali za vrlo kratko vrijeme izlaganja (nanosekunde). Niska električna polja (LEF) koriste se prije za internalizaciju molekula i lijekova unutar stanica (elektroendocitoza), ali uglavnom ne za ubijanje stanica (Shawki., 2013).

IRE koristi kratke ( $\sim 100 \mu\text{s}$ ), ali intenzivne kvadratne valove električne impulse (50–400), koje se dostavljaju pomoću elektroda umetnutih u ili susjedno ciljano tkivo. Ti impulsi induciraju raspodjelu električnog polja u ciljnom i okolnom tkivu, ovisno o konfiguraciji elektrode, amplitudi impulsa i vrsti tkiva. Za određeno tkivo i skup parametara impulsa (duljina pulsa, broj impulsa, brzina isporuke) može se odrediti prag električnog polja koji inducira staničnu smrt i formira leziju. Numerički modeli često se koriste za predviđanje inducirane zone raspodjele i ablacije električnog polja, koristeći apriorno znanje o električnim svojstvima tkiva (Bhonsle i sur., 2016).

Ako je broj impulsa prevelik, njihovo trajanje je predugo ili je amplituda polja kojemu je stanica izložena prejako, stanica umire zbog nepovratne elektroporacije, vjerojatno uslijed gubitka homeostaze (Miklavčić i Davalos, 2015).

Električni impulsi korišteni za isporuku tretmana IRE induciraju kolateralno zagrijavanje zbog otpornih svojstava biološkog tkiva, poznatog kao Joule grijanje. Kako bi se održala razlika IRE-a od termički zasnovanih terapija, impulsni protokoli moraju biti dizajnirani tako da ograničavaju Joule-ovo zagrijavanje ispod pragova koji uzrokuju strukturno termičko oštećenje tkiva i okolnih osjetljivih struktura (Bhonsle i sur., 2016).

Izabrana su četiri IRE protokola koji predstavljaju IRE vrlo visokog, visokog, umjerenog i blagog napona, a zatim za svaki od tih protokola stvaramo ekvivalentnu energiju koristeći različite LEF-ove parametre različitih amplituda (7, 10, 14 i 20 V), različite brojeve impulsa (40, 80, 160 i 320 impulsa), različite frekvencije od 0,5 do 106,86 Hz i različite širine impulsa od 9,38 do 2000 ms. Svaki od izračunatih LEF ekvivalentnih IRE primijenjen je na staničnu liniju Hela. Rezultati pokazuju potpuno uništavanje stanica raka za sve testirane protokole izloženosti. Ovo oštećenje nije nastalo zbog toplinskog učinka, jer izmjerena temperatura nije bila promijenjena prije i nakon izlaganja. Letalni učinak na stanice raka može se postići pomoću LEF ako se koristi isti energetske ekvivalent IRE (Shawki, 2013).

IRE se može izvesti uz CT ili ultrazvučno navođenje pod općom anestezijom. Opća anestezija je obvezna za IRE postupke; postupak se ne može izvesti pod svjesnom sedacijom. Kompletna neuromuskularna blokada je bitna za sprečavanje stimulacije skeletnih mišića zbog isporučenog visokog napona i za sprječavanje kretanja sonde sekundarnih kontrakciji mišića. Često korištena paralizirajuća sredstva uključuju cisatracurium besilat ili rokuronijev bromid. Trostruka faza CT trbuha provedena je s primjenom 65 mL jodiranog kontrasta nakon čega slijedi 65-ml fiziološki bolus, te se određuje namjeravana konfiguracija i broj sonde. Između sonde isporučuje se 70 visokonaponskih impulsa istosmjerne struje (1.500–3.000 V) kako bi se završio tretman jednog para sonde. Ovisno o broju parova, generator se automatski prebacuje na sljedeći par (e) kako bi dovršio tretman. Vrijeme liječenja između para je 70 sekundi (Narayanan, 2015)

Dok se 50 ° C obično bira kao prag za početak uvođenja toplinskih oštećenja na staničnoj skali, a primijećeno je da dugotrajno izlaganje blago povišenim temperaturama od 43

° C može dovesti do smrti stanice. Trenutnim toplinskim oštećenjem se smatraju temperature jod 83,6 ° C za prostatu ili 74,7 ° C za jetru (Bhonsle i sur., 2016).

### 4.3.1 Kliničke studije

Studija koja je istraživala takve ishode otkrila je da je medijan preživljavanja bolesnika s karcinomom gušterače III faze porastao sa 6-13 na 24,9 mjeseci u studiji na 200 osoba nakon liječenja IRE, što je otprilike udvostručilo preživljavanje pacijenta nakon tretiranja sa IRE (Sweeney i sur., 2017).

34 pacijenta liječena su s IRE, sonde su stavljene sa transrektalnim ultrazvučnim vodstvom s dvije do šest IRE sondi i transperinalno su postavljene unutar karcinomne lezije. Funkcionalni ishod je zabilježen kod svih bolesnika s praćenjem od najmanje 6 mjeseci. Za praćenje ishoda liječenja, korišten je MRI s pojačanim kontrastom 1 tjedan nakon što je proveden postupak, te daljnji MRI 6 mjeseci nakon provedenog postupka kako bi se isključili dokazi preostalog vidljivog karcinoma. Sveukupno, uključena su 34 pacijenta s prosječnom starošću od 65 godina (standardna devijacija =  $\pm 6$ ) i srednjim antigenom specifičnim za prostatu (PSA) od 6,1 ng / mL (interkvartilni raspon [IQR] = 4,3–7,7) , Nakon praćenja od 6 mjeseci, pojavilo se 12 komplikacija prvog stupnja i 10 komplikacija drugog stupnja; nijedan pacijent nije imao komplikacije stupnja 3 ili više (stupnjevi 1-5). S funkcionalnog stajališta, 100% (24/24) bolesnika bilo je uzdržljivo, a potencija je sačuvana u 95% (19/20) muškaraca koji su bili potentni prije liječenja. Primijećen je medijan PSA nakon 6 mjeseci od 3,4 ng / ml (interkvartilni raspon = 1,9–4,8 ng / ml). MRI je pokazao sumnjivu rezidualnu bolest u šest bolesnika, od kojih je četvero podvrgnuto drugom obliku lokalnog liječenja (Narayanan, 2015)

Studija iz 2014. uključivala je IRE tretman 221 pacijenta (325 tumora) u 16 studija i nije bilo većih nuspojava. Studija je primijetila samo nekoliko manjih komplikacija u jetri i 3 komplikacije gušterače; 2 curenja iz žuči i 1 slučaj tromboze portalne vene. Od 200 pacijenata koji su bili podvrgnuti IRE tretmanu lokalno uznapredovalog adenokarcinoma gušterače, otkrili su da je 37% bolesnika imalo komplikacije, te da je srednja ocjena komplikacija bila 2 (raspon 1–5). Učinkovitost liječenja IRE u liječenju karcinoma jetre i gušterače također je vidljiva iz kliničkih podataka. Sistemski pregled 129 bolesnika koji su podvrgnuti IRE zbog tumora jetre

izvijestio je da je ukupna stopa remisije u 3 mjeseca bila 67–100% za tumore veće od 3 cm i 93–100% za tumore manje od 3 cm (Chih-Yang Hsiao, Kai Wen Huang, 2017).

