

1. Raziskovalna organizacija (*Research organisation*):

Univerza v Ljubljani, Veterinarska fakulteta

2. Ime in priimek mentorja (*Name and surname of a mentor*):

Nataša Tozon

3. Področje znanosti iz šifrantu ARRS (*Primary research field*):

4.04 Biotehniške vede / Veterina

4. Kontaktni e-naslov mentorja (*Contact of a mentor*):

natasa.tozon@vf.uni-lj.si

5. Kratek opis programa usposabljanja (*Short description of the program*):

Elektroporacija je metoda, pri kateri z uporabo kontroliranih električnih pulzov dosežemo prehodno povečano prepustnost celične membrane, s čimer lahko določenim molekulam, za katere membrana sicer ni prepustna, omogočimo vstop v celico. *In vivo* se ta metoda uporablja pri dveh novih načinih zdravljenja onkoloških pacientov, elektrokemoterapiji (ECT), pri kateri s pomočjo elektroporacije povečamo prepustnost celične membrane za različne kemoterapevtike in genskemu elektrotransferju (GET), pri katerem na ta način omogočimo terapevtskim plazmidom vstop v celico. Kombinacija ECT in GET s plazmidom, ki kodira zapis za interlevkin-12 (IL-12), je že bila opisana kot uspešna metoda zdravljenja manjšega števila spontanih novotvorb pri psih. Glede na dosedanje vzpodbudne rezultate teh kliničnih študij vsekakor lahko pričakujemo, da se bo ta način zdravljenja še bolj razširil v klinično prakso. Številni parametri IL-12 GET in predvsem dejanski imunski odziv nanjo so še dokaj neraziskani, zlasti v klinični praksi, kar negativno vpliva na izid zdravljenja. Zato je smiselno, da trenutni protokol terapije nadgradimo in izboljšamo z namenom še bolj učinkovitega in varnega zdravljenja.

V ta namen bi poskušali najti klinično zaznavne kratkoročne in dolgoročne napovedne dejavnike učinkovitosti terapije. Pri IL-12 GET naj bi namreč dosegli sistemski učinek terapije z aktivacijo imunskega sistema preko stimulacije citotoksičnih T limfocitov, ki naj bi bili ključnega pomena v boju proti raku. Citotoksični T limfociti ciljne tumorske celice eliminirajo preko perforina in granzima B, ki v končni fazi povzročita programirano celično smrt tumorske celice – apoptozo. Opisano indukcijo imunskega odgovora lahko spremljamo z različnimi metodami, med katere sodi tudi metoda pretočne citometrije, pri kateri lahko z uporabo specifičnih protiteles medsebojno ločujemo različne tipe imunskih celic v periferni krvi. Drug način spremljanja odgovora na tovrstno gensko terapijo pa so imunohistološke preiskave tumorskega tkiva v različnih časovnih okvirjih po zdravljenju, ki bi nam omogočile natančnejšo razjasnitev mehanizem protitumorskega delovanja te vrste genske terapije.

Eden od možnih napovednih dejavnikov uspešnosti terapije bi lahko bila tudi prekinitev pretoka krvi v tumor, saj dosedanje raziskave na predkliničnih modelih kažejo, da ima elektroporacija negativni vpliv na perfuzijo zdravljenih tumorjev. Že v nekaj minutah po izvedbi uspešne elektroporacije se

lokalni dotok krvi v tumor signifikantno zmanjša, nato se v naslednjih nekaj urah delno vzpostavi, vendar ne doseže osnovnega nivoja. Ta učinek je posledica refleksne vazokonstrikcije zaradi reakcije na elektroporacijo mišičnih in/ali vaskularnih endotelijskih celic ter vpliva elektroporacije na citoskelet. Predpostavlja se, da zmanjšanje perfuzije v zdravljeno tumorsko tkivo pripomore k protitumorskemu učinku terapij, ki bazirajo na elektroporaciji.

Namen raziskovalnega dela kandidata bo torej oceniti aplikativno vrednost določenih kratkoročnih in dolgoročnih prognostičnih dejavnikov pri zdravljenju spontanij tumorskih psov s kombinacijo ECT in IL-12 GET s težiščem na preučevanju indukcije lokalnega in sistemskega imunskega odgovora in lokalnega vpliva na prekinitev pretoka krvi v tumor ter antiangiogenezo. Končni namen bo optimizacija protokola za izvajanje te vrste terapije v klinični praksi z namenom čim boljše protitumorske učinkovitosti, kar bo omogočilo še boljše klinične rezultate in translacijo v humano medicino.

ANG

Electroporation is a method in which controlled electric pulses are used to transiently increase the permeability of the cell membrane, allowing intracellular uptake of different molecules, which normally can not pass the cell membrane. *In vivo* it is used as a platform technology for two prospective new anticancer treatments, electrochemotherapy (ECT), where electric pulses are used to enhance intracellular entry of the cytotoxic agents and gene electrotransfer (GET). ECT combined with GET with plasmid encoding interleukin-12 (IL-12) has already been described for the treatment of a small number of naturally occurring spontaneous canine neoplasms with encouraging results.

Based on current promising results of our clinical studies employing IL-12 GET in combination with ECT in dogs with different spontaneous tumors, we can expect that this type of anticancer therapy will find its way into veterinary clinical practice. But unfortunately, many different parameters of the optimal protocol for such therapy as well as actual host's immune response to IL-12 GET still remain poorly understood, leading to suboptimal clinical outcome. Therefore it is essential to upgrade and improve the current treatment protocol with the intention to optimize its efficacy and safety.

Therefore we would like to evaluate clinically significant short- and long-term prognostic factors indicating systemic response to the therapy in the treated patient. Important feature of ECT and IL-12 GET is the elicitation of the immune response, which is believed to have systemic effects. IL-12 stimulates cytotoxic T lymphocytes, which are crucial in cancer elimination as they target the tumor cells and eliminate them by the action of perforin and granzyme B, enabling apoptotic tumor cell death. Such induction of immune response can be detected using different techniques, including flow cytometry, which utilizes gating different types of peripheral blood mononuclear cells using specific antibodies. Another possibility to investigate anticancer effect of this type of therapy is immunohistochemical analysis of treated tumor tissue, allowing us in-depth insight into mechanisms involved with tumor destruction.

One of possible prognostic factors for efficacy of the treatment could also be reduction of local blood flow to the treated tumor. Current preclinical data suggests that electroporation has profound and rapid effect on perfusion of exposed tissue. The blood flow is significantly reduced within minutes of successful electroporation with a partial recovery within a few. This effect is attributed to reflex vasoconstriction of the tumor-supplying arterioles as a reaction to electroporation of the

muscle and/or vascular endothelial cells and due to effect of electroporation on the cytoskeleton. It is believed that this vascular disrupting effect of ECT actually enhances its anticancer effect.

The purpose of the research work will be to evaluate the clinical value of different short- and long-term prognostic factors of combined ECT and IL-12 GET in treatment of spontaneous tumors in dogs. The focus of the research will be on evaluation of local and systemic induction of the patient's immune response, antiangiogenesis and vascular disruptin effects of electroporation. The final goal will be optimization of the treatment protocol for this type of anticancer therapy in clinical setting with the intention of maximizing its effectiveness resulting in better clinical outcome and possible translation into human medicine.