

Določevanje  
učinkovitosti terapij  
genskega elektroprenosa  
na mišjih tumorjih CT26  
z orodjem DRAP

**AVTOR:** Lucijan Škof, 3.b

**MENTOR:** dr. Tim Božič

**SOMENTORICA:** Barbka Černe Gresl

PODROČJE: Biologija

Marec 2024, Gimnazija Vič, Tržaška 72, Ljubljana

## KAZALO

### Vsebina

1.	POVZETEK .....	3
2.	UVOD .....	3
3.	TEORETIČNI DEL.....	4
3.1.	Rak .....	4
3.2.	Radioterapija .....	4
3.3.	Genska terapija.....	5
3.3.1.	Molekularni pristop .....	5
3.3.2.	Imunološki pristop.....	6
3.3.3.	Kemokini .....	6
3.4.	Dostavni sistemi .....	7
3.4.1.	Virusni vektorji.....	7
3.4.2.	Nevirusni vektorji .....	7
3.4.3.	Genski elektroprenos .....	8
3.5.	Modeli PDX .....	9
4.	CILJI IN HIPOTEZE.....	10
4.1.	Cilji: .....	10
4.2.	Hipoteze: .....	10
5.	METODE.....	11
5.1.	Postopek genske terapije .....	11
5.1.1.	Plazmidi .....	11
5.1.2.	Celične kulture.....	11
5.1.3.	Miši .....	11
5.1.4.	Postopek genskega elektroprenosa .....	11
5.1.5.	Obsevanje .....	12
5.2.	Program R.....	12
5.3.	DRAP .....	12
5.3.1.	1AN .....	13
5.3.2.	T1N .....	13
5.3.3.	TA1.....	13
5.3.4.	TAN .....	13
5.3.5.	Izračun TGI.....	14
6.	RAZISKOVALNI POSKUS .....	15
6.1.	Analiza s paketom DRAP.....	15
6.1.1.	Transformacija tabel.....	15

6.1.2. Funkcija DataSummary.....	16
6.1.3. Funkcija plotVolumeGC.....	16
6.1.4. Funkcija RelativeChange.....	16
6.1.5. Statistična analiza.....	17
6.1.6. Permutacijski test.....	17
6.1.7. Stopnja zaviranja rasti tumorja.....	17
6.1.8. Analiza stopnje odziva na terapijo.....	18
7. REZULTATI.....	19
8. RAZPRAVA.....	24
9. ZAKLJUČEK.....	25
10. LITERATURA.....	26

## Slike in tabele

Slika 1: Shematski pregled molekularnega pristopa pri genskem zdravljenju raka.....	5
Slika 2: Shematski pregled imunološkega pristopa pri genskem zdravljenju raka.....	6
Slika 3: Razlaga delovanja funkcije transformiraj_tabelo().....	15
Slika 4: Vzorec originalne tabele, ki ga je potrebno transformirati v vzorec tabele, ki jo paket DRAP lahko uporabi.....	16
Slika 5: Primer uporabe funkcije DataSummary() na tabeli združena_tabela.....	16
Slika 6: Primer uporabe funkcije plotVolumeGC().....	16
Slika 7: Primer uporabe funkcije RelativeChange() in plotRC().....	16
Slika 8: Primer uporabe funkcije DRAnalysis() na podlagi različnih statističnih metod.....	17
Slika 9: Primer uporabe funkcije CompareGC() za permutacijski test.....	17
Slika 10: Primer uporabe funkcije TGI() za izračun stopnje zaviranja rasti tumorja.....	17
Slika 11: Primer nastavitve kriterijev za označevanje odziva na terapijo.....	18
Slika 12: Primer uporabe funkcij DRLevel(), DRLevelSummary(), plotDRLevel() in DRLevelAnalysis().	18
Slika 13: Grafa rezultatov zdravljenja z gensko terapijo.....	20
Slika 14: Grafa rezultatov zdravljenja z gensko terapijo v kombinaciji z obsevanjem.....	22
Slika 15: Graf TGI in graf analize odgovorov miši na terapijo.....	23
Tabela 1: Prikaz štirih tipičnih zasnov predkliničnih raziskav na modelih PDX - 1AN, T1N, TA1 in TAN.....	12

## 1. POVZETEK

Ključne besede: DRAP, genski elektroprenos, radioterapija

Paket DRAP znotraj programskega jezika R je bil razvit za analizo in primerjavo rezultatov terapij pri zdravljenju raka. V raziskovalni nalogi smo želeli ugotoviti, ali je novo razviti paket DRAP primeren model za določanje učinkovitosti različnih genskih terapij, ki temeljijo na genskem elektroprenosu.

V ta namen smo s paketom DRAP določevali protitumorski učinek genskega elektroprenosa plazmidov z zapisom za kemokin CCL5 ali CCL17 na mišjih tumorjih raka debelega črevesa CT26. S funkcijami določanja razlik v volumnu tumorja med testnimi skupinami miši in določanja stopnje odziva posamezne miši na terapijo znotraj paketa DRAP smo najprej določili učinkovitost dveh različnih protokolov genskega elektroprenosa z različnimi parametri električnih pulzov, in sicer protokola HV-LV in ECT. Čeprav so bile rastne krivulje tumorjev po terapiji primerljive ne glede na uporabljen protokol, je analiza stopnje odziva na terapijo pokazala boljše rezultate po genskem elektroprenosu z ECT pulzi v primerjavi s HV-LV pulzi.

V nadaljevanju smo določevali učinke genskega elektroprenosa plazmidov z zapisom za kemokin CCL5 ali CCL17 po ECT pulzih v kombinaciji z enkratnim (10 Gy) oziroma frakcioniranim (3x5 Gy) obsevanjem. Z enakim pristopom (s funkcijami kot opisano zgoraj) smo na podlagi zaostankov v rasti tumorjev in iz analize stopnje odziva na terapijo določili najučinkovitejšo kombinirano terapijo. Najučinkovitejša je bila kombinacija genskega elektroprenosa plazmida z zapisom za kemokin CCL5 in frakcioniranega obsevanja 3x5 Gy, ki je bila potrjena tudi z uporabo funkcije za izračun in prikaz stopnje zaviranja rasti tumorja. S tem smo pokazali, da je paket DRAP ustrezno orodje, ki omogoča hitro analizo za določanje razlik v učinkovitosti med posameznimi terapijami genskega elektroprenosa.

## 2. UVOD

Quanxue Li in sodelavci iz inštituta Shanghai Center for Bioinformation Technology so razvili paket DRAP za programski jezik R z namenom hitre, bolj primerne in standardizirane analize rezultatov odziva tumorjev na zdravila pri modelih PDX (*angl.* Patient-Derived Xenograft – ksenotransplantacija iz bolnika), saj se za analizo tovrstnih modelov še vedno v veliki meri uporabljajo metode, razvite za analizo modelov CDX (*angl.* Cell Line-Derived Xenograft – ksenotransplantacija iz celične linije). Želeli smo preveriti, ali razviti paket DRAP predstavlja primerno metodo za primerjavo rastnih krivulj tumorjev po genski terapiji z genskim elektroprenosom. Raziskava paketa DRAP bi lahko prispevala k boljšemu razumevanju in optimizaciji imunskih genskih terapij ter omogočila natančnejšo napoved odziva tumorjev na te terapije, kar bi koristilo pri učinkovitejšem zdravljenju raka. Za raziskovalno temo na področju eksperimentalne onkologije v povezavi z modeliranjem (področje bioinformatike) sem se odločil na podlagi svojih izkušenj s programiranjem in z željo po združevanju dveh zanimivih in hitro razvijajočih področij (medicina in informatika). Z raziskovalno nalogo sem pridobil izkušnje, ki bi mi lahko pomagale tudi kasneje v morebitni raziskovalni karieri.

## 3. TEORETIČNI DEL

### 3.1. Rak

Rak je skupno ime za skupino bolezni za katere je značilna nenadzorovana in nenormalna rast celic. Rakave celice lahko prodirajo v okoliško tkivo, s krvjo in limfo pa lahko zaidejo tudi v druge dele telesa, kjer nastanejo zasevki oziroma metastaze rakavega tkiva. Tumor označuje katerokoli nenormalno maso tkiva, lahko je malignen (rakotvoren) ali benignen (nerakotvoren). Le maligni tumorji imajo sposobnost širjenja v sosednja tkiva in tvorjenja metastaz [1], [2].

V Sloveniji živi več kot 120.000 ljudi, ki so kadarkoli zboleli zaradi ene od rakavih bolezni. Za rakom zboli letno okrog 16.000 Slovencev, umre pa jih več kot 6.000. Med najpogostejše rake v Sloveniji sodijo rak kože, debelega črevesa in danke, pljuč, dojke ter prostate. Kljub temu, da incidenca raka zmeroma raste, je največja pri starejših. Med vsemi rakavimi bolniki, zbolelimi leta 2019, je bilo 64 % starejših od 65 let. Ker se slovensko prebivalstvo stara, je že samo zaradi vedno večjega deleža starejših pričakovati, da se bo število novih primerov raka še povečalo [1], [3].

Danes vemo, da je polovica vseh rakov posledica načina življenja (prekomerno kajenje, nezdrava prehrana, alkohol, nezadostna telesna aktivnost) in učinkov dejavnikov iz okolja (bioloških, kemičnih in fizikalnih), poleg dejavnikov okolja pa je zelo pomembna genska pogojenost oz. nagnjenost k razvoju raka [1], [2]. Poleg preventive (zdrav način življenja) je zelo pomembno zgodnje odkrivanje bolezni s pomočjo presejalnih programov za odkrivanje raka in predrakavih sprememb, kot so na primer DORA, SVIT in drugi.

Pri zdravljenju raka se v veliki meri še vedno uporabljajo tako imenovani zlati standardi, med katere spadajo kirurška odstranitev tumorjev, zdravljenje z zdravili (kemoterapija, hormonska zdravila) in radioterapija [4]. Eden izmed novejših pristopov zdravljenja raka, ki je še v razvoju, pa je genska terapija.