Većina bolesnika koji su prisutni s karcinomom gušterače nisu pogodni za operaciju, jer je 40% bolesnika dolazi s lokalno uznapredovalim karcinomom gušterače (LAPC) stadija 3, a 40% prisutno s metastatskim karcinomom gušterače (MPC). 1- i 5 -ugodišnja relativna stopa preživljavanja je loša (27% i 6% za sve faze kombinirane, respektivno). U bolesnika s lokalnom bolešću, petogodišnje preživljavanje je 24%, u usporedbi s onima s udaljenom bolešću u kojima je samo 2%. (Narayanan, 2015).

43 pacijenta su bili podvrgnuti 50 IRE zahvata perkutanom pristupom. 30 od 43 (69,8%) bolesnika imalo je LAPC, a prosječno preživljavanje tih bolesnika bilo je 16,2 mjeseca (95% CI: 10,1–22,3 mjeseca). Preostalih 13 pacijenata (30,2%) imalo je MPC, a prosječno preživljavanje je bilo 8,6 mjeseci (95% CI: 3,1–14,1 mjeseci). Devetnaest pacijenata (44%) primilo je kemoterapiju nakon IRE. Dvoje pacijenata s LAPC-om su reagirali izvrsno na tretman i bili su u mogućnosti podvrgnuti se operaciji s R0 (marginalan) resekcijama. Komplikacije od IRE gušterače uključuju bol u trbuhu (n = 10), pankreatitis (n = 7), hematoma (n = 7), spontani pneumotoraks (n = 1), potrebu za postavljanjem stenta u dvanaesniku (n = 1), tromboza glavne portalne vene (pronađena nakon mjerenja CT-om nakon mjesec dana) (n = 1), i sepsa 48 sati nakon IRE (n = 1). Slučajevi pankreatitisa rješavali su se produženim bolničkim boravkom i konzervativnim liječenjem. Od 20 pacijenata do kraja objave članka, nijedan smrtni slučaj nije bio izravno povezan s postupkom. Ova serija je pokazala potencijalnu korist za preživljavanje kod odabranih bolesnika s lokaliziranim ili metastatskim karcinomom gušterače koristeći perkutanu IRE (Narayanan, 2015).

## 4.4 Elektrokemoterapija (ECT)

Osnovno načelo ECT-a je upotreba elektroporacije za isporuku slabo ili ne -propusnih kemoterapijskih lijekova u stanice, što olakšava njihov transmembranski transport s ciljem povećanja njihove citotoksičnosti. U pretkliničkim studijama identificirani su bleomicin (BLM) i cisplatin kao najprikladniji lijekovi za klinička ispitivanja. Učinkovitost ECT-a bila je demonstrirana na različitim modelima čvrstih tumora, a tretman je potpun ili djelomičan. Prednost ECT je da ima izvrstan terapijski indeks za antitumorsku učinkovitost, stoga su potrebne vrlo niske koncentracije lijekova kemoterapeutika izbjegavajući toksičnost (Yarmush i sur., 2014).

Pacijent koji prima ECT tretman najprije će dobiti intravensku ili intratumoralnu primjenu antitumorskog lijeka (npr. BLM, cisplatin) tako da se može ravnomjerno rasporediti po vaskularnom sustavu i izvanstaničnom prostoru tkiva. Elektrode koje se nalaze oko ili unutar tumora dostavljaju točno određene električne impulse koji omogućuju difuziju inače membranskog nepropusnog lijeka protiv tumora u ciljne stanice. Nakon kratkog vremena, propusnost membrane će se vratiti u prvobitno stanje, a specifični kemoterapeutici će uzrokovati višestruko pucanje tumorske DNK (BLM) ili pucanje unutar i međulančane DNK veze (cisplatin) u stanicama tumora. Prednosti koje proizlaze iz ove kombinirane terapije uključuju malu dozu citostatičkog lijeka zbog lokalno pojačanog citotoksičnog učinka (BLM, 1000 puta i cisplatin, 80-puta povećanje toksičnosti), jer je za indukciju potrebno samo nekoliko molekula po stanici da bi uzrokovali staničnu smrt tijekom jedne sesije liječenja. Drugi učinak uzrokovan tretmanom je oslobađanje netaknutih antigena tumora uslijed izlaska tvari iz oštećenih stanica. Oslobođeni tumorski antigeni izloženi su imunološkom sustavu pacijenata i aktiviraju imunološki odgovor usmjeren na antigen. Budući da je ECT lokalno liječenje, udaljene metastaze nisu pogođene ovim tretmanom (Probst i sur., 2018).

Osim osnovnog mehanizma povećane propusnosti membrane što dovodi do povećane citotoksičnosti lijeka, opaža se smanjeni protok krvi tumora što rezultira efektom vaskularnih poremećaja ECT. Vaskularni poremećaji se javlja zbog odumiranja tumorskih stanica koje onda, raspadajući se, blokiraju vaskularni sustav tumorskog tkiva, te time uzrokuju daljnje propadanje preostalih tumorskih stanica. Pojačan imunološki odgovor također se opaža, stoga

se kombinacijom ECT s imunostimulirajućim rekombinantnim citokinima ili plazmidima koji se isporučuju sa GET kodiraju ove citokine; IL-2, IL-12, IL-15, GM-CSF i TNF- $\alpha$ , mogu značajno potencirati učinak ECT tretmana (Yarmush i sur., 2014).

Raspon primjene ECT može se podijeliti u 3 skupine:

- 1) liječenje kožnih i potkožnih metastaza smještenih u glavi ili vratu, melanom, nemelanomski kožni tumor ili metastaze tumora dojke na koži;
- 2) liječenje nekutnih metastaza lociranih u sarkomu kosti, jetre ili mekog tkiva ;
- 3) klinička ispitivanja za liječenje primarnih tumora, poput tumora jajnika ili debelog crijeva (Probst i sur., 2018).

