

- a mechanism for integrating local and systemic responses in the activation of bone remodeling. *Bone*, 2001;28:507-12.
10. Dixon SJ, Sims SM. P2 purinergic receptors on osteoblasts and osteoclasts: Potential targets for drug development. *Drug Dev Res* 2000;49:187-200.
 11. Schofl C, Cuthbertson KS, Walsh CA et al. Evidence for P2-purinergic receptors on human osteoblast-like cells. *J Bone Miner Res* 1992;7:485-91.
 12. Boarder MR, Weisman GA, Turner JT et al. G protein-coupled P2 purinergic receptors: from molecular biology to functional responses. *Trends Pharmacol Sci* 1995;16:133-9.
 13. Maier R, Glatz A, Mosbacher J et al. Cloning of P2Y6 cDNAs and identification of a pseudogene: comparison of P2Y receptor subtype expression in bone and brain tissues. *Biochem Biophys Res Commun* 1997;240:298-302.
 14. Nakamura E, Uezono Y, Narusawa K et al. ATP activates DNA synthesis by acting on P2X receptors in human osteoblast-like MG-63 cells. *Am J Physiol Cell Physiol* 2000;279:C510-9.
 15. Dixon CJ, Bowler WB, Walsh CA et al. Effects of extracellular nucleotides on single cells and populations of human osteoblasts: contribution of cell heterogeneity to relative potencies. *Br J Pharmacol* 1997;120:777-80.
 16. Buckley KA, Golding SL, Rice JM et al. Release and interconversion of P2 receptor agonists by human osteoblast-like cells. *FASEB J* 2003;17:1401-10.
 17. Jones SJ, Gray C, Boyde A et al. Purinergic transmitters inhibit bone formation by cultured osteoblasts. *Bone* 1997;21:393-9.
 18. Doty SB, Schofield BH. Metabolic and structural changes within osteocytes of rat bone. I: Talmage RV, Munson PL, eds. *Calcium, parathyroid hormone and the calcitonins*. Amsterdam: Excerpta Media, 1972: 353-64.
 19. Hoebertz A, Mahendran S, Burnstock G et al. ATP and UTP at low concentrations strongly inhibit bone formation by osteoblasts: a novel role for the P2Y2 receptor in bone remodeling. *J Cell Biochem* 2002;86:413-9.
 20. Kaplan AD, Reimer WJ, Feldman RD et al. Extracellular nucleotides potentiate the cytosolic Ca²⁺, but not cyclic adenosine 3', 5'-monophosphate response to parathyroid hormone in rat osteoblastic cells. *Endocrinology* 1995;136:1674-85.
 21. Jorgensen NR, Henriksen Z, Brot C et al. Human osteoblastic cells propagate intercellular calcium signals by two different mechanisms. *J Bone Miner Res* 2000;15:1024-32.
 22. Buckley KA, Hipskind RA, Gartland A et al. Adenosine triphosphate stimulates human osteoclast activity via upregulation of osteoblast-expressed receptor activator of nuclear factor-kappaB ligand. *Bone* 2002;31:582-90.
 23. Morrison MS, Turin L, King BF et al. ATP is a potent stimulator of the activation and formation of rodent osteoclasts. *J Physiol* 1998;511:495-500.
 24. Steinberg TH, Jorgensen NR, Bong JS et al. P2-mediated responses in osteoclasts and osteoclast-like cells. *Drug Dev Res* 2000;49.
 25. Rabadjija L, Brown EM, Swartz SL et al. H(+)-stimulated release of prostaglandin E2 and cyclic adenosine 3',5'-monophosphoric acid and their relationship to bone resorption in neonatal mouse calvaria cultures. *Bone Miner* 1990;11:295-304.
 26. Chiozzi P, Sanz JM, Ferrari D et al. Spontaneous cell fusion in macrophage cultures expressing high levels of the P2Z/P2X7 receptor (published erratum appears in *J Cell Biol* 1997 Oct 20;139:following 571). *J Cell Biol* 1997;138:697-706.
 27. Murgia M, Pizzo P, Steinberg TH et al. Characterization of the cytotoxic effect of extracellular ATP in J774 mouse macrophages. *Biochem J* 1992;288:897-901.
 28. Ke HZ, Qi H, Weidema AF et al. Deletion of the P2X7 nucleotide receptor reveals its regulatory roles in bone formation and resorption. *Mol Endocrinol* 2003;17:1356-67.
 29. Walther MM, Kragel PJ, Trahan E et al. Suramin inhibits bone resorption and reduces osteoblast number in a neonatal mouse calvarial bone resorption assay. *Endocrinology* 1992;131:2263-70.
 30. Farsoudi KH, Pietschmann P, Cross HS et al. Suramin is a potent inhibitor of calcemic hormone- and growth factor-induced bone resorption in vitro. *J Pharmacol Exp Ther* 1993;264:579-83.
 31. Yoneda T, Williams P, Rhine C et al. Suramin suppresses hypercalcemia and osteoclastic bone resorption in nude mice bearing a human squamous cancer. *Cancer Res* 1995;55:1989-93.