### 3.2. Radioterapija

Eden izmed zlatih standardov, ki se pogosto uporablja v kombinaciji z gensko terapijo je radioterapija. Pri radioterapiji se za zdravljenje raka uporabljajo rentgenski žarki. Ti uničijo genetski material rakavih celic, kar onemogoči njihovo rast in delitev. Cilj radioterapije je tarčno zdraviti raka in pri tem poškodovati čim manj zdravih celic. Sodobne metode obsevanja usmerjajo žarke neposredno na tumor in s tem ščitijo zdrava tkiva pred visokimi odmerki sevanja [5].

Najpogostejša vrsta radioterapije je terapija z zunanjim obsevanjem [6]. Količina sevanja, ki se uporablja pri terapiji z obsevanjem, se meri v grejih (Gy) in se razlikuje glede na vrsto in stopnjo raka, ki ga zdravimo. Pri radioterapiji je tipičen odmerek sevanja za epiteljski tumor od 60 do 80 Gy, limfomi pa se zdravijo z 20 do 40 Gy [7].

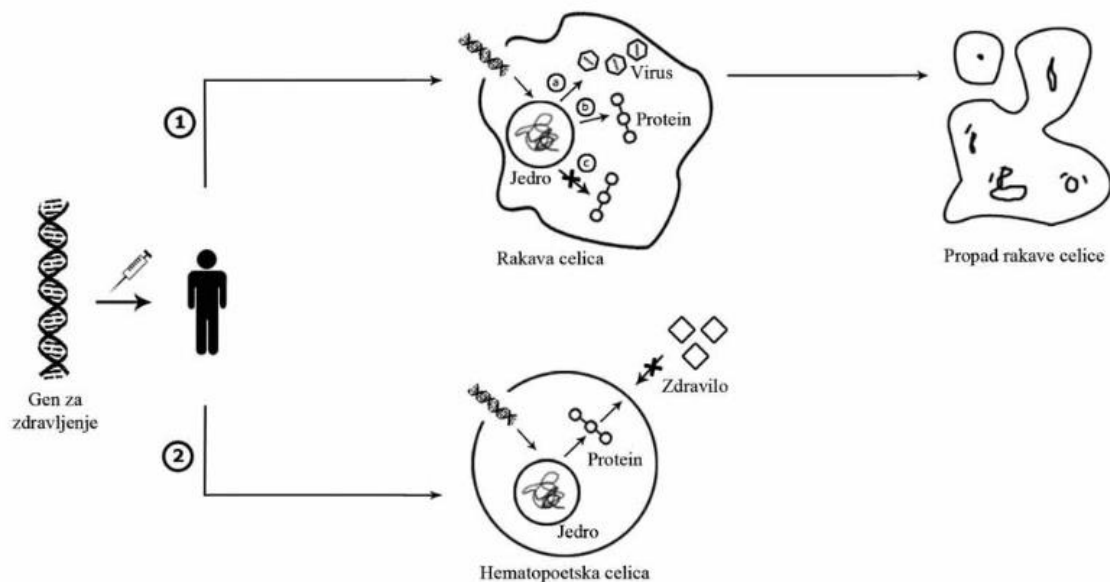
Celoten odmerek sevanja je najpogosteje frakcioniran (dovedenih je več posameznih zaporednih frakcij sevanja). Frakcioniranje omogoča zdravim celicam čas, da si opomorejo, saj so tumorske celice na splošno manj uspešne pri popravljanju med frakcijami. Frakcioniranje tudi omogoča, da tumorske celice, ki so bile med zdravljenjem v radiorezistentni fazi celičnega cikla, preidejo v občutljivo fazo cikla, preden je dovedeno naslednje sevanje. Prav tako se lahko hipoksične tumorske celice (imajo zmanjšano raven kisika), ki so bolj radiorezistentne, med frakcijami reoksigenirajo (se ponovno oskrbijo s kisikom) in postanejo ranljive za uničenje s sevanjem [8].

### 3.3. Genska terapija

Genska terapija vključuje uporabo genov za zdravljenje ali preprečevanje dednih genetskih bolezni, nalezljivih bolezni ter za zdravljenje raka [9]. Zaradi njene kompleksne narave genska terapija vsebuje različne pristope, njihova razdelitev pa je težka, ker se ti med seboj prepletajo. Ena izmed možnosti je delitev na molekularne in imunološke pristope [10]. Gensko zdravljenje raka v prvih fazah klinične uporabe verjetno ne bo uporabljeno kot samostojno zdravljenje, ampak v kombinaciji z zlatimi standardi, kot sta radioterapija ali kemoterapija, zaradi česar je potrebno gensko zdravljenje ustrezno prilagoditi [11].

#### 3.3.1. Molekularni pristop

Za tumorje je značilno spremenjeno izražanje nekaterih genov, za kar so lahko krive tudi mutacije. Te spremembe lahko izkoristimo za gensko zdravljenje z molekularnimi pristopi in tako na različne načine ciljamo onkogene (geni, ki lahko vodijo v nastanek raka), tumorje zaviralne gene (nadzorujejo delitev celic) ter gene vpletene v angiogenezo (tvorba novih žil iz že obstoječih) [12]. Poleg tega lahko za zdravljenje uporabimo tudi viruse, ki se selektivno razmnožujejo v rakavih celicah (onkolitični virusi) ali gene, ki pretvarjajo neaktivna zdravila v aktivna (samomorilski geni) [13], [14]. Cilj omenjenih pristopov je zaustavitev celičnega cikla ali aktivacija programirane celične smrti oziroma apoptoze [10].

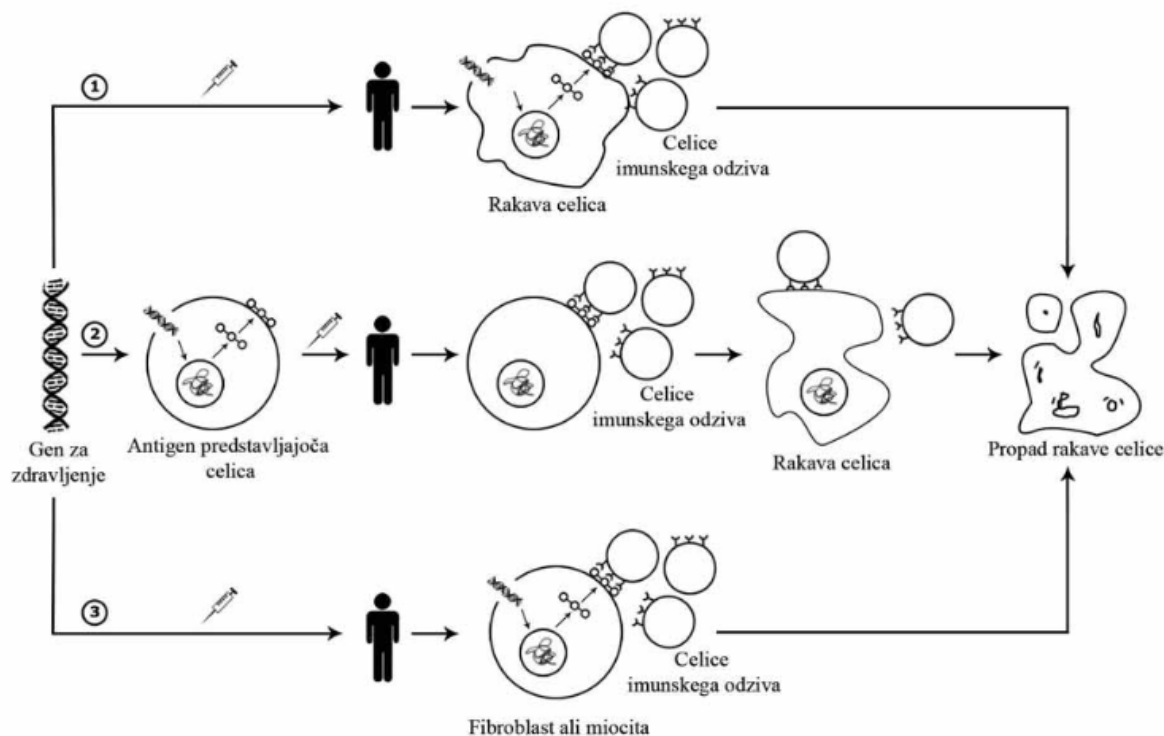


Slika 1: Shematski pregled molekularnega pristopa pri genskem zdravljenju raka. 1) V rakave celice lahko vnesemo gen za zdravljenje, ki inducira celično smrt zaradi razmnoževanja onkolitičnega virusa, zaradi izražanja tumorskega zaviralnega gena ali pa deluje kot encim za aktivacijo drugega zdravila oziroma inhibitorja angiogeneze. 2) Prav tako lahko terapevtski gen vnesemo v normalne (hematopoetske) celice, ki nato sintetizirajo protein za odpornost na zdravilo (Slika prirejena po [16]).

## 3.3.2. Imunološki pristop

Pri imunološkem pristopu je cilj spodbuditi bolnikov lasten imunski sistem za doseg terapijskega učinka. Poznamo različne možnosti imunološkega pristopa [10]:

- 1) prenos gena za imunostimulacijo molekulo (pri čemer se aktivirajo predvsem T limfociti in naravne celice ubijalke, ki napadejo tumor),
- 2) manipulacija antigen predstavljajočih celic, da so sposobne aktivno predstaviti tumorskega antigena T limfocitom,
- 3) neposredna DNA cepiva z antigen-kodirajočimi geni.



Slika 2: Shematski pregled imunološkega pristopa pri genskem zdravljenju raka. 1) V tumorske celice lahko vnesemo gen za imunostimulacijo molekulo, 2) z *in vitro* manipulacijo usposobimo antigen predstavljajoče celice, da so sposobne aktivno predstaviti tumorski antigen ali 3) neposredno vnesemo DNA cepiva z antigen-kodirajočimi geni (Slika prirejena po [16]).