#### **4.4.1 Bleomicin**

Bleomicin izaziva izravno oštećenje DNK, tako da uzrokuje pucanje jednostrukih i dvostrukih DNK lanaca u stanicama sisavaca. Postoje 2 mehanizma pomoću kojih bleomicin može uzrokovati staničnu smrt. Ako je u stanici prisutno samo nekoliko tisuća molekula bleomicina, stanica se zaustavlja u fazi G2-M i postaje povećana, što dovodi do izlaska polinukleusa i mikronukleusa. Zatim stanice umiru u sporem procesu koji traje oko 3 udvostručenja puta. Ako, s druge strane, stanice sadrže nekoliko milijuna molekula bleomicina, one se uništavaju mnogo brže, u roku od nekoliko minuta, zbog pseudoapoptoze jer bleomicin uzrokuje apoptozu skraćenim putem tako da stvara karakteristične fragmentacije DNA. Nakon toga slijedi smanjenje stanica, pucanje membrane i kondenzacija kromatina. (Chen i sur., 2019).

Testiran je pomoću mišjih fibrosarkoma SA-1 stanica koje su dobivene iz ascitnog oblika tumora kod miševa s 4 različita tretmana, uključujući (1) kontrolnu skupinu (neliječeni tumori), (2) tumore liječene samo bleomicinom, (3) tumori koji se tretiraju samo elektroporacijom i (4) tumori liječeni ECT bleomicinom. Važni fenomeni su uočeni, koji uključuju da je:

- (1) ECT s bleomicinom imao značajno bolju inhibiciju rasta tumora i nekroze tumora, dosegnuvši ~50% u 48 sati nakon tretmana u usporedbi s drugim skupinama liječenja,

(2) na 8 sati nakon ECT-a s bleomicinom, u nekim su žilama endotelne stanice s apoptotskim morfološkim karakteristikama i krvne žile bile nagomilane eritrocitima i sadržajem eritrocita,

3) je pronađeno trenutno smanjenje perfuzije tumora (oko 10% perfuzije tumora u kontroli tumori) nakon primjene ECT-a s bleomicinom (Chen i sur., 2019).

Električni impulsi i ECT s bleomicinom značajno su smanjili protok krvi liječenog tumora. Međutim, 48 sati nakon ECT-a, nakon ECT-a s bleomicinom i dalje je primijećen smanjeni protok krvi u tumoru, suprotno samim električnim impulsima. Apoptoza vaskularnih endotelnih stanica, kao i nakupljanje krvnih žila i ex-osmoza eritrocita, mogu povećati otpornost krvnih žila na protok krvi, zbog čega je opažen smanjeni protok krvi u tumorima. Štoviše, smanjeni protok krvi unutar tumora može također izazvati staničnu hipoksiju, što dovodi do smrti stanica raka (Chen i sur., 2019).



## 4.4.2 Cisplatin

Cisplatin je još jedan toksični lijek koji se obično koristi u ECT-u. Cisplatin je kemoterapijski lijek specifičan za fazu koji stvara umrežene veze između susjednih lanaca DNA i unutar istog lanca, čime ograničava replikaciju DNA tumorskih stanica. Plućne metastaze karcinoma gušterače bile su tretirane sa primjenom ECT-a s cisplatinom s električnim poljem od 1000 V / cm i dozom cisplatina od 10  $\mu$ M, u usporedbi sa samim cisplatinom, samom elektroporacijom, i bez liječenja. Mitohondrijska aktivnost tumorskih stanica također je ispitana 24, 48 i 72 sata nakon eksperimenta, što je rezultiralo smanjenjem otprilike 68%, 61%, odnosno 67% u usporedbi s kontrolnom skupinom. Također su zabilježili porast imunoreaktivnosti stanica duktalnog adenokarcinoma gušterače, dok je intenzitet pulsa bio oko 1000 V / cm. Rezultati postignuti ovim istraživanjem također sugeriraju da električni impulsi od oko 1000 V / cm može poboljšati transport i antikancerogeni učinak cisplatina, što može biti signal za oksidativni stres ili apoptozu (Chen i sur., 2019).

Studija na 19 pacijenata sa metastatskim melanomom je provedena da se uspoređi antitumorska aktivnost koristeći bleomicin u kombinaciji sa ECT-om i bleomicin korišten sam. Tijekom razdoblja duljeg od 12 tjedana, pacijenti tretirani sa bleomicinom i ECT su pokazali 78% poboljšanje stanja, što je značajno više od 32% poboljšanja stanje koje su pokazali pacijenti tretirani samo sa bleomicinom. Najnovije studije pokazuju da pulsirajuće električno polje u trajanju u rasponu nanosekunda (obično oko 10ns) i megavolt po metru utječu na unutarstanične strukture, ali ne dovode do formiranja velikih pora na membrani. Tako kratak, snažan električni puls može prodrijeti u unutrašnjost tumorske stanice i ubrzano smanjiti jezgru tumorske stanice i zaustaviti protok krvi do tumora. "Unutarstanična elektromanipulacija" može smanjiti mehanom do 90% unutar 2 tjedna od izlaganja električnom polju jačine 20 kV / cm i trajanju od 300ns. Svaki puls obično sadrži energiju u vrijednosti od 0,2J i 100 takvih pulseva povećava temperaturu pogođenog područja za samo 3 stupnja celzija, što je još uvijek manje od minimalne temperature potrebne za hipertermijske efekte (Bešić, 2007).

Čimbenici koji utječu na učinkovitost ECT-a uključuju veličinu tumora, prethodno liječenje, lokaciju i histološki tip. Kožne metastaze manje od 3 cm, koje nisu prethodno zračene, pokazuju najbolju objektivnu stopu odgovora. Geometrija, broj i razdvajanje elektroda utjecat

će na električno polje u tumoru kao i na rezultat liječenja. Međutim, stanična homeostaza može se trajno poremetiti ako se premaše određeni pragovi. Kritični čimbenici su među ostalim posebno amplituda i trajanje pulsa. Ako se poveća trajanje ili amplituda električnih impulsa, dogodit će se nepovratan poremećaj homeostaze stanica; reverzibilni EP: npr. 1,3 kV / cm, 99  $\mu$ s; IRE: npr. 1,5 kV / cm, 300  $\mu$ s) (Probst i sur., 2018).

Analizom podataka potvrđeno je da isporuka putem ECT-a ima značajno ( $p < 0,001$ ) veću učinkovitost (za više od 50%) od bleomicin ili injekcija cisplatina kada se upotrebljuju u monoterapiji. Ukupna učinkovitost ECT-a nakon jednog tretmana bila je 84,1% odgovora (uključuje potpune i djelomične odgovore), a od toga je bilo 59,4% potpunih odgovori (pokazuju potpunu regresiju tumora nakon terapije). Prednost ovog postupka je da se može ponoviti više puta sa sličnim rezultatima. Nedostatak postupka se nalaz u nedovoljno određenim uvjetima postupka i nedovoljnoj efikasnosti kod tumora većih od 3 milimetara u promjeru (Yarmush i sur., 2014).