Eksperimentel kræftbehandling med elektrokemoterapi, elektrokemoimmunoterapi og elektrogentransfektion

1. reservelæge Julie Gehl

Herlev Amtssygehus, Onkologisk Afdeling

Det er svært nok at udtale elektroporation, og situationen er ikke blevet nemmere efter elektrokemoterapi, elektrokemoimmunoterapi og nu elektrogentransfektion er kommet på banen. Her følger en forklaring på disse nye begreber i dansk eksperimentel kræftbehandling.

Hvad er elektroporation?

En cellemembran har en vis elektrisk kapacitans. Ved elektroporation påtrykkes et elektrisk felt udefra, så membranens kapacitans overstiges, hvorved membranen midlertidigt destabiliseres og bliver permeabel (**Figur 1**). Elektroporation er en reversibel proces, hvor cellemembranens integritet genskabes i løbet af få minutter. Elektroporation anvendes til at introducere

ioner, farvestoffer, farmaka, antistoffer, oligonukleotider, RNA og DNA - kort sagt molekyler, der har det til fælles, at de vanskeligt af sig selv finder vej over cellemembranen [1].

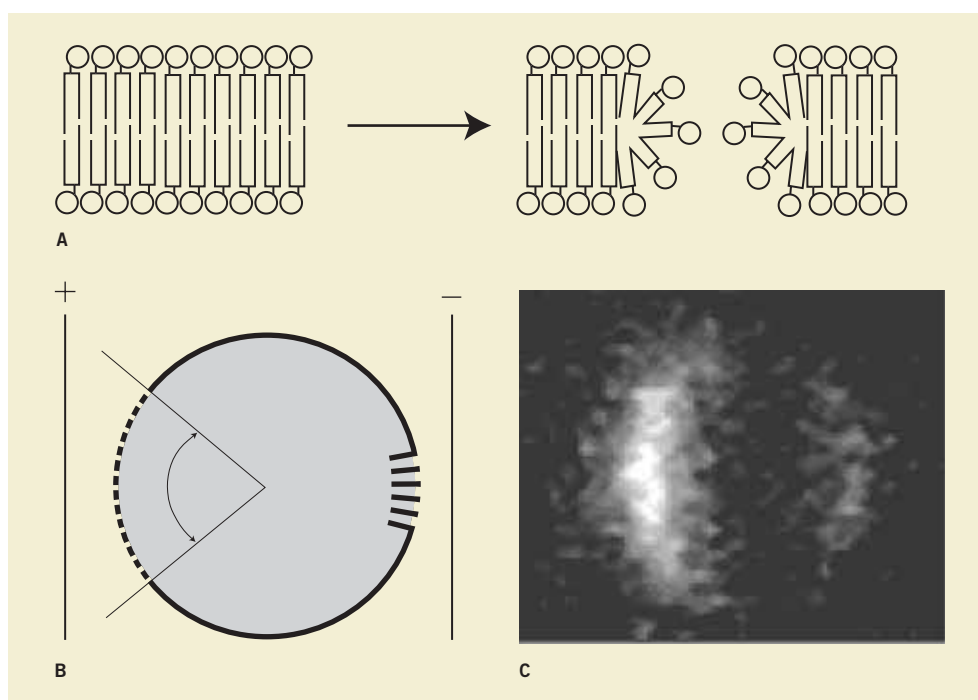
De elektriske pulser, som anvendes, kan elektronisk tilrettes til firkantede pulser. Dermed kan pulsamplituden uafhængigt reguleres i forhold til pulslængden. Dette har stor betydning, idet et større område af cellemembranen permeabiliseres ved høj amplitude, mens f.eks. DNA transporteres bedst ved lange pulser [1]. Således anvendes høj amplitude, hvis målet er influks af små molekyler (f.eks. kemoterapi), og en kombination med elektroforetisk virkende pulser, hvis målet er gentransfektion. En pulsserie er afviklet i løbet af få sekunder. Typisk anvendes der til elektrokemoterapi otte pulser a 0,1 ms med 1 kV pr. cm (elektrisk spænding målt i V/afstand mellem elektroder målt i cm), mens man ved DNA-transfektion anvender en enkelt permeabiliserende puls og derefter en elektroforetisk virkende puls på f.eks. 0,4 s med 0,1 kV pr. cm.