## 3.3.3. Kemokini

Kemokini predstavljajo družino citokinov, sestavljenih iz majhnih signalnih proteinov. Nadzorujejo migracijo in pozicioniranje imunskih in neimunskih celic vzdolž njihovih koncentracijskih gradientov. Glede na položaj prvih dveh cisteinskih (C) ostankov v proteinskem zaporedju so kemokini razdeljeni v štiri glavne razrede: CC-, CXC-, C- in CX3C-kemokini. Kemokini imajo ključno vlogo pri homeostazi in igrajo pomembno vlogo tudi pri različnih boleznih [17]. Homeostatski kemokini uravnavajo zorenje in migracijo levkocitov, razvoj, obnovo tkiva in angiogenezo. Vnetni kemokini ustvarijo imunski odziv na mestih poškodbe pri različnih boleznih, kot je tudi rak [18]. Celice, ki tvorijo tumorsko mikrookolje (*angl.* tumor microenvironment – TME), izločajo številne kemokine, ki nato pritegnejo imunске celice na lokacijo tumorja, kjer spodbujajo napredovanje raka s preoblikovanjem TME ali izzovejo imunski odziv proti tumorskim celicam [19]. Tako klinične študije kot poskusi na živalih kažejo, da lahko nekateri kemokini pomagajo imunskemu sistemu prepoznati in ubiti tumorske celice [20], [21].

V CC razred kemokinov uvrščamo tudi vnetna kemokina RANTES/CCL5 in TARC/CCL17, ki dokazano povzročita povečano infiltracijo imunskih celic v tumor [19], [22]. Predklinične študije so pokazale, da

prekomerno izražanje CCL5 v tumorjih vpliva na infiltracijo T limfocitov in daljši zaostanek v rasti tumorja pri raku jajčnikov [23]. CCL5 sodeluje tudi pri aktivaciji limfocitov CD8+ T [24]. CCL5, ki ga proizvajajo naravne celice ubijalke znotraj TME, vpliva na kopičenje dendritičnih celic, kar spodbudi protitumorski odziv imunskega sistema z izpostavljanjem antigenov in aktivacijo T limfocitov [25], [26]. Povečano izražanje CCL5 so odkrili tudi pri raku možganov, glave in vratu, jeter, trebušne slinavke, debelega črevesa in danke, prostate in ustne votline, kar kaže na njegovo potencialno vlogo v diagnostiki raka [27], [28].

Kemokin CCL17 se stalno proizvaja v priželjcu in začasno v aktiviranih perifernih krvnih celicah [29]. CCL17 uravnava ravnovesje Th2 (vrsta T celic, ki sodelujejo pri humoralni imunosti) in Treg (regulatorne T celice z imunosupresivno funkcijo) celic pri okužbah, avtoimunskih motnjah in drugih patologijah, vključno z rakom [30]. Poleg tega ima CCL17 pomembno vlogo pri aktivaciji dendritičnih celic, ki spodbudijo odzive CD8+ T limfocitov [31]. V poskusih na miših z rakom debelega črevesa je dostava adenovirusnega vektorja z zapisom za CCL17 povzročila regresijo tumorja in specifično imunost [32]. Prav tako je bilo pri bolnikih z naprednim melanomom, ki so bili zdravljeni z imunoterapijo z dendritičnimi celicami, višje izražanje CCL17 povezano z večjo možnostjo preživetja [33].

### 3.4. Dostavni sistemi

V celice v kulturi ali v organizmu se transgeni vnašajo vključeni v nosilce ali vektorje. Vektorji, kot tudi transgeni, so deli nukleinskih kislin, ki poleg željenega gena vsebujejo še informacijo za regulatorne elemente, ki določajo, kdaj in v katerih vrstah celic bo prišlo do prepisovanja v njih vključenih genov ter signale za ohranitev v človeških celicah. Glede na izvor ločimo dve vrsti vektorjev - virusne in nevirusne [34].

#### 3.4.1. Virusni vektorji

Virusni vektorji so razviti iz virusov, ki so jim odstranili nekatere gene – povzročitelje virusnih bolezni, namesto njih pa je vstavljen gen, ki bi ga želeli vnesti v pacienta v postopku genskega zdravljenja. Poglavitna prednost virusnih vektorjev je učinkovit vnos v celice, slabosti pa so tveganje, da bi se v določenih okoliščinah lahko obnovila njihova funkcija povzročitelja bolezni, možnost intenzivnega imunskega odziva in nevarnost za raziskovalno osebje. Najpogosteje se uporabljajo vektorji, nastali iz retrovirusov in iz spremenjenega adenovirusa, sicer povzročitelja prehladov [35].

#### 3.4.2. Nevirusni vektorji

Nevirusni vektorji ali plazmidi so krožne molekule DNA, ki so bili sestavljeni v laboratoriju in prav tako kot virusni vektorji vsebujejo regulatorne elemente za izražanje genov in njihov obstoj v celicah. Poglavitna prednost plazmidov je manjša nevarnost za zdravje bolnikov in osebja, ki z njimi dela, glavna slabost pa je slabši vnos v celice v primerjavi z virusnimi vektorji. Vektorji imajo lastnosti, ki lahko določajo, v katerih vrstah celic bo prišlo do vnosa genov ter kdaj in kako dolgo se bo iz teh genov prepisoval željen protein [35]. V tej kategoriji za uporabo v genskem zdravljenju raka prevladujejo gola DNA kot posebna enota ter kationski lipidi in polimeri [36].



### 3.4.3. Genski elektroprenos

Kot eden izmed uspešnih dostavnih sistemov se je izkazal tudi genski elektroprenos (GET) z uporabo elektroporacije. Elektroporacija je tehnika, pri kateri se celice ali tkivo izpostavi zunanemu električnemu polju. Električni pulzi povzročijo povečanje transmembranske napetosti, kar pomeni, da se za kratek čas poveča prepustnost celične membrane. Tako je v celico mogoče vnesti molekule, ki jih membrana v normalnih pogojih ne bi prepuščala [37]. Na ta način lahko skozi začasne nanometriške pore vnesemo tudi željeni transgen.

Gre za kompleksen in večstopenjski proces, za uspešnost metode pa so potrebni naslednji koraki [37]:

- i. **Elektropermeabilizacija membrane** – dovajanje električnih pulzov na celico, ki povzročijo tvorbo začasnih por na membrani, kar omogoči prehajanje molekul.
- ii. **Elektroforetična migracija DNA proti membrani** – električni pulzi vplivajo na naboje DNA molekul in povzročijo njihovo gibanje proti elektropermeabilizirani membrani.
- iii. **Interakcija DNA z membrano** – pri interakciji se tvorijo kompleksi DNA, v katerih se molekule DNA začasno vežejo na membrano ciljnih celic
- iv. **Prenos DNA skozi membrano** – DNA molekule prehajajo skozi elektropermeabilizirano membrano, ki običajno ne bi bila prehodna.
- v. **Znotrajcelična migracija DNA skozi citoplazmo** – gosta mrežasta struktura citoplazme pomeni izjemno majhno mobilnost DNA, njena znotrajcelična pot pa je odvisna od procesov, ki jih sproža sama celica.
- vi. **Prehod DNA skozi jedrno ovojnico** – samo majhen delež DNA prečka jedrno ovojnico, vendar je to vseeno dovolj, da se sproži močno izražanje gena.
- vii. **Izražanje gena** – genetska informacija se uporabi za tvorjenje proteinov v celici.

Na učinkovitost genskega elektroprenosa vplivajo temperatura, parametri električnih pulzov, koncentracija DNA, sestava elektroporacijskega medija, velikost celice in njena sposobnost izražanja vnesenega gena. Poleg tega v *in vivo* okolju na učinkovitost GET vplivajo tudi mobilnost DNA v zunajceličnem matriksu, velikost plazmida in prevodnost tkiva [38], [39].

### 3.5. Modeli PDX

Glavna problema pri prenosu potencialnih zdravil v klinično prakso sta nizka stopnja uspešnosti novih učinkovin in majhna terapevtska korist odobrenih zdravil. Trenutno približno 90 % predkliničnih zdravil proti raku, ki vstopajo v klinična preskušanja, ne dobi regulativne odobritve, povprečni stroški uvedbe novega zdravila na trg pa znašajo več kot milijardo dolarjev [40], [41]. Eden ključnih razlogov za visoko stopnjo neuspeha novih zdravil in nizko terapevtsko korist odobrenih zdravil je pomanjkanje predkliničnih modelov, ki bi odražali kompleksno biologijo človeških tumorjev. Trenutno najboljše modele za opazovanje odziva tumorjev na zdravila predstavljajo modeli PDX (*angl.* Patient-Derived Xenograft – ksenotransplantacija iz bolnika), pri katerih se tkivo ali celice iz bolnikovega tumorja implantirajo v imunsko pomanjkljive miši. PDX modeli dokazano dobro posnemajo molekularne, genetske in histopatološke značilnosti izvornih tumorjev ter tudi heterogenost tako med tumorji kot znotraj tumorja [42]. Modeli PDX se torej uporabljajo za ustvarjanje okolja, ki omogoča nadaljnjo rast raka po njegovi odstranitvi iz bolnika in tako omogočajo spremljanje rasti tumorja v laboratoriju, vključno z odzivom na različne terapije. PDX skupine z določenim tipom tumorja omogočajo določitev terapevtske učinkovitosti terapije proti določenim vrstam raka, lahko pa se model PDX določenega bolnika testira po pristopu personalizirane onkologije - z izbiro najustreznejših zdravil in protokolov za zdravljenje, ki so prilagojeni posameznemu bolniku in njegovemu tumorju [43].

Razlikovanje med uspešnostjo različnih terapij zdravljenja raka in določevanje odgovorov na posamezno terapijo v modelnih sistemih (*in vitro* ter *in vivo*) je ključnega pomena za njihovo izboljšanje in uspešen prenos v klinično zdravljenje [43]. Vendar se kljub naraščajoči uporabi modelov PDX podatki o odzivu na zdravila običajno analizirajo z orodji, ki so bila zasnovana za predhodnika modelov PDX - modele CDX (*angl.* Cell Line-Derived Xenograft – ksenotransplantacija iz celične linije) ali za klinične študije. Zaradi razlik med PDX in CDX v bioloških lastnostih in eksperimentalnih tehnikah ter različnih meril za ocenjevanje učinkovitosti zdravil v kliničnih preizkusih, le-ti niso primerni za modele PDX [44]. Iz tega razloga so Quanxue Li in sodelavci iz inštituta Shanghai Center for Bioinformation Technology, razvili paket DRAP (Drug Response Analysis on PDX platform) za programski jezik R, prilagojen štirim tipičnim zasnovam predkliničnih raziskav na modelih PDX (1AN, T1N, TA1 in TAN – opisani v poglavju DRAP v metodah). Orodja v paketu DRAP omogočajo vizualizacijo in analizo podatkov odziva tumorjev na zdravila v predkliničnih raziskavah. Paket uporabniku ponuja statistično oceno razlike v volumnu tumorja med testnimi skupinami, izračun stopnje zaviranja rasti tumorja (tumor growth inhibition - TGI) in prikaz odziva na zdravilo na ravni posamezne tretirane živali [45]. Orodje DRAP - prvo integrirano orodje za analizo in vizualizacijo odziva na zdravila v predkliničnih raziskavah na platformi PDX, bi lahko še dodatno spodbudilo uporabo modelov PDX pri razvoju zdravil in prilagojenem zdravljenju raka.