## 4.5 Genska Terapija

Genska terapija je postupak koji se koristi za liječenje ili poboljšanje zdravstvenog stanja pacijenta modificiranjem pacijentovih stanica. Pruža jedinstven pristup liječenju i nasljednih i stečenih bolesti isporučivanjem terapijskog genskog materijala i njegovih povezanih regulatornih elemenata u jezgri; da se ispravi gubitak funkcije uzrokovan mutacijom ili da se eksprimira genski proizvod s nedostatkom na fiziološkoj razini (Ramamoorthi i sur., 2015).

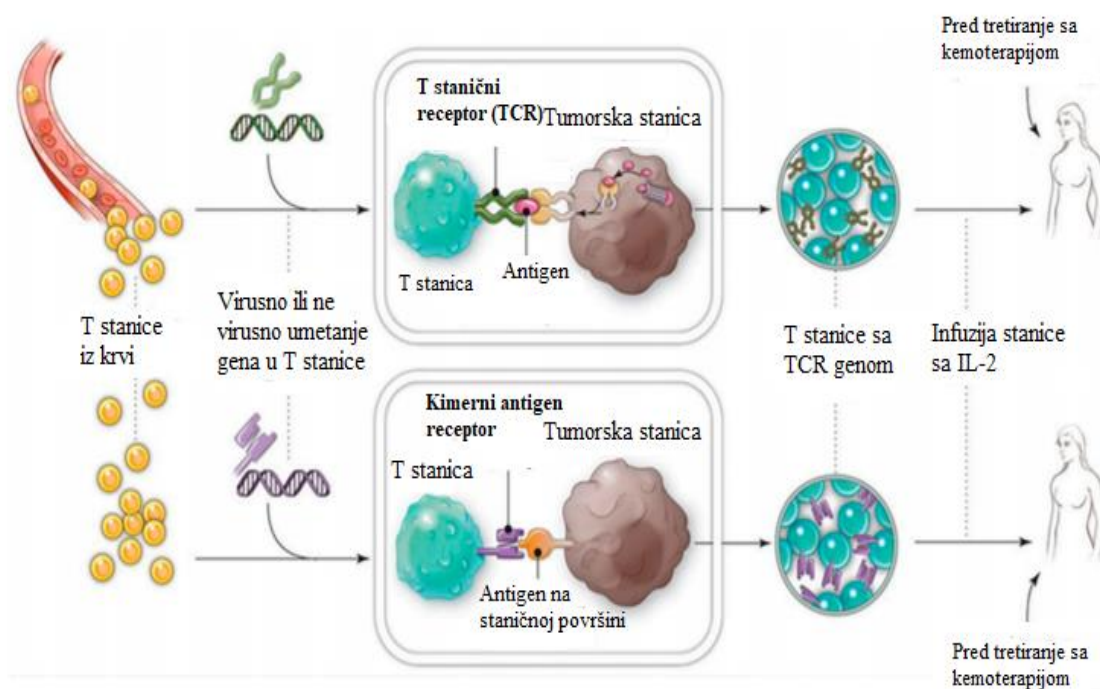
Doza terapijskog proteina trebala bi biti prikladna za liječenje bolesti. Iako mala doza može biti neučinkovita, visoka doza može biti toksična ili pokrenuti signalne kaskade koje reguliraju odgovor na protein ili aktivnost. Ekspresija transgena također bi trebala biti prilagođena tako da se terapijski protein nalazi na odgovarajućem mjestu tkiva i stanica. Na primjer, u slučaju mišićne distrofije, ispravljeni protein treba biti izražen u mišićnim stanicama. Faktor VIII za hemofiliju treba na odgovarajući način izraziti u cirkulaciji. Za bilo koju vrstu genske terapije, teško je predvidjeti razinu ekspresije i trajanje terapijskog proteina jer proizvodnja proteina ovisi o stanici ili tkivu koje je transficirano. Vrsta stanice, održivost stanica i status staničnog ciklusa mogu utjecati na transkripciju, obradu mRNA i razgradnju mRNA. Nakon prevođenja, posttranskripcijske modifikacije poput proteolitičkog cijepanja ili glikozilacije moraju biti prikladne za funkciju proteina. Izraženi protein možda nema isti poluživot kao prirodni protein. Zbog ovih poteškoća, farmakokinetika i farmakodinamička varijabla eksprimiranih terapijskih proteina, uključujući brzinu nakupljanja, vršne razine i brzinu razgradnje, slabo su istražene (Heller, 2016).

Biomedicinska primjena elektroporacije uključuje genski elektrotransfer (GET) na stanice i tkiva za gensku terapiju i DNA cijepanje. Ova se tehnika koristi uglavnom za DNA cijepanje protiv zaraznih bolesti, raka, artritisa, multiple skleroze i upale nakon transplantacije organa i genetski modificirati stanice za primjenu regenerativnih lijekova. U liječenju raka, većina GET prekliničkih studija usredotočena je na isporuku imunomodulatorne gene, poput IL-12, IL-2, IL-15, i GM-CSF. Nekoliko studija dokumentira uporabu gena koji ciljaju vaskularnu tumorsku vaskularu, poput vazostatina, endostatina i vaskularnog endotelnog faktora rasta. GET od antiangiogeni metargidinski peptid (AMEP) koji cilja integrise i dobiva

ciljanje siRNA dokazano je da endoglin djeluje antiproliferativno i antiangiogeno na tumore melanoma (za AMEP) i tumore karcinoma mliječne žlijezde (za siRNA). Kliničke studije koje su uspješno koristile GET, pokazali su sigurnost i učinkovitost GET-a na tumorima. Jedna studija pokazala je da IL-12 dolazi do kožnog melanoma kod ljudi vrlo učinkovito, jer je uočena tumorska nekroza u većini liječenih lezija; Nadalje, kod dva pacijenta, odgovor je opažen i kod dalekog neliječenog liječenja metastaze. Druga klinička studija koja je ispitivala intratumorni GET plazmida AMEP u bolesnika s kožnim metastazama melanoma pokazala je ne samo sigurnost prijenosa molekule u tumore, nego i određenu učinkovitost (Yarmush i sur., 2014).

Metode isporuke gena, cjepiva i lijeka dijele se na: a) fizičke / nevirusne pristupe poput tetoviranja, genskog pištolja, ultrazvuka, elektroporacije, lasera; b) Kemijski / nevirusni sustavi kao što su: kationski lipidi / liposomi, polisaharidi, kationski polimeri, kationski peptidi, mikro- / nano-čestice i c) Biološki / virusni vektori. Nevirusni vektori sigurni su za čovjekovo tijelo i jednostavni za upotrebu. Među njima se elektroporacijom može raspodijeliti fragmenti nukleinske kiseline, oligonukleotidi, siRNA i plazmidi u stanice. Studije s elektroporacijom provedene su in vivo; međutim, elektroporacija je ponekad štetna za diferencirane stanice odraslih (Bolhassani i sur., 2014).