Oftest anvendes der elektroder med en afstand på under

VIDENSKAB OG PRAKSIS | STATUSARTIKEL

Figur 1. A: Når et eksternt appliceret elektrisk felt overstiger cellemembranens kapacitans, trænger vand ind i lipidlaget, og membranen bliver permeabel. Permeabiliseringen foregår på under et sekund, mens genetablering af membranens integritet sker over minutter [1].

B: Illustration af elektroporation af en celle. Til venstre for cellen ses den positive elektrode og til højre den negative elektrode. På grund af cellens negative hvilepotentiale vil membranen først permeabiliseres ved den cellepol, der vender mod den positive elektrode, efterfølgende (og i mindre omfang) ved den pol, der vender mod den negative elektrode. Det areal af celleoverfladen, som permeabiliseres, er proportionalt med pulsamplituden. **C:** En celle permeabiliseret under tilstedeværelse af propidiumiodid, elektroder placeret som vist i billedet til venstre (fra [2], figur fra [1], med tilladelse).



Figur 2. Patient med dissemineret malignt melanom og ulcererende kutane metastaser i hovedbunden. Patienten havde gener i form af smerter og blødning og følte sig i forhold til omgivelserne synligt stigmatiseret af sin kræftsygdom. Patienten blev behandlet med pallierende elektrokemoterapi. Der er givet en enkelt dosis intravenøs bleomycin, og efterfølgende foretaget elektroporation. **A:** Før behandling. **B:** Fire uger efter behandling. Der ses skorpedannelse, der persisterer i flere uger. Der anses spor efter nålene, idet dele af elektroden har været placeret i normalvæv for at få hele tumorperiferien med. **C:** Seks måneder efter behandling. Anvendelse af elektrokemoterapi til ulcererende kutane metastaser er tidligere beskrevet i [4].

1 cm. Til gengæld tager en enkelt puls-sekvens få sekunder, og elektroderne kan flyttes, så et større område kan behandles. Der anvendes enten pladeelektroder, der trykkes ned over behandlingsområdet, eller nåleelektroder, som stikkes ned i tumoren. Ved de elektriske pulser opstår der en kortvarig kontraktion af den underliggende muskulatur. For at undgå smerte i forbindelse med pulserne skal indgrebet foregå i lokalanæstesi.

Klinisk anvendelse af elektroporation

På nuværende tidspunkt arbejdes der med elektroporation til klinisk anvendelse på Onkologisk Afdeling, Amtssygehuset i Herlev, som det eneste sted i landet. Nedenstående behandlingstilbud foregår i dette regi.