## 4. CILJI IN HIPOTEZE

### 4.1. Cilji:

Cilj te raziskovalne naloge je bil raziskati učinke vnosa plazmida z zapisom dveh vnetnih kemokinov CCL5 in CCL17 na rast tumorja v modelu raka debelega črevesa CT26. Da bi opisali razlike med terapijami po genskem elektroprenosu plazmidne DNA, smo uporabili program R in paket DRAP po zasnovi 1AN. Določili smo, ali je DRAP primeren za ugotavljanje uspešnosti imunskih genskih terapij in nadalje, ali obstaja razlika v odgovoru tumorjev na terapijo glede na tip protokola genskega elektroprenosa plazmidne DNA z zapisom za specifične kemokine. Na podlagi teh ugotovitev smo s paketom DRAP določili še učinke plazmidov z zapisom za kemokine pri genskem elektroprenosu v kombinaciji z obsevanjem.

### 4.2. Hipoteze:

- Modeliranje rasti krivulj tumorjev s paketom DRAP je primerna metoda za napoved odgovorov tumorjev na terapijo.
- Obstaja razlika v odgovoru tumorjev na terapijo glede na dva tipa protokolov genskega elektroprenosa za dostavo plazmidne DNA.
- Genska terapija s plazmidno DNA z zapisom za kemokine pripomore k učinkovitosti radioterapije.

## 5. METODE

### 5.1. Postopek genske terapije

#### 5.1.1. Plazmidi

Uporabljeni so bili komercialno dostopni plazmidi pUNO1-mcs (kontrolni plazmid), pUNO1-mCCL5 in pUNO1-mCCL17. Vsi plazmidi so bili pomnoženi v bakteriji *Escherichia coli* in nato izolirani z uporabo kita EndoFree Plasmid Mega. Koncentracija izoliranih plazmidov je bila izmerjena s kitom Qubit DNA Broad Range s fluorometrično kvantifikacijo z uporabo fluorometra Qubit 4. Kakovost plazmida je bila ocenjena z razmerjem 260/280 nm (Epoch Microplate Spectrophotometer) in z agarozno gelsko elektroforezo. Za poskuse so bili vsi plazmidi razredčeni v fiziološki raztopini do končne koncentracije 2 µg/µL [46].

#### 5.1.2. Celične kulture

V poskusih *in vitro* je bila uporabljena celična linija mišjega raka debelega črevesa CT26. Gojitev celic je potekala v inkubatorju Advanced RPMI 1640 pri 5 % CO<sub>2</sub> in 37 °C. Vsi mediji so bili dopolnjeni z GlutaMAX, 5 % fetalnim govejim serumom in penicilinom-streptomycinom. Celice so bile rutinsko testirane na okužbo z mikoplazmo z MycoAlert™ PLUS Mycoplasma Detection [46].

#### 5.1.3. Miši

Samice miši BALB/cAnNCrI so bile na začetku poskusov stare med 6 in 8 tednov in tehtale med 18 in 20 g. Miši so bile hranjene v posebnem okolju brez patogenov z 12-urnim ciklom menjavanja svetlobe in teme pri 20–24 °C s 55 % ± 10 % relativno vlažnostjo ter zagotovljeno hrano in vodo. Po zdravljenju je bila velikost tumorja izmerjena trikrat na teden. Volumen tumorja 500 mm<sup>3</sup> je predstavljal humano končno točko, pri čemer je bila miš evtanazirana. Vsi poskusi so na živalih so potekali v skladu z navodili in dovoljenjem Ministrstva za kmetijstvo, gozdarstvo in prehrano Republike Slovenije (št. dovoljenja U34401-1/2015/17 in U34401-3/2022/11) [46].

#### 5.1.4. Postopek genskega elektroprenosa

Miši s pobritim hrbtom so bile naključno razdeljene v poskusne skupine po 6-10 živali. Tumor je zrasel na hrbtu posamezne miši po subkutanem vbrižganju  $3 \times 10^5$  celic CT26 v 100 µL (0,9 % NaCl) fiziološke raztopine. Terapija je bila izvedena, ko je volumen posameznega tumorja dosegel 50 mm<sup>3</sup>. Volumen tumorja je bil izmerjen s kljunastim merilom Vernier in nato izračunan s formulo za elipsoid ( $a \times b \times c \times \frac{\pi}{6}$ , kjer so a, b in c pravokotni premeri tumorja). Med terapijo so bile miši pod anestezijo 2 % izoflurana. Terapija je bila izvedena z intratumorskim injiciranjem 25 µL plazmidne DNA z 2 µg/µL (50 µg) nekodirajočega kontrolnega plazmida pUNO1 ali plazmida pUNO1, ki nosi zapis za mišja kemokina CCL5 oziroma CCL17, z uporabo inzulinske brizge. Po 5 minutah je bil izveden genski elektroprenos na tumorjih z dovajanjem električnih pulzov. Uporabljena sta bila dva različna protokola genskega elektroprenosa. Prvi je bil protokol ECT, ki se standardno uporablja pri elektrokemoterapiji (*angl.* electrochemotherapy) in pri katerem se dovaja kratke, visokonapetostne električne pulze. Drugi protokol HV-LV je bil prilagojen po Forjanic in sodelavci in je sestavljen iz štirih nizov električnih pulzov, pri čemer je vsak niz sestavljen iz enega visokonapetostnega (*angl.* HV – high voltage) in enega nizkonapetostnega (*angl.* LV – low voltage) pulza [47]. Električne pulze smo generirali z generatorjem električnih pulzov ELECTRO Cell B10. Pulzi so bili dovedeni s 6 mm vzporednima ploščatima elektrodama iz nerjavečega jekla [46].

### 5.1.5. Obsevanje

Za obsevanje je bil uporabljen Darpac 2000 pri 220 kV, 10 mA in z 0,55 mm Cu in 1,8 mm Al filtracijo. Tumorji so bili obsevani z dozo 1,976 Gy/min z enkratnimi (10 Gy) ali frakcioniranimi dozami (3x 5 Gy). Miši so bile vstavljene v svinčeno držalo, pri čemer je odprtina pri hrbtnem delu omogočala obsevanje zgolj tumorja, med tem ko so bili drugi deli miši zaščiteni pred obsevanjem. V svinčenih držalih miši niso bile pod anestezijo. Da bi zagotovili enakomerno porazdelitev odmerka po volumnu tumorja, so bili tumorji izpostavljeni obsevanju z dvema nasprotnima poljema, skozi vsako od polj je bilo dostavljenih 50 % celotne doze. [48]

## 5.2. Program R

R je programski jezik in okolje za statistično računalništvo in grafiko. To je GNU projekt (prosta in odprtokodna programska oprema), ki so ga v Bell Laboratories razvili John Chambers in sodelavci. R je na voljo kot brezplačna programska oprema pod pogoji splošne javne licence GNU Free Software Foundation v obliki izvorne kode. Deluje na številnih platformah UNIX in podobnih sistemih (vključno s FreeBSD in Linuxom), Windows in MacOS. Ponuja odprtokodno pot do raziskovanja statistične metodologije s svojo široko paleto statističnih (linearno in nelinearno modeliranje, klasični statistični testi, analiza časovnih vrst, klasifikacija, združevanje v gruče...) in grafičnih tehnik. Hkrati je zelo razširljiv z možnostjo uporabe in razvijanja različnih knjižnic oz. paketov ter modulov [49]. Eden od paketov je tudi DRAP, o katerem bomo govorili v naslednjem poglavju.

## 5.3. DRAP

DRAP je eden od paketov, ustvarjenih za R in prvo integrirano orodje za analizo in vizualizacijo odziva na zdravlila pri predkliničnih raziskavah na platformi PDX. Omogoča obdelavo podatkov pri štirih tipičnih zasnovah predkliničnih raziskav na modelih PDX - 1AN, T1N, TA1 in TAN. Pri tem prva črka (*angl.* T - tumors) predstavlja število vrst tumorjev, druga (*angl.* A – arms) predstavlja število testnih skupin za vsak tumor, tretja (*angl.* N – number of animals) pa predstavlja število živali, ki ustreza eni liniji tumorja v vsaki skupini. Oznaka 1 pomeni eno in T, A ali N pomeni več (npr. T1N – več vrst tumorjev, ena testna skupina, več živali v skupini). V nadaljevanju je opisana uporaba vsakega od štirih omenjenih vzorcev [45].

Tabela 1: Prikaz štirih tipičnih zasnov predkliničnih raziskav na modelih PDX - 1AN, T1N, TA1 in TAN.

Zasnova	Št. tumorjev (T)	Št. skupin (A)	Št. živali (N)
<b>1AN</b>	<b>1</b>	več	več
<b>T1N</b>	več	<b>1</b>	več
<b>TA1</b>	več	več	<b>1</b>
<b>TAN</b>	več	več	več

### 5.3.1. 1AN

1AN vzorec je zasnovan za primerjavo protitumorske učinkovitosti **različnih terapij za določen tumor**. Ko so modeli PDX uspešno vzpostavljeni, so živali naključno razvrščene v več skupin, pri čemer je ena skupina izpostavljena določenemu zdravljenju. Nato se v nizu časovnih intervalov izmerijo volumni tumorjev in telesna teža živali. DRAP najprej vizualizira podatke o volumnu tumorja in podatke o telesni teži za vse časovne točke tako na ravni posameznih miši s tumorjem kot na ravni posamezne terapevtske skupine (*angl.* arm). Potem DRAP oceni morebitne razlike v volumnih tumorjev med skupinami z uporabo statističnih metod one-way ANOVA [50], [51], Kruskal–Wallisovega testa [52], mixed-design ANOVA, linearnega mešanega modela (LMM) [53] ali permutacijskega testa (*angl.* permutation strategy) [54], [55]. DRAP razvrsti skupine glede na izračun stopnje zaviranja rasti tumorja (*angl.* tumor growth inhibition - TGI) in predstavi rezultate TGI za končno časovno točko in vse časovne točke. Na koncu lahko z označevanjem stopnje odziva na terapijo za vsako žival ugotovimo, ali gre za popolni odziv (*angl.* CR – complete response), delni odziv (*angl.* PR – partial response), stabilno bolezen (*angl.* SD – stable disease) ali progresivno bolezen (*angl.* PD – progressive disease) [56], [57]. Vrsta odziva je določena s primerjavo volumna tumorja pred in po terapiji [45].