Genske terapije spadaju u pet osnovnih kategorija. Prvo, u zamjeni proteina dovodi se divlja vrsta komplementarne deoksiribonukleinske kiseline (cDNA), tako da eksprimirani terapijski protein nadoknađuje nedostajući ili mutirani protein, kao kod cistične fibroze ili hemofilije. Drugo, terapije tumora uglavnom su dizajnirane da izravno induciraju staničnu smrt, ili da bi se potaknuo imunološki sustav protiv tumora i njegovih metastaza ili za modificiranje mikrookoline tumora. Treće, za proizvodnju klasičnih cjepiva protiv zaraznih bolesti organizam se mora kultivirati i oslabiti ili inaktivirati kako je cjepivo zamišljeno. Upotreba organizmovih gena ili cDNA za ekspresiju antigena omogućava da se komponente cjepiva prilagode za učinkovitost, a da se izbjegne mogućnost infekcije. Za cjepiva protiv raka, isporučuju se tumorski antigeni da aktiviraju imunološki odgovor pacijenta na antigen i izazovu preventivni učinak. Četvrto, cDNA se može isporučiti za proizvodnju proteina koji modulira endogeni odgovor, na primjer, za podršku zacjeljivanju rana. Konačno, bjelančevine povezane sa bolešću mogu se regulirati ili stanice osjetiti na specifične terapije koristeći nekoliko mogućih mehanizama temeljenih na nukleinskoj kiselinu (Heller, 2016).



Slika 3. Dijagram genske terapije u personaliziranoj medicini (prilagođeno prema Shi, 2018)

Negativno nabijeni oligonukleotidi poput malih interferirajućih RNA imaju veličinu otprilike 6 kDa i slobodno ulaze u citoplazmu stanice kad su prisutni tijekom elektrotransfera, ali ne ulaze kad se dodaju nakon primjene impulsa. Prosječni plazmid je težak više od 3000 kDa, a mehanizam kojim ulazi u stanicu zahtijeva kombinaciju elektroporacije membrane, elektroforeze DNA, endocitoze i intracelularnog transporta kroz citoskelet. Plazmidi su najčešći oblik prijenosa genske terapije električnim putem. Sekvence veće od 15 kilobaza mogu se umetnuti u DNA plazmida, iako s većim umetcima manipuliranje plazmidom postaje teže. Za promociju eukariotske proteine, uz promotore i pojačivače, potrebno je početno mjesto prijevoda ili Kozak slijed. Sekretorna sekvenca omogućava izlučivanje proteina ako je potrebno. Unutarnje mjesto ulaska u ribosom omogućava polikistroničnu koekspresiju u istoj transficiranoj stanici. Ovo je korisno za terapijske molekule koje kodiraju više mRNA kao što je interleukin 12 i za koekspresiju komplementarnih terapijskih gena kao što su angiogeni faktori. Slijed mora imati signal poliadenilacije da bi se proizvela čitljiva mRNA. (Heller, 2016)

Skeletni mišić je najpogodnije ciljno tkivo iz više razloga, uključujući dugotrajno lučenje terapeutskih proteina za sistemsku raspodjelu i promicanje snažnih humoralnih i staničnih imunoloških odgovora nakon cijepljenja. Brojni čimbenici utječu na unos plazmida i ekspresiju nakon intramuskularne injekcije, a potom elektroporacije. Oni uključuju: ciljani mišić, starost, formulaciju plazmida, koncentraciju i dozu plazmida, pulsni obrazac, intenzitet električnog polja (struja, napon i otpor), dužinu pulsa, vrijeme kašnjenja, konfiguraciju i orijentaciju elektrode. Ova poboljšanja u uvjetima elektroporacije mogu povećati učinkovitost prenošenja plazmida i smanjiti ukupnu količinu plazmidnih i DNA cjepiva potrebnih za stvaranje ciljanih razina biološki aktivnih proteina ili antitijela (Bolhassani i sur., 2014).

Dvije osnovne vrste pulsa mogu se koristiti za isporuku nukleinskih kiselina in vivo. Eksponencijalno propadajući impulsi nastaju kada se nabijeni kondenzator ispušta u tkivo. Oni se obično koriste u bakterijskoj transfekciji i korišteni su u početnim demonstracijama in vivo isporuke kemoterapijskih sredstava i plazmidne DNA. Impulsi kvadratnih valova omogućuju bolju kontrolu parametara impulsa neophodnih za klinički razvoj in vivo isporuke. Da bi se stvorili kvadratni valni impulsi, ekspancijalni impuls se skraćuje brzim prebacivanjem. Iako se ovi impulsi nazivaju "kvadratni val", tijekom pada impulsa i dalje dolazi mali pad napona. Promjene pulsa mogu se koristiti za isporuku nukleinskih kiselina i za prilagođavanje naknadnih razina ekspresije proteina i kinetike terapijskog proteina. Te varijable uključuju napon, dužinu, broj i frekvenciju koji se primjenjuju na impuls. Za in vivo primjene, omjer napona i udaljenosti između pulsa i udaljenosti obično je manji od 1500 V / cm. Pojedinačna duljina pulsa može varirati između 100  $\mu$ s i 100 ms. Općenito, ukupni broj impulsa (manje od 10) i frekvencija pulsa (manje od 10 Hz) su niski. Kratki, viskonaponski impulsi imaju vrijednost u mikrosekundama, dok dugi, niskonaponski impulsi imaju vrijednost u milisekundnom području. Kombinacije ovih tipova impulsa mogu se koristiti za iskorištavanje mehanizma elektroporacije-elektroforeze plazmidnog elektrotransfera DNA (Heller, 2016).

U nedavnom 3D NEP-u uz pomoć dielektroforeze (pDEP-NEP) implementirana je za obradu ne virusna platforma imunoloških stanica (stanica NK-92) unutarstaničnom isporukom himernog antigenskog receptora (CAR) koji kodira plazmide i transfekcijom je postignuta učinkovitost veća od 70%, u usporedbi s BEP-om koji ima učinkovitost manju od 30% (Shi i sur., 2018).

## 5. Zaključak

Rak je bolest sa visokim postotkom smrtnih ishoda. Kompleksna je bolest čiji mehanizmi još uvijek nisu potpuno razjašnjeni . Liječenje može biti dugotrajno, skupo i neefikasno. Godine istraživanja i milijarde dolara su utrošene na pronalazak učinkovitog lijeka. Tri glavna načina liječenje raka su kirurški zahvat, lijekovi (kemoterapija, ciljana terapija, imunoterapija, hormonska terapija) i radioterapija.

Zbog raznolikih vrsta tumora i mutacija koje se pojavljuju, veoma je teško pronaći standardiziranu terapiju. Nemaju svi pacijenti istu reakciju na terapiju. Kod nekih terapija uopće ne djeluje, kod nekih je prekasno otkriven tumor, kod nekih su nuspojave preopasne da bi se nastavilo sa terapijom.