Elektrokemoterapi

Ved elektrokemoterapi forstås brug af elektroporation til at øge den intracellulære koncentration af kemoterapi [3]. Typisk an-

vendes der bleomycin, der er et relativt stort, hydrofilt og ladet molekyle, som under normale omstændigheder kun vanskeligt passerer cellemembranen. Det virker til gengæld meget effektivt, når det kommer ind: Hvert molekyle kan som et enzym foretage 10-15 DNA-strengsbrud [3]. Ved elektroporation øges cytotoxiciteten 300-700 gange, og derfor kan elektrokemoterapi i princippet bruges som engangsbehandling. Også cisplatin og carboplatin kan anvendes, mens toksiciteten af lipofile stoffer som f.eks. daunorubicin ikke øges, idet disse stoffer let kommer over den intakte cellemembran.

Til lokal behandling af generende kutane og subkutane tumorer kan elektrokemoterapi være et behandlingsalternativ (**Figur 2**). Man udnytter her, at man i et lokalt område, der er begrænset af elektrodernes placering, kan øge kemoterapiens cytotoxiske virkning flere hundrede gange. Da øgningen i cytotoxicitet er så udtalt, virker behandlingen også ved kræftsygdomme, der under normale omstændigheder ikke respon-

VIDENSKAB OG PRAKSIS | STATUSARTIKEL

derer på kemoterapi, og hos patienter, hvor man har afstået fra yderligere kemoterapi som følge af behandlingssvigt. Elektrokemoterapi kan også anvendes i områder, hvor der tidligere er givet strålebehandling.

Intravenøs bleomycin i vanlig dosering har begrænsede bivirkninger, til gengæld kan patienten lokalt i det område, hvor der udføres elektroporation, opnå komplet remission af tumorer ved en engangsbehandling. I tidligere studier er der beskrevet komplette remissionsrater (af lokale tumorer) ved engangsbehandling på op til 90% [3].

På nuværende tidspunkt pågår der en protokollert undersøgelse, hvor pallierende elektrokemoterapi tilbydes til patienter med en hvilken som helst cancerdiagnose og generende kutane/subkutane metastaser på op til 3 cm i størrelse. Patienterne får bleomycin enten intratumoralt eller intravenøst. Behandlingen foregår ambulant og i lokalanæstesi. Skal mange kutane metastaser behandles, kan man dog overveje en kortvarig universel anæstesi af hensyn til den totale indgift af lokalanæstetikum. I og med at der i princippet er tale om en engangskemoterapi, vil dette kunne forsvares også i palliativt øjemed.

Undersøgelsen er et led i et europæisk projekt, finansieret via EU's femte rammeprogram, hvor op til 200 patienter tilbydes behandling med elektrokemoterapi som palliation for kutane/subkutane metastaser. Som et led i projektet skal der udarbejdes fælles retningslinjer for klinisk anvendelse af elektrokemoterapi og uddannelsesprogram for europæiske læger, der ønsker at lære at anvende teknikken.

Elektrokemoimmunterapi

Elektrokemoimmunterapi er anvendelsen af elektrokemoterapi til at skabe et tumorlysat i patienten med henblik på anvendelse i immunologisk behandling. Bleomycin injiceres direkte intratumoralt og efterfølgende elektroporeres der. Dette fører til et omgående celledrab af i princippet samtlige tumorceller i metastasen. Hensigten er, at elektrokemoterapiområdet skal fungere: 1) som et »faresignal«, som kan føre til aktivering af immunsystemet, og 2) vil kunne fungere som en vaccination, idet der vil kunne optages talrige antigener fra de dræbte tumorceller til brug for immunsystemets genkendelse af de maligne celler andre steder i organismen.

I en nyligt afsluttet protokollert undersøgelse med patienter med dissemineret malignt melanom behandledes op til fem kutane/subkutane metastaser med elektrokemoterapi. Herefter stimuleredes immunsystemet med lavdosis interleukin 2 indsprøjtet omkring behandlingsområdet daglig i de følgende tre uger. Patienterne fik interleukin 2-sprøjter til selvadministration og blev set til kontrol en gang ugentlig.