### 5.3.2. T1N

T1N vzorec je zasnovan za primerjavo protitumorske učinkovitosti **posameznih terapij na različne tumorje**. Ker je v skupini testiranih več miši, je upoštevan tudi učinek intratumorske heterogenosti (stopnja različnosti med tumorji iste vrste) na odziv na terapijo. Ta odziv se za vsak tip tumorja izračuna na podlagi povprečja ali mediane vrednosti volumnov tumorjev. Uporaba več živali, vključenih v eno eksperimentalno skupino, torej pomaga povečati natančnost stopnje odziva tumorja in tako pridobiti najnatančnejšo oceno učinkovitosti terapije [58].

### 5.3.3. TA1

TA1 vzorec je zasnovan za primerjavo protitumorske učinkovitosti **različnih terapij na različne tumorje**. Vzorec vključuje zbirko različnih tumorjev in terapevtskih skupin v enem preskušanju, vendar samo po eno miš v skupini posameznega tipa tumorja z namenom znižanja stroškov raziskave. Ker je v vsaki skupini samo ena žival, s tem vzorcem ni mogoče raziskati intratumorske heterogenosti pri istem zdravljenju [45].

### 5.3.4. TAN

TAN bi lahko obravnavali kot razširjeno različico zgornjih treh vzorcev in ga lahko uporabili v različnih situacijah. Ta vzorec torej proučuje **več vrst tumorjev in več živali v vsaki skupini**, zato omogoča tako raziskavo heterogenosti med vrstami tumorjev kot heterogenosti znotraj tumorja [45].

Za zgoraj razložene vzorce (1AN, T1N, TA1 in TAN) DRAP ponuja funkcije za oceno razlik v volumnih tumorjev po skupinah, izračun TGI za vsako skupino, ugotovitev stopnje odziva živali na terapijo, izračun indeksa odzivov testnih skupin in vizualizacijo rezultatov analize [45].

## 5.3.5. Izračun TGI

Stopnja zaviranja rasti tumorja (*angl.* TGI - tumor growth inhibition rate) je ena najpogosteje uporabljenih postopkov za opredelitev odziva terapij v primerjavi s kontrolno skupino. Osnovni način izračuna TGI je naslednji:

$$TGI = 1 - \frac{F(V_T)}{F(V_C)} * 100 \%$$

$F(V_T)$  in  $F(V_C)$  označujeta načina izračuna za terapevtsko in kontrolno skupino. Obstajajo tri vrste funkcij  $F$  za izračun TGI:

1.  $F = V_t - V_0$  [59]
2.  $F = \frac{V_t}{V_0}$  [60]
3.  $F = \text{površina pod krivuljo volumna tumorja (angl. AUC – area under the curve of tumor volume)}$  [61]

$V_t$  in  $V_0$  predstavljata povprečni volumen tumorja v času  $t$  oziroma času 0. Na primer, če je  $F = V_t - V_0$ , je TGI izražen kot:

$$TGI = 1 - \frac{V_{T,t} - V_{T,0}}{V_{C,t} - V_{C,0}} * 100 \%$$

kjer  $V_{T,t}$  in  $V_{T,0}$  predstavljata povprečni volumen tumorja v kraku zdravljenja v času  $t$  oziroma času 0,  $V_{C,t}$  in  $V_{C,0}$  predstavljata srednji volumen tumorja kontrolne skupine v času  $t$  oziroma času 0 [45].

## 6. RAZISKOVALNI POSKUS

Na Onkološkem inštitutu Ljubljana so v skladu s prej navedenimi metodami (genski elektroprenos plazmidne DNA z vnetnima kemokinoma CCL5 in CCL17) izvedli imunsko gensko terapijo na miših z rakom debelega črevesa CT26. Podatki o velikosti tumorjev za vsako skupino in posamezno miš (merjeni trikrat tedensko) pa so bili shranjeni v Excel tabelah. Za analizo rezultatov smo uporabili jezik R (verzija RStudio 2023.06.2+561 za operacijski sistem Windows) in knjižnico oziroma paket DRAP. Spodaj sledi napisana programska koda z razlago.

### 6.1. Analiza s paketom DRAP

#### 6.1.1. Transformacija tabel

Sprva je bilo potrebno zagotoviti, da so tabele zapisane v obliki, ki jo DRAP knjižnica lahko uporabi pri svojih vgrajenih funkcijah. DRAP zahteva tabele v obliki štirih stolpcev z imeni Times (čas meritve), Volume (izmerjen volumen tumorja), Arms (ime terapevtske skupine) in ID (številka posamezne miši). Tabele bi bilo možno ročno transformirati, a je zaradi velikega števila tabel, testnih skupin in miši dosti bolj smiselna transformacija s programom v jeziku R.

Za transformacijo tabel smo zapisali funkcijo *transformiraj\_tabelo()*. Funkcija kot parameter sprejme ime originalne tabele, ki jo želimo transformirati in vrne transformirano tabelo.

```

1 # vpeljavo knjižnic
2 library(readxl)
3 library(data.table)
4 library(DRAP)
5
6 # funkcija, ki transformira tabelo v željeno obliko
7 transformiraj_tabelo <- function(ime_tabele){
8   setwd("C:/ime_mape_v_kateri_so_tabele") # nastavimo delovni direktorij
9   originalna_tabela <- read_xlsx(ime_tabele,col_names = TRUE) # izbrano tabelo shranimo v originalna_tabela
10
11   transponirano <- setDT(transpose(originalna_tabela)) # pretvorba originalne tabele v data.table
12
13   Times_vrednosti <- colnames(originalna_tabela)[-1] # izoliramo times vrednosti v seznam Times_vrednosti
14   ID_vrednosti <- as.character(transponirano[1]) # izoliramo vrednosti ID-jev v seznam ID_vrednosti
15
16   volumni <- melt(transponirano[2:nrow(transponirano), ], # združimo vrednosti volumnov pod 1 stolpec
17     measure.vars = 1:ncol(transponirano), # v novi tabeli volumni
18     variable.name = "ID", value.name = "Volume") # dodamo ime stolpca ID in stolpca Volumni
19   volumni[, ID := ID_vrednosti[ID]] # dodamo ID_vrednosti v stolpec ID
20
21   # ustvarimo tabelo koncna_tabela v katero dodamo:
22   koncna_tabela <- data.frame(
23     # Times_vrednosti v stolpec Times
24     Times = as.numeric(rep(Times_vrednosti, length.out = nrow(volumni))),
25     # vrednosti volumnov iz tabele volumni v stolpec "Volume"
26     Volume = as.numeric(volumni$Volume),
27     # ime terapevtske skupine v stolpec "Arms"
28     Arms = colnames(originalna_tabela)[1],
29     # vrednosti ID-jev iz tabele volumni v stolpec "ID"
30     ID = as.numeric(volumni$ID)
31   )
32   # funkcija nam vrne končno tabelo "koncna_tabela"
33   return(na.omit(koncna_tabela))
34 }
35 # pokličemo funkcijo npr. s tabelo "cc117_HVLV.xlsx" terapevtske skupine cc117_HVLV
36 # in v novo tabelo "cc117_HVLV" se shrani transformirana tabela
37 cc117_HVLV = transformiraj_tabelo("cc117(HV-LV).xlsx")
38 cc117_ECT = transformiraj_tabelo("cc117(ECT).xlsx")
39 cc15_ECT = transformiraj_tabelo("cc15(ECT).xlsx")
40 cc15_HVLV = transformiraj_tabelo("cc15(HV-LV).xlsx")
41 mcs_ECT = transformiraj_tabelo("mcs(ECT).xlsx")
42 mcs_HVLV = transformiraj_tabelo("mcs(HV-LV).xlsx")
43 Ctrl = transformiraj_tabelo("Ctrl.xlsx")
44
45 # v tem primeru smo transformirali 7 tabel različnih terapevtskih skupin
46 # za primerjanje uspešnosti pri različnih skupinah je potrebno vse
47 # tabele združiti v eno samo veliko tabelo "združena_tabela" s funkcijo rbind()
48 združena_tabela <- rbind(cc117_HVLV, cc117_ECT, cc15_ECT, cc15_HVLV, mcs_ECT, mcs_HVLV, Ctrl)

```

Slika 3: Razlaga delovanja funkcije *transformiraj\_tabelo()*



Arm 1	Time 1	Time 2	Time 3	Time ...		Times	Volume	Arms	ID
ID 1	Volume 1	Volume 2	Volume 3	Volume...	➔	Time 1	Volume 1	Arm 1	ID 1
ID 2	Volume 1	Volume 2	Volume 3	Volume...		Time 2	Volume 2	Arm 1	ID 2
ID 3	Volume 1	Volume 2	Volume 3	Volume...		Time 3	Volume 3	Arm 1	ID 3
ID ...	Volume...	Volume...	Volume...	Volume...		Time ...	Volume ...	Arm ...	ID ...

Slika 4: Vzorec originalne tabele (na levi), ki ga je potrebno transformirati v vzorec tabele, ki jo paket DRAP lahko uporabi (na desni).

S tabelami v pravilni obliki se lahko osredotočimo na DRAP in njegove funkcije. V našem primeru smo uporabili zasnovo 1AN (ena vrsta tumorja, več terapevtskih skupin, več miši v terapevtski skupini).