Unatoč problemima sa kojim se moderna medicina suočava u terapiji tumora, određena postignuća su zabilježena. Smrtnost zbog tumora se smanjuje, kvaliteta života se poboljšava, stupanj ponovnog pojavljivanja tumora je reduciran.

Korištenje električnih polja spada u novije metode pri liječenju tumora i još je relativno neistraženo, ali obećavajuće područje. Poboljšava unos lijekova u stanicu, koristi se kod genske terapije i u ablaciji tumorskog tkiva. Terapija je veoma sigurna, nuspojave nisu izražene i postotak oporavka pacijenata je veoma visok. Kod pacijenata kod kojih operativni zahvati nisu mogući, terapija električnim poljima pokazala se učinkovitom u vidu produljenja života.

U budućim istraživanjima fokusiranje će biti na doprinosu električnih polja genetskom inženjeringu i personaliziranoj imunoterapiji.

## 6. Literatura

Adamo A, Arione A, Sharei A, Jensen K.F. Flow-through comb electroporation device for delivery of macromolecules. *Anal Chem*, 2013, 85, 1637–1641.

Anwer K. Formulations for DNA delivery via electroporation in vivo. *Methods Mol Biol*, 2008, 423, 77-89.

Bayry J, Lacroix-Desmazes S, Kazatchkine M.D, Galicier L, Lepelletier Y, Webster D, Levy Y, Eibl M.M, Oksenhendler E, Hermine O. Common variable immunodeficiency is associated with defective functions of dendritic cells. *Blood*, 2004, 104, 2441–2443.

Bešić E. Physical mechanisms and methods employed in drug delivery to tumors. Published online, 2007.

Bhonsle S, Davalos R. Preclinical Studies on Irreversible Electroporation. U: Handbook of Electroporation, Miklavčič D, urednik, Springer, 2016, str. 1-16.

Bolhassani A, Khavari A, Orafa Z. Electroporation – Advantages and Drawbacks for Delivery of Drug, Gene and Vaccine, Application of Nanotechnology in Drug Delivery. U Application of Nanotechnology in Drug Delivery, Demir Sezer, urednik, Rijeka, InTech, 2014, str. 11.

Bolhassani A, Mohit E, Ghasemi N, Salehi M, Taghikhani M, Rafati S. Enhancement of potent immune responses to HPV16 E7 antigen by using different vaccine modalities. *BMC Proceedings*, 2011, 19.

Vrste tumora, 2015., <http://www.cancer.gov/>, pristupljeno 16.4.2020.

Chih-Yang H, Kai-Wen H. Irreversible Electroporation: A Novel Ultrasound-guided Modality for Non-thermal Tumor Ablation, *Journal of Med Ultrasound*, 2017, 195-200.



Chen Y, Moseer M, Luo Y, Zhang W, Zhang B. Chemical Enhancement of Irreversible Electroporation, 2019, *Technol Cancer Res Treat*, 18,1533033819874128.

Mehanizmi tumora, 2017., <https://www.coursehero.com/>, pristupljeno 15.7.2020.

Čemažar M, Miklavčič D, Ščančar J, Dolžan V, Golouh R, Serša G. Increased platinum accumulation in SA-1 tumour cells after in vivo electrochemotherapy with cisplatin. *Br J Cancer*, 1999, 79, 1386–91.

Davies A, Weinberg U, Palti Y. Tumor treating fields; a new frontier in cancer therapy. *Ann NY Acad Sci*, 2013, 1291, 86-95.

Edhemović I, Gadžijev EM, Breclj E, Miklavčič D, Kos B. Electrochemotherapy: a new technological approach in treatment of metastases in the liver. *Technol Cancer Res Treat*, 2011, 10, 475–85

Fei Z, Hu X, Choi H.W, Wang S, Farson D, Lee L.J. Micronozzle array enhanced sandwich electroporation of embryonic stem cells. *Anal Chem*, 2010, 82, 353–358.

Ferlay J, Colombet M, Soerjomataram I, Dyba T, Randi G, Bettio M, Gavin A, Visser O, Braf F. Cancer incidence and mortality patterns in Europe: Estimates for 40 countries and 25 major cancer in 2018, *Europ Journal of Cancer*, 2018, 356-387

Gabriel B, Teissié J. Direct observation in the millisecond time range of fluorescent molecule asymmetrical interaction with the electroporabilized cell membrane. *Biophys J*, 1997, 73(5), 2630–2637.

Gehl J, Skovsgaard T, Mir LM. Enhancement of cytotoxicity by electroporabilization: an improved method for screening drugs. *Anticancer Drugs*, 1998, 9, 319–25.

Golzio M, Teissie J, Rols M-P. Direct visualization at the single-cell level of electrically mediated gene delivery. *Proc Natl Acad Sci*, 2002, 99, 1292–97.

Tumorsko liječenje, 2018., <https://www.healthline.com/>, pristupljeno 08.04.2020.

Heller L. Principles of Electroporation for Gene Therapy. U Handbook of Electroporation. Heller R, Serša G, urednici, Norfolk, Springer, 2016, str. 1-16.

Heller L, Pottinger C, Jaroszeski MJ, Gilbert R, Heller R. In vivo electroporation of plasmids encoding GM-CSF or interleukin-2 into existing B16 melanomas combined with electrochemotherapy induces long-term antitumour immunity. *Melanoma Res*, 2000, 10, 577–83.

Jarm T, Cemažar M, Miklavčič D, Serša G. 2010. Antivascular effects of electrochemotherapy: implications in treatment of bleeding metastases. *Expert Rev Anticancer Ther*, 2010, 10, 729–46.

Krassowska W, Filev P.D. Modeling electroporation in a single cell. *Biophys. J*, 2007, 92, 404–417.

Kotnik T, Rems L, Tarek M, Miklavčič D. Membrane Electroporation and Electropermeabilization: Mechanisms and Models. *Annual Review Biophys*, 2019, 48, 63-91.

Kurosawa O, Oana H, Matsuoka S, Noma A, Kotera H, Washizu M. Electroporation through a micro-fabricated orifice and its application to the measurement of cell response to external stimuli. *Meas Sci Technol*, 2006, 17, 3127–3133.

Langus J, Kranjc M, Kos B, Sustar T, Miklavčič D. Dynamic finite-element model for efficient modelling of electric currents in electroporated tissue. *Sci Rep*, 2016, 6, 26409.

Liječenje tumora, 2015., <http://www.stanfordhealthcare.com/>, pristupljeno 16.6.2020.

Medicinske vijesti, 2017., <https://www.medicalnewstoday.com/>, pristupljeno 14.5.2020.

Mir LM, Belehradek M, Domenge C, Orłowski S, Poddevin B. Electrochemotherapy, a new antitumor treatment: first clinical trial. *C R Acad Sci*, 1991, 313, 613–18.

Mir LM, Orlowski S, Belehradek J Jr, Paoletti C. Electrochemotherapy potentiation of antitumour effect of bleomycin by local electric pulses. *Eur J Cancer*, 1991, 27, 68–72.

Mun E, Babiker E, Weinberg U, Kirson E, Von Hoff D. Tumor-Treating Fields: A Fourth Modality in Cancer Treatment. *Clin Cancer Res*, 2018, 23(2), 266-275.

Narayanan, G. Irreversible Electroporation. *Semin Intervent Radiol*, 2015, 32(4), 349-355.

Orlowski S, Belehradek J Jr, Paoletti C, Mir LM. Transient electroporation of cells in culture: increase of the cytotoxicity of anticancer drugs. *Biochem Pharmacol*, 1988, 37, 4727–33.

Paganin-Gioanni A, Bellard E, Escoffre JM, Rols MP, Teissie J, Golzio M. Direct visualization at the single-cell level of siRNA electrotransfer into cancer cells. *Proc Natl Acad Sci*, 2011, 108, 10443–47.

Pearce, T. Thermal damage and rate processes in biologic tissues. U: Optical-thermal response of laser-irradiated tissue. Welch A, van Gemert M, Urednici, Dordrecht, Springer, 2011, str. 487–549.

Probst U, Fuhrmann I, Beyer L, Wiggermann P. Electrochemotherapy as a New Modality in Interventional Oncology. *Technol Cancer Res Treat*, 2018, 17, 1533033818985329.

Ramamoorth M, Narverkar A. Non Viral Vectors in gene therapy. *J Clin Diagn Res*, 2015, 9(1), GE01 – GE06.

Roux S, Bernat C, Al-Sakere B, Ghiringhelli F, Opolon P. Tumor destruction using electrochemotherapy followed by CpG oligodeoxynucleotide injection induces distant tumor responses. *Cancer Immunol Immunother*, 2008, 57, 1291–300.

Sedlar A, Dolinsek T, Markelc B, Prosen L, Kranjc S. Potentiation of electrochemotherapy by intramuscular IL-12 gene electrotransfer in murine sarcoma and carcinoma with different immunogenicity. *Radiol Oncol*, 2012, 46, 302–11.

Serša G, Jarm T, Kotnik T, Coer A, Podkrajšek M. Vascular disrupting action of electroporation and electrochemotherapy with bleomycin in murine sarcoma. *Br J Cancer*, 2008, 98, 388–98.

Serša G, Čemažar M, Miklavčič D. Antitumor effectiveness of electrochemotherapy with cis-diamminedichloroplatinum(II) in mice. *Cancer Res*, 1995, 55, 3450–55.

Serša G, Miklavčič D, Čemažar M, Belehradek J, Jarm T, Mir LM. Electrochemotherapy with CDDP on LPB sarcoma: comparison of the anti-tumor effectiveness in immunocompetent and immunodeficient mice. *Bioelectrochem Bioenerg*, 1997, 43, 279–83.

Shawki M, Badria A. Low electric field parameters required to induce death of cancer cells. *Electromag Biology and Medicine*, 2013, 33(2).

Shi J, Ma Y, Zhu J, Chen Y, Sun Y, Yao Y, Yang Z, Xie J. Electroporation-Based Intracellular Delivery. *MDPI*, 2018, 23(11), 3044.

Statistika tumora, 2018., <http://www.who.int/>, pristupljeno 25.5.2020.

Sweeney D, Neal R, Davalos R. Multi-scale Biophysical Principles in Clinical Irreversible Electroporation. *Irreversible Electropo in Clinical Pract*, 2017, 15, 41-66.

Szeto G.L, Van Egeren D, Worku H, Sharei A, Alejandro B, Park C, Frew K, Brefo M, Mao S, Heimann M. Microfluidic squeezing for intracellular antigen loading in polyclonal B-cells as cellular vaccines. *Sci Rep*, 2015, 5, 10276.

Towhidi L, Kotnik T, Pucihar G, Firoozabadi SMP, Mozdarani H, Miklavčič D. Variability of the minimal transmembrane voltage resulting in detectable membrane electroporation. *Electromagn Biol Med*, 2008, 27, 372–85.

Tsong T.Y. Electroporation of cell membranes. *Biophys J*, 1991, 60, 297–306.

Tumori, 2017., <https://www.lifescience.com/>, pristupljeno 5.6.2020.

Tumorski mehanizmi, 2016., <https://courses.lumenlearning.com/>, pristupljeno 26.4.2020.

Tumori, 2017., <https://www.medicinenet.com/>, pristupljeno 4.5.2020.

Walter U, Hoepfner J, Prudente-Morrissey L, Horowski S, Herpertz S.C, Benecke R. Parkinson's disease-like midbrain sonography abnormalities are frequent in depressive disorders. *Brain*, 2007, 130, 1799–1807.

Wang X, Kwak K.J, Yang Z, Zhang A, Zhang X, Sullivan R, Lin D, Lee R.L, Castro C, Ghoshal K. Extracellular mRNA detected by molecular beacons in tethered lipoplex nanoparticles for diagnosis of human hepatocellular carcinoma. *PLoS ONE*, 2018, 13, e0198552.

Yang Z, Chang L, Chiang C.L, Lee L.J. Micro-/nano-electroporation for active gene delivery. *Curr Pharm Des*, 2015, 21, 6081–6088.

Yang Z.F, Klionsky D.J. Mammalian autophagy: Core molecular machinery and signaling regulation. *Curr Opin Cell Biol* 2010, 22, 124–131.

Yarmush M, Golberg A, Serša G, Kotnik T, Miklavčič D. Electroporation-Based Technologies for Medicine: Principles, Applications and Challenges. *Annual Rev of Biomed Engin*, 2014, 16, 295-320.

Zudans I, Agarwal A, Orwar O, Weber S.G. Numerical calculations of single-cell electroporation with an electrolyte-filled capillary. *Biophys J*, 2007, 92, 3696–3705.

## 7. SAŽETAK

Rak je druga po smrtnosti najučestalija bolest na svijetu. Zbog svoje kompleksnosti, liječenje još uvijek nije efikasno u mnogim slučajevima. Zbog raznolikih vrsta tumora i mutacija koje se pojavljuju, veoma je teško pronaći standardiziranu terapiju.

Korištenje električnih polja spada u novije metode pri liječenju tumora i još je relativno neistraženo, ali obećavajuće područje. Pobošljava unos lijekova u stanicu, koristi se kod genske terapije i u ablaciji tumorskog tkiva. Terapija je veoma sigurna, nuspojave nisu izražene i postotak oporavka pacijenata je veoma visok.

Dva su glavna ishoda djelovanja električnog polja na membranu. Ireverzibilna i reverzibilna elektroporacija. Kod ireverzibilne elektroporacije, struktura membrane je trajno narušena i ona se neće vratiti u prvotno stanje, te se time postiže smrt stanice. Kod reverzibilne elektroporacije, membrana se vraća u prvobitno stanje, te ne dolazi do smrti stanice.

Elektrokemoterapija je poboljšani način dostave lijeka u tumorsku stanicu. Pomoću električnog polja se povećava propusnost membrane, te lijek lakše ulazi u tumorsku stanicu. Primjenom elektrokemoterapije, smanjuje se potreba doza kemoterapeutike za liječenje, broj nuspojava je reduciran, profil liječenja je poboljšani.

Bleomicin i cisplatin su indentificirani kao lijekovi koji bi mogli imati poboljšanu terapiju sa elektrokemoterapijom. Istraživanja sa bleomicinom su pokazala da ima 50% poboljšano djelovanje kada se primjenjuje sa elektrokemoterapijom, u odnos na primjenjivanje njega samog.

Genska terapija je novi pristup liječenju tumora. Može se koristiti da se ispravi gubitak funkcije uzrokovan mutacijom ili da se eksprimira genski proizvod s nedostatkom na fiziološkoj razini.

# Temeljna dokumentacijska kartica

Sveučilište u Zagrebu  
Farmaceutsko-biokemijski fakultet  
Studij: Farmacija  
Zavod za Biofiziku  
A. Kovačića 1, 10000 Zagreb, Hrvatska

Diplomski rad

## NASLOV DIPLOMSKOG RADA

**Denaj Novak**

### SAŽETAK

Rak je druga po smrtnosti najučestalija bolest na svijetu. Zbog svoje kompleksnosti, liječenje još uvijek nije efikasno u mnogim slučajevima. Zbog razolikih vrsta tumora i mutacija koje se pojavljuju, veoma je teško pronaći standardiziranu terapiju.

Korištenje električnih polja spada u novije metode pri liječenju tumora i još je relativno neistraženo, ali obećavajuće područje. Poboljšava unos lijekova u stanicu, koristi se kod genske terapije i u ablaciji tumorskog tkiva. Terapija je veoma sigurna, nuspojave nisu izražene i postotak oporavka pacijenata je veoma visok.

Dva su glavna ishoda djelovanja električnog polja na membranu. Ireverzibilna i reverzibilna elektroporacija. Kod ireverzibilne elektroporacije, struktura membrane je trajno narušena i ona se neće vratiti u prvotno stanje, te se time postiže smrt stanice. Kod reverzibilne elektroporacije, membrana se vraća u prvobitno stanje, te ne dolazi do smrti stanice.

Elektrokemoterapija je poboljšan način dostave lijeka u tumorsku stanicu. Pomoću električnog polja se povećava propusnost membrane, te lijek lakše ulazi u tumorsku stanicu. Primjenom elektrokemoterapije, smanjuje se potreba doza kemoterapeutike za liječenje, broj nuspojave je reduciran, profil liječenja je poboljšan.

Bleomicin i cisplatin su indentificirani kao lijekovi koji bi mogli imat poboljšanu terapiju sa elektrokemoterapijom. Istraživanja sa bleomicinom su pokazala da ima 50% poboljšano djelovanje kada se primjenjuje sa elektrokemoterapijom, u odnos na primjenjivanje njega samog.

Genska terapija je nov pristup liječenju tumora. Može se koristiti da se ispravi gubitak funkcije uzrokovan mutacijom ili da se eksprimira genski proizvod s nedostatkom na fiziološkoj razini.

Rad je pohranjen u Središnjoj knjižnici Sveučilišta u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta.

Rad sadrži: XX stranica, XX grafičkih prikaza, XX tablica i XX literaturnih navoda. Izvornik je na hrvatskom jeziku.

Ključne riječi: Tumor, električno polje, elektroporacija, elektropermeabilizacija, elektrokemoterapija, genska terapija, ireverzibilna elektroporacija, reverzibilna elektroporacija

Mentor: **Dr. sc. Erim Bešić**, *docent Sveučilišta u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta.*

Ocjenjivači: **Dr. sc. Erim Bešić**, *docent Sveučilišta u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta.*

**Dr. sc. Mario Gabričević**, *izvanredni profesor Sveučilišta u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta.*

**Dr. sc. Tin Weitner**, *viši asistent Sveučilišta u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta.*

Rad prihvaćen: svibanj 2010

## Basic documentation card

University of Zagreb  
Faculty of Pharmacy and Biochemistry  
Study: Pharmacy  
Department of Biophysics  
A. Kovačića 1, 10000 Zagreb, Croatia

Diploma thesis

### TITLE

**Denaj Novak**

### SUMMARY

Cancer is the second most common disease in the world. Due to its complexity, treatment is still not effective in many cases. Due to the various types of tumors and mutations that occur, it is very difficult to find standardized therapy.

The use of electric fields is one of the newer methods in the treatment of tumors and is still a relatively unexplored but promising area. It improves the uptake of drugs into the cell, is used in gene therapy and in the ablation of tumor tissue. The therapy is very safe, the side effects are not pronounced and the recovery rate of the patients is very high.

There are two main outcomes of the action of an electric field on a membrane. Irreversible and reversible electroporation. In irreversible electroporation, the structure of the membrane is permanently disrupted and it will not return to its original state, thus achieving cell death. With reversible electroporation, the membrane returns to its original state, and cell death does not occur.

Electrochemotherapy is an improved way of delivering a drug to a tumor cell. The electric field increases the permeability of the membrane, and the drug enters the tumor cell more easily. With the application of electrochemotherapy, the need for doses of chemotherapy for treatment is reduced, the number of side effects is reduced, the treatment profile is improved.

Bleomycin and cisplatin have been identified as drugs that could have improved electrochemotherapy. Studies with bleomycin have shown that it has a 50% improved effect when administered with electrochemotherapy, compared to self-administration.

Gene therapy is a new approach to treating tumors. It can be used to correct a loss of function caused by a mutation or to express a deficient gene product at the physiological level.

The thesis is deposited in the Central Library of the University of Zagreb Faculty of Pharmacy and Biochemistry.

Thesis includes: XX pages, XX figures, XX tables and XX references. Original is in Croatian language.

Keywords: Tumor, electric field, electroporation, electropermeabilization, electrochemotherapy, gene therapy, irreversible electroporation, reversible electroporation

Mentor: **Erim Bešić, Ph.D.** *Assistant Professor* University of Zagreb Faculty of Pharmacy and Biochemistry

Reviewers: **Erim Bešić, Ph.D.** *Assistant Professor*; University of Zagreb Faculty of Pharmacy and Biochemistry  
**Mario Gabričević, Ph.D.** *Associate Professor*; University of Zagreb Faculty of Pharmacy and Biochemistry  
**Tin Weitner, Ph.D.** *Assistant Professor*; University of Zagreb Faculty of Pharmacy and Biochemistry

The thesis was accepted: May 2010.