Teorien bag undersøgelsen er, at de antigener, som præsenteres for immunsystemet ved den pludselige død af cancerceller i et lokaliseret område, kan give anledning til et immunrespons, som ved yderligere stimulation med interleukin-2 kan give anledning til et generelt immunrespons, der igen kan resultere i en systemisk antineoplastisk effekt. I samarbejde med

Tumor Immunologisk Forskningsgruppe på Kræftens Bekæmpelse er den immunologiske funktion af perifert cirkulerende lymfocytter og lymfocytter isoleret fra biopsier fra patienter i behandling blevet undersøgt. Resultaterne viser, at der under behandling opstår kloner af T-lymfocytter, der generer melanom-antigener, og i en biopsi fra en responderende patient er T-lymfocytter fra en nyinduceret melanom-specifik klon identificeret [5].

Der blev behandlet 36 patienter med dissemineret malignt melanom, heraf har fire haft et systemisk respons (en komplet remission og tre partielle). Bivirkningerne ved behandlingen er begrænsede, og der er ikke behov for indlæggelse under behandling.

Elektrogentransfektion

Ved elektrogentransfektion anvendes de elektriske pulser både til at destabilisere membranen og til at udøve en elektroforetisk effekt på det stærkt negativt ladede DNA. Således vil DNA transporteres mod den positive elektrode og kan passere en cellemembran, såfremt denne er gjort permeabel [1].

Der har været store forhåbninger til virusbaseret genterapi, men denne behandlingsstrategi har i klinisk praksis vist sig at være problematisk, blandt andet som følge af uønskede immunologiske reaktioner på virus [6]. Der er derfor nu betydelig interesse i at forsøge at komme videre med genterapi uden brug af virus. Elektroporation er en af flere mulige metoder til nonviral transfektion.

Ved elektroporation integreres det transfekterede gen ikke i værtscellens genom, men udtrykkes alligevel. Ved celledeling vil det overførte DNA dog ikke replikeres. Derfor vil expression ved transfektion til væv med hurtig omsætning af celler, f.eks. tumorbæve, være kortvarig. Til gengæld kan man ved transfektion til muskeltvæv opnå meget langvarig expression af et overført gen, idet myocytter har lang levetid [7]. Elektrogentransfektion er i dyreeksperimentelle studier påvist at være effektiv i en lang række væv: hjerne, hjerte, lunge, lever, hud, skeletmuskulatur og en række tumorer [1]. Ved transfektion af blot en mindre mængde muskeltvæv kan der opnås terapeutiske niveauer af proteiner, som f.eks. erythropoietin (EPO) eller antiangiogenetiske faktorer [8]. Ved placeringen af elektroderne kan man ganske præcist beslutte, hvilket væv der skal transfekteres, og hvor stort et område man ønsker at transfektere.

På Onkologisk Afdeling, Amtssygehuset i Herlev påbegyndes nu et klinisk forsøg med elektrogentransfektion til kutane/subkutane tumorer hos kræftpatienter. Der vil i dette første forsøg være tale om et markørgen uden terapeutisk betydning transfekteret til patienter, som i forvejen har fået planlagt kirurgisk fjernelse af de tumorer, som transfekteres. Det er håbet på længere sigt at bane vej for anvendelse af elektrogentransfektion til brug for terapeutiske gener.

Der er flere mulige fremtidige anvendelser af elektrogentransfektion. For det første kan man overveje transfektion til

VIDENSKAB OG PRAKSIS | STATUSARTIKEL

muskelvæv med henblik på produktion af protein, f.eks. erythropoietin eller en antiangiogenetisk faktor. For det andet kan man overveje transfektion til tumorer med henblik på at stimulere et immunologisk respons eller for at hæmme tumorvækst lokalt. I forskningsøjemed vil teknikken tillige kunne anvendes til at afprøve hypoteser, idet man efter transfektion af kutane tumorer vil kunne vurdere effekten af nye behandlingsstrategier. Et nyt kapitel afledt af ovenstående åbner sig, når det gælder intervention med oligonukleotider og *antisense* RNA. Her forsøger man at hæmme gener, der udtrykkes i f.eks. cancerceller ved hjælp af molekyler, der specifikt hæmmer ekspresionen af det uønskede gen, f.eks. et onkogen [9].