#### 6.1.2. Funkcija DataSummary

Vhodne podatke povzame funkcija `DataSummary()`. Izpiše število živali, povprečno vrednost, standardni odklon in standardno napako volumna tumorja za vsako testno skupino ob vsakem časovnem intervalu [45].

```
52 # ---- DataSummary ----
53 zdruzena_tabela_summary <- DataSummary(data = zdruzena_tabela,
54   type = 'volume',
55   pattern = 'oneAN',
56   measure.var = 'volume',
57   group.vars = c('Arms', 'Times'))
58 zdruzena_tabela_summary [1:20,] # izpis povzetka tabele
```

Slika 5: Primer uporabe funkcije `DataSummary()` na tabeli `zdruzena_tabela`. Povzetek se v 53. vrstici shrani v tabelo `zdruzena_tabela_summary` in v 58. vrstici izpiše, da je vidna uporabniku.

#### 6.1.3. Funkcija plotVolumeGC

Funkcija `plotVolumeGC()` je namenjena predstavitvi podatkov na grafu tako na ravni posamezne živali kot na ravni terapevtske skupine [45].

```
61 # ---- PlotVolumeGC ----
62 plotVolumeGC(zdruzena_tabela, # nariše graf za vsako miš posebej
63   level = 'Animal',
64   pattern = 'oneAN')
65
66 plotVolumeGC(zdruzena_tabela, # nariše grafe rasti tumorjev
67   level = 'Arm', # vsake testne skupine
68   pattern = 'oneAN',
69   position.dodge = 0.5)
```

Slika 6: Primer uporabe funkcije `plotVolumeGC()`.

#### 6.1.4. Funkcija RelativeChange

Funkcija `RelativeChange()` omogoča izračun in predstavitev relativne spremembe volumna tumorja na podlagi začetne osnovne vrednosti za vsako žival. Relativno spremembo izračuna `RelativeChange()` in na grafu predstavi funkcija `plotRC()` [45].

```
71 # ---- RelativeChange ----
72 zdruzena_tabela_relativeChange <- RelativeChange(zdruzena_tabela, type = 'volume', rm.baseline = T)
73
74 zdruzena_tabela_relativeChange [1:20,] # izpis izračunanih podatkov
75
76 plotRC(data = zdruzena_tabela, type = 'volume', pattern = 'oneAN') # predstavitev na grafu
```

Slika 7: Primer uporabe funkcije `RelativeChange()` in `plotRC()`. Izračunana relativna sprememba se shrani v tabelo `zdruzena_tabela_relativeChange` (72. vrstica), se izpiše (74. vrstica) in predstavi na grafu (76. vrstica).

## 6.1.5. Statistična analiza

Za oceno razlik v volumnu tumorjev med skupinami DRAP ponuja več statističnih metod: konvencionalno ANOVA, Kruskal-Wallisov test, mešano ANOVA, linearni mešani model (LMM) in permutacijski test. Permutacijski test izvaja funkcija *CompareGC()*, vse ostale metode pa so vključene v funkcijo *DRAnalysis()* [45].

```
80 # endpoint.ANOVA - začetni volumni tumorjev se med sabo le malo razlikujejo
81 DRAnalysis(zdruzena_tabela, pattern = 'oneAN', method = 'endpoint.ANOVA')
82
83 # GR.ANOVA - začetni - volumni tumorjev se med sabo dosti razlikujejo
84 DRAnalysis(zdruzena_tabela, pattern = 'oneAN', method = 'GR.ANOVA')
85
86 # mixed-design ANOVA - kadar želimo preučiti spreminjanje skozi čas
87 DRAnalysis(zdruzena_tabela, pattern = 'oneAN', method = 'mixed.ANOVA')
88
89 # linear mixed model - podobno mixed-design ANOVA
90 DRAnalysis(zdruzena_tabela, pattern = 'oneAN', method = 'LMM')
91
92 # kruskal-wallis test - primerjava več skupin hkrati - ali obstajajo pomembne razlike med katero koli od skupin
93 DRAnalysis(zdruzena_tabela, pattern = 'oneAN', method = 'GR.KW')
```

Slika 8: Primer uporabe funkcije *DRAnalysis()* na podlagi različnih statističnih metod.

## 6.1.6. Permutacijski test

Permutacijski test preveri, ali obstajajo pomembne razlike med rastnimi krivuljami tumorjev med različnima skupinama. Za vsak par skupin DRAP najprej izračuna t-statistiko oz. Wilcoxovo statistiko za vsako časovno točko in nato izračuna povprečje statistik med vsemi časovnimi točkami. Nato se miši v skupinskem paru naključno razporedijo med dve skupini in povprečje prej omenjenih statistik se preračuna 1000-krat. Vrednost P je delež permutacij, pri katerih je povprečna statistika večja v absolutni vrednosti kot povprečna statistika za originalni niz podatkov. Za vsak par skupin se ustvari vrednost P. Na koncu se P-vrednosti prilagodijo na podlagi večkratnega testiranja med vsemi pari skupin. [45]

```
95 # ---- Permutation Test ----
96 zdruzena_tabela_maxtimes <- zdruzena_tabela[zdruzena_tabela$Times<=10,]
97 compareGC(zdruzena_tabela_maxtimes,
98           compare.to = 'neg.control',
99           control = 'ctr1',
100           n = 1000,
101           fun = MeanW,
102           adjust = "BH")
```

Slika 9: Primer uporabe funkcije *CompareGC()* za permutacijski test. Za primerjavo smo izbrali kontrolno skupino Ctr1 (v tem primeru primerjamo le volumne, ki so bili izmerjeni do časovnega intervala 10, saj je tolikšna najmanjša vrednost končne časovne točke v katerikoli skupini).

## 6.1.7. Stopnja zaviranja rasti tumorja

DRAP ponuja izračun stopnje zaviranja rasti tumorja s funkcijo *TGI()* na tri načine, ki se razlikujejo glede na izbran kriterij. Funkcija *plotTGI()* za predstavitev rezultata na grafu ponuja dve možnosti. Ena je predstavitev vrednosti TGI po koncu testiranja, druga pa predstavlja vrednost TGI v vseh časovnih točkah. [45]

```
105 zdruzena_tabela_tgi <- TGI(data = zdruzena_tabela[zdruzena_tabela$Times<=15,],
106                          neg.control = 'ctr1',
107                          method = 'AUC',
108                          pattern = 'oneAN')
109 zdruzena_tabela_tgi[1:10,]
110
111 plotTGI(zdruzena_tabela_tgi, pattern = 'oneAN', scope = 'end.point')
112 plotTGI(zdruzena_tabela_tgi, pattern = 'oneAN', scope = 'all.point')
```

Slika 10: Primer uporabe funkcije *TGI()* za izračun stopnje zaviranja rasti tumorja. (v tem primeru primerjamo le volumne, ki so bili izmerjeni do časovnega intervala 15, saj je tolikšna najmanjša vrednost končnega časovnega intervala v kontrolni skupini). V 109. vrstici se uporabniku izpiše izračun TGI, v 111. se z grafom prikaže vrednost končnega TGI, v 112. pa vrednost TGI skozi čas za vsako skupino.

## 6.1.8. Analiza stopnje odziva na terapijo

Glede na spremembo volumna tumorja po končanem zdravljenju se označi odziv vsake živali na terapijo kot:

- popoln odziv  
(*angl.* complete response – CR)
- delni odziv  
(*angl.* partial response – PR)
- stabilna bolezen  
(*angl.* stable disease – SD)
- progresivna bolezen  
(*angl.* progressive disease – PD)

Na voljo je izbira med tremi kriteriji za označevanje stopnje odziva na terapijo: NPDXE.Response (*angl.* Novartis Institutes for BioMedical Research PDX encyclopedia), PPTP.Response (*angl.*

```
117 # kriteriji za NPDXE standard
118 npdxe.criteria <- data.frame(
119   BestResponse.lower = c(-1000,-0.95,-0.5,0.35),
120   BestResponse.upper = c(-0.95,-0.5,0.35,1000),
121   BestAvgResponse.lower = c(-1000,-0.4,-0.2,0.3),
122   BestAvgResponse.upper = c(-0.4,-0.2,0.3,1000),
123   Level = c('CR','PR','SD','PD'))
124
125 # kriteriji za PPTP standard
126 pptp.criteria <- data.frame(
127   min.RC.lower = c(-1,-1,-0.5,-0.5),
128   min.RC.upper = c(-0.5,-0.5,1000,1000),
129   min.Vol.lower = c(0,100,NA,NA),
130   min.Vol.upper = c(100,10000,NA,NA),
131   end.RC.lower = c(NA,NA,-1,0.25),
132   end.RC.upper = c(NA,NA,0.25,1000),
133   Level = c('CR','PR','SD','PD'))
134
135 # kriteriji za RC standard
136 rc.criteria <- data.frame(
137   RC.lower = c(-1000,-0.35,0.35),
138   RC.upper = c(-0.35,0.35,1000),
139   Level = c('CR','SD','PD'))
```

Slika 11: Primer nastavitve kriterijev za označevanje odziva na terapijo.

Pediatric Preclinical Testing program) in RC.Response (*angl.* relative change). [45]

Analiza stopnje odziva vsake živali je implementirana s funkcijo `DRLevel()`. `DRLevelSummary()` ustvari povzetek stopnje odziva vsake skupine. Rezultat je grafično predstavljen s `plotDRLevel()`. Nazadnje so z `DRLevelAnalysis()` izračunani indeksi ocene odziva za vsako skupino. To sta stopnja odziva (*angl.* response rate - RR) in stopnja nadzora boleznin (*angl.* disease control rate – DCR). RR je razmerje med CR in PR med vsemi mišmi v eni skupini, DCR pa je razmerje indeksov ocene odziva CR, PR in SD. Rezultate je mogoče uporabiti za razvrščanje učinkovitosti terapij različnih skupin. [45]

```
142 oneAN.dr1 <- DRLevel(data = zdruzena_tabela,
143                     method = 'NPDXE.Response',
144                     criteria = npdxe.criteria,
145                     neg.control = 'ctrl')
146
147 # sortiranje podatkov pred izpisom
148 oneAN.dr1 <- oneAN.dr1[order(oneAN.dr1$Arms), ]
149 head(oneAN.dr1) # izpis
150
151 # povzetek po skupinah
152 DRLevelSummary(oneAN.dr1, by='Arms')
153 # grafična predstavitev povzetka po skupinah
154 plotDRLevel(data = oneAN.dr1, by='Arms', pattern = 'oneAN')
155
156 DRLevelAnalysis(oneAN.dr1, by = 'Arms', measurement = 'DCR')
157
```

Slika 12: Primer uporabe funkcij `DRLevel()`, `DRLevelSummary()`, `plotDRLevel()` in `DRLevelAnalysis()`.

## 7. REZULTATI

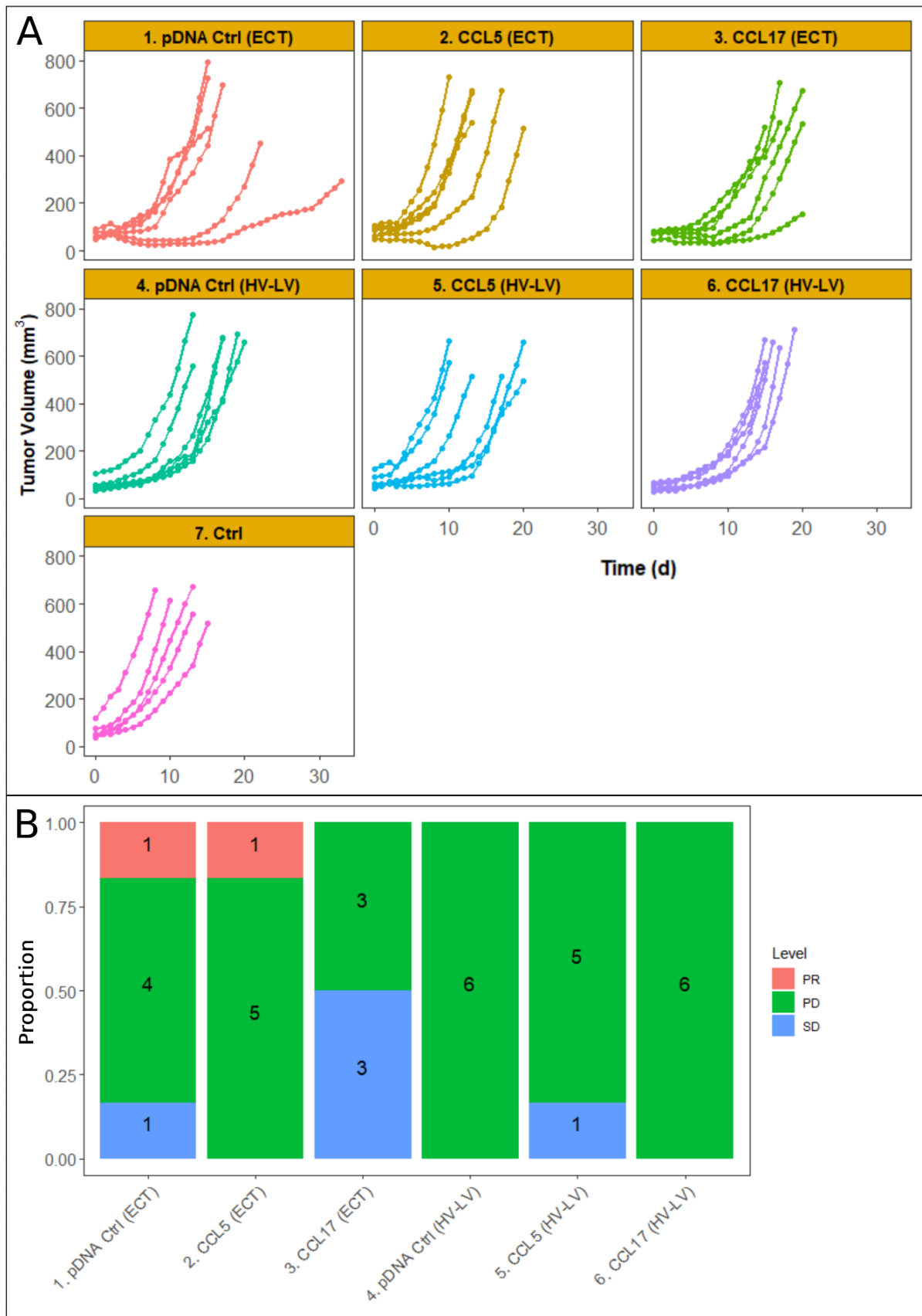
V prvem delu raziskave smo proučevali gensko terapijo s plazmidi pUNO1-mcs (kontrolni plazmid), pUNO1-mCCL5 in pUNO1-mCCL17, pri kateri smo za dostavo plazmidne DNA v tumorje uporabili genski elektroprenos z dvema različnima protokoloma električnih pulzov – ECT (angl. electrochemotherapy), ki se standardno uporablja pri elektrokemoterapiji in HV-LV (angl. high voltage – low voltage), ki je bil prilagojen po Forjanic in sodelavci. Prvi del imena testne skupine pripada vrsti uporabljenega plazmida (npr. CCL17), drugi del pa protokolu genskega elektroprenosa (npr. ECT). Kontrolna skupina Ctrl ni bila izpostavljena nobenemu zdravljenju, skupina pDNA Ctrl pa predstavlja terapijo s praznim, nekodirajočim plazmidom.

Primerjava rastnih krivulj tumorjev po terapijah je pokazala, da posamezne terapije vodijo v daljši zaostanek v rasti tumorjev, kar se kaže v obliki bolj položnih rastnih krivulj terapevtskih skupin v primerjavi s kontrolno skupino, Ctrl (slika 13A). Pri primerjavi učinkovitosti terapije med plazmidoma CCL17, CCL5 in pDNA Ctrl pri genskem elektroprenosu z ECT pulzi opazimo, da ni velikih razlik med uspešnostjo zdravljenja glede na vrsto dostavljenega plazmida. Podobno velja tudi pri primerjavi plazmidov pri protokolu HV-LV, s tem da je plazmidna DNA z zapisom za CCL5 nekoliko uspešnejša od CCL17. V obeh primerih se rastne krivulje po terapiji s plazmidno DNA z zapisom za CCL17 v posamezni časovni točki manj razlikujejo med posameznimi mišmi in so bolj konsistentne v primerjavi z ravnimi krivuljami po terapiji s plazmidno DNA z zapisom za CCL5. Večje razlike pokaže primerjava glede na uporabljeni protokol genskega elektroprenosa. Pri vseh terapijah z ECT protokolom je zaostanek v rasti tumorjev večji v primerjavi z HV-LV protokolom. Pri tem je največja razlika predvsem skupinama CCL17 in pDNA Ctrl, nekoliko manj pri CCL5.

Poleg razlik v zaostanku v rasti tumorjev smo s pomočjo DRAP analize in NPDXE kriterija določili vrsto odgovora na posamezno terapijo za vsako miš (slika 13B). Terapija s kontrolnim plazmidom pDNA Ctrl in ECT pulzi je vodila v odgovore, pri katerem je bil eden opredeljen kot PR, eden kot SD in štiri kot PD. Terapija s plazmidno DNA z zapisom za CCL5 po ECT pulzih je kvalificirala en primer PR, ostalih pet je PD. Pri genski terapiji s plazmidno DNA z zapisom za CCL17 in ECT pulzi je imela polovica miši odgovor, ki je opredeljen kot SD, polovica pa kot PD. Terapije, pri katerih smo pri genskem elektroprenosu uporabili HV-LV pulze, so pri vseh miših vodile do odgovora, opredeljenega kot PD, z izjemo enega primera SD pri plazmidu CCL5.

Iz navedenih rezultatov lahko sklepamo, da so razlike med vrsto plazmidne DNA zanemarljive, razlike med dostavnima sistemoma ECT in HV-LV pa dovolj izrazite, da lahko trdimo, da je ECT protokol v primerjavi s HV-LV protokolom pri izvedeni genski terapiji bolj primeren za transfekcijo tumorjev s plazmidno DNA.

Na podlagi rezultatov so bile izvedene nadaljnje raziskave genske terapije s kemokini v kombinaciji z obsevanjem z uporabo ECT genskega elektroprenosa, saj je le-ta v povprečju povzročil boljše odgovore pri posamezni terapiji. Ker se je DRAP izkazal za ustrezen model pri interpretaciji rezultatov samostojne genske terapije smo se z enakim postopkom odločili analizirati tudi učinek genske terapije po genskem elektroprenosu plazmidne DNA z ECT protokolom v kombinaciji z obsevanjem z enkratno (IR 10 Gy) ali frakcionirano (IR 3x5 Gy) dozo.



Slika 13: Grafa rezultatov zdravljenja z gensko terapijo. Graf A predstavlja rastne krivulje tumorjev na ravni posamezne miši. Za pripravo rastnih krivulj je bila uporabljena DRAP funkcija `plotVolumeGC()`. Graf B predstavlja analizo odgovorov miši v posamezni terapevtski skupini glede na kriterij NPDXE. Odgovori po terapijah so bili opredeljeni kot PD (angl. progressive disease – progresivna bolezen), SD (angl. stable disease – stabilna bolezen) in PR (angl. partial response – delni odziv). Uporabljena je bila DRAP funkcija `plotDRLevel()`.