Endelig vil man kunne overveje elektrogentransfektion til vaccinationsbrug [10], f.eks. ved transfektion til hud eller tumorvæv. Vaccination ved denne metode ville i princippet også kunne bruges ved nonmaligne sygdomme, og et særligt perspektiv er, at DNA er et meget stabilt molekyle, hvorfor metoden vil være velegnet til vaccination i områder af verden, hvor opbevaring af vacciner under kølige forhold kan være et vanskeligt problem.

Konklusion

Elektroporation anvendes allerede nu som led i eksperimentel kræftbehandling, dels til behandling af lokale tumorer, dels som led i immunoterapi. Elektroporation kan fremover få betydning som led i anvendelse af molekylærbiologiske behandlingsstrategier. Endvidere vil teknikken muligvis kunne udvikles til brug hos patienter med ikkemaligne sygdomme, f.eks. syndromer med manglende produktion af specifikke proteiner. Endelig vil vaccination ved hjælp af elektroporation kunne få betydning ved kræftbehandling, men også i en række andre sammenhænge.

Korrespondance: *Julie Gehl*, Onkologisk Afdeling, Amtssygehuset i Herlev, DK-2730 Herlev. E-mail: juge@herlevhosp.kbhamt.dk

Antaget: 29. juli 2004

Interessekonflikter: Ingen angivet

Taksigelser: Tak til Onkologisk Afdeling, Amtssygehuset i Herlev, som er partner i to projekter finansieret af EU's femte rammeprogram: Cliniporator (QLK3-1999-00484) og European Standard Operating Procedures for Electrochemotherapy and Electrogenetherapy (ESOPE, QLK3-2002-02003). Disse to projekter omhandler konstruktion og afprøvning af nyt apparatur til brug for elektrokemoterapi og elektrogenterapi til klinisk anvendelse samt udarbejdelse af retningslinjer for klinisk anvendelse og uddannelse af sundhedspersonale. Projekterne er under ledelse af *Lluis M. Mir*, Institut Gustave-Roussy, Frankrig. Øvrige deltagende grupper er fra Belgien, Frankrig, Irland, Italien, Slovenien, Sverige og Tyskland.

Litteratur

- Gehl J. Electroporation: theory and methods, perspectives for drug delivery, gene therapy and research. *Acta Physiol Scand* 2003;177:437-47.
- Gabriel B, Teissie J. Direct observation in the millisecond time range of fluorescent molecule asymmetrical interaction with the electroporabilized cell membrane. *Biophys J* 1997;73:2630-7.
- Gothelf A, Mir LM, Gehl J. Electrochemotherapy: results of cancer treatment using enhanced delivery of bleomycin by electroporation. *Cancer Treat Rev* 2003;29:371-87.
- Gehl J, Geertsen P. Efficient palliation of hemorrhaging malignant melanoma skin metastases by electrochemotherapy. *Melanoma Res* 2000;10:585-9.
- Andersen MH, Gehl J, Reker S et al. Dynamic changes of specific T cell responses to melanoma correlate with IL-2 administration. *Seminars in Cancer Biology* 2003;13:449-59.

- Dobbelstein M. Virusses in therapy – royal road or dead end? *Vir Res* 2003;92:219-21.
- Mir LM, Bureau MF, Gehl J et al. High efficiency gene transfer into skeletal muscle mediated by electric pulses. *Proc Natl Acad Sci USA* 1999;96:4262-7.
- André F, Mir LM. DNA electrotransfer: its principles and an updated review of its therapeutic applications. *Gene Therapy* 2004;11(suppl 1):s33-42.
- Bergan R, Hakim F, Schwartz GN et al. Electroporation of synthetic oligodeoxynucleotides: a novel technique for ex vivo bone marrow purging. *Blood* 1996;88:731-41.
- Widera G, Austin M, Rabussay D et al. Increased DNA vaccine delivery and immunogenicity by electroporation in vivo. *J Immunol* 2000;164:4635-40.