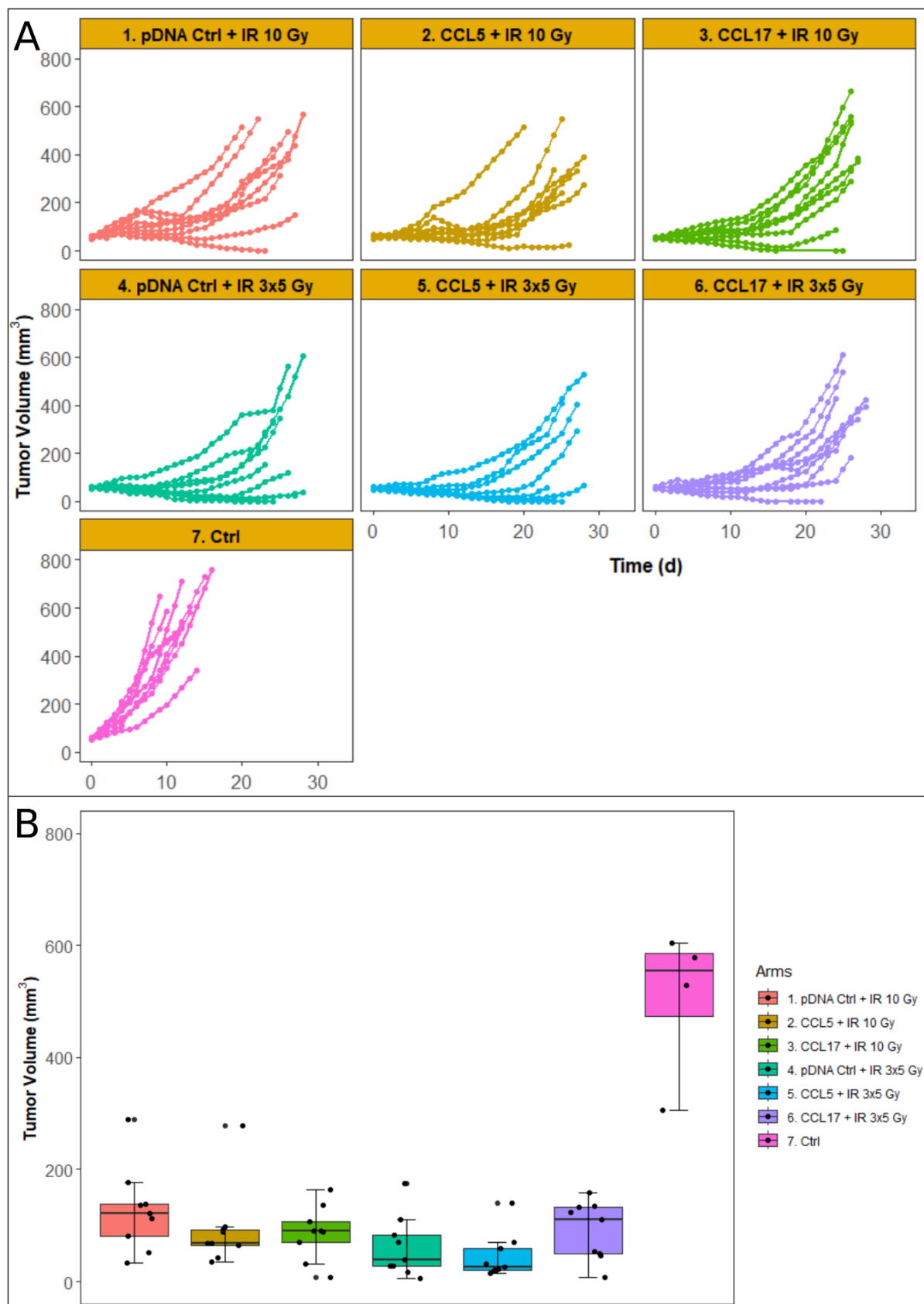
V drugem delu raziskave smo proučevali testne skupine pDNA Ctrl + IR 10 Gy, CCL5 IR + 10 Gy, CCL17 + IR10 Gy, pDNA Ctrl + IR 3x5 Gy, CCL5 + IR 3x5 Gy, CCL17 + IR 3x5 Gy in kontrolno skupino Ctrl. Prvi del imena skupine sestavlja tip plazmida (npr. CCL17), drugi del pa način obsevanja (npr. IR 10 Gy). Uporabljeno je bilo obsevanje z enkratno dozo 10 Gy (IR 10 Gy) in frakcionirano obsevanje (IR 3x5 Gy). Tudi kontrolni skupini pDNA Ctrl sta bili obsevani, dostavljen pa je bil prazni, nekodirajoči plazmid. Pri vseh skupinah je bil uporabljen genski elektroprenos z ECT pulzi, razen pri kontrolni skupini Ctrl, ki ni bila izpostavljena nobeni terapiji.

Primerjava rastnih krivulj tumorjev po kombiniranih genskih terapijah z enkratnim obsevanjem 10 Gy je pokazala največji zaostanek v rasti tumorjev po terapiji s plazmidno DNA z zapisom za CCL5 (slika 14A). Terapija s plazmidno DNA z zapisom za CCL17 in enkratnim obsevanjem zavira rast tumorjev predvsem v prvih 11-ih dneh, nato pa se volumen tumorjev eksponentno povečuje. Pri kombiniranih genskih terapijah s frakcioniranim obsevanjem 3x5 Gy je prav tako največjo protitumorsko učinkovitost pokazala terapija plazmidne DNA z zapisom za CCL5, medtem ko se je terapija s plazmidno DNA z zapisom za CCL17 izkazala za slabšo v primerjavi z kontrolno skupino pDNA Ctrl. Glede na režim obsevanja pa je frakcionirano obsevanje 3x5 Gy veliko uspešnejše od enkratnega obsevanja 10 Gy, saj je pri frakcioniranem obsevanju vsaka izmed skupin počasneje dosegla humano končno točko.

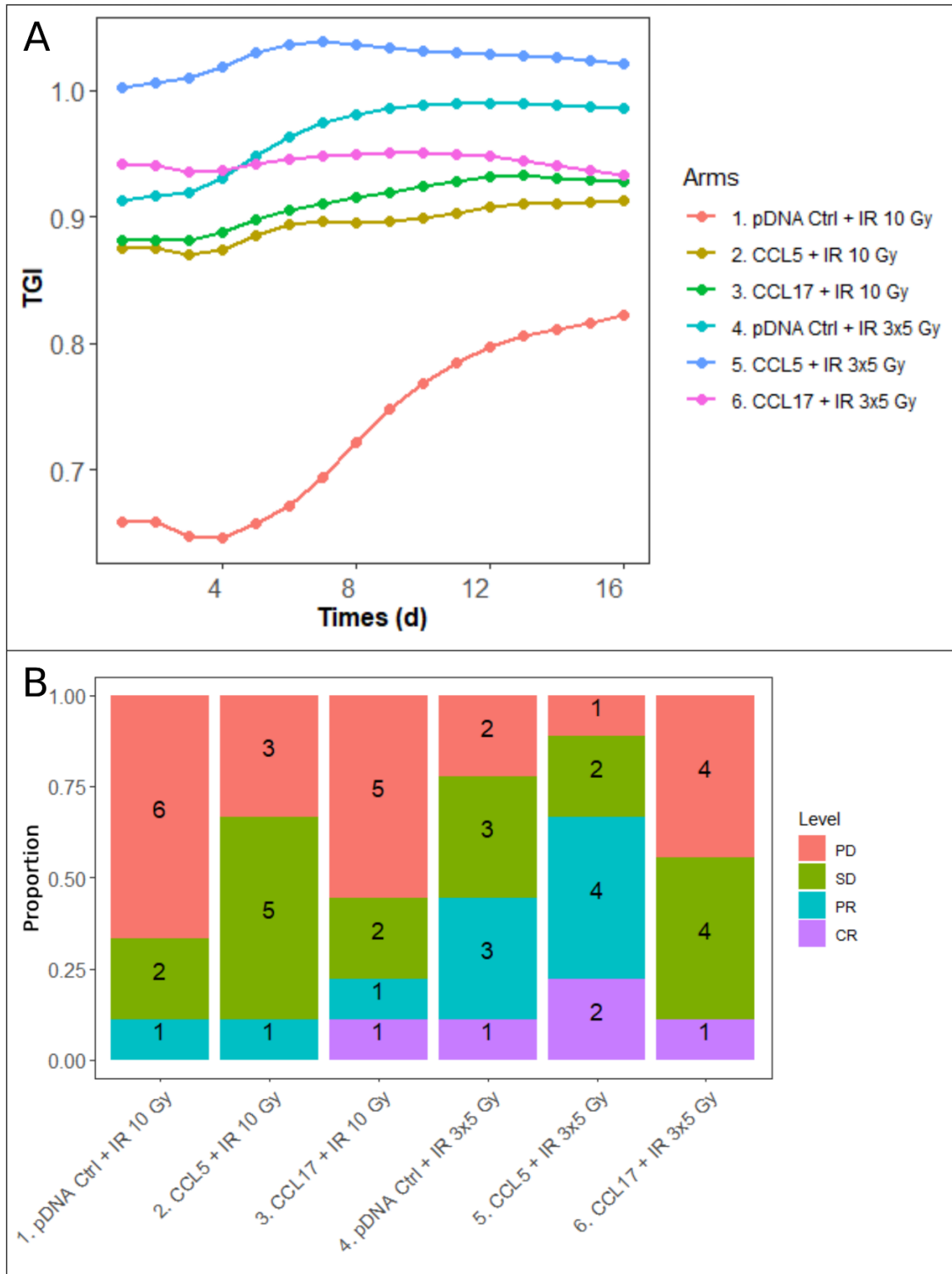
Analiza volumnov tumorjev s funkcijo plotEndpoint() je pokazala nižje volumne tumorjev tretiranih skupin v primerjavi s kontrolo (slika 14B). Terapije so v povprečju povzročile skoraj 90 % manjše srednje vrednosti volumnov tumorjev pri časovni točki 14, kot pri kontrolni skupini. Slednje nakazuje na večji zaostanek v rasti, pri čemer se je za najuspešnejšo kombinirano gensko terapijo izkazala terapija s plazmidno DNA z zapisom za CCL5 in frakcioniranim obsevanjem 3x5 Gy.

Primerjava zaviranja rasti tumorja (TGI) po kombinirani genski terapiji s plazmidno DNA z zapisom za CCL5 in CCL17 in enkratnim obsevanjem 10 Gy je pokazala veliko višjo stopnjo zaviranja rasti tumorjev v primerjavi s praznim plazmidom, predvsem v prvih 5-ih dneh od začetka terapije (slika 15A). Pri kombinirani genski terapiji s frakcioniranim obsevanjem 3x5 Gy pa je v najvišjo in najbolj enakomerno stopnjo zaviranja vodila terapija s plazmidno DNA z zapisom za CCL5. V kombinaciji z obsevanjem 3x5 Gy je analiza TGI potrdila nižjo stopnjo zaviranja rasti tumorjev po terapiji s plazmidno DNA z zapisom za CCL17 v primerjavi s praznim plazmidom.

Vrsta odgovora na posamezno terapijo pri posamezni miši je bila ponovno določena s pomočjo DRAP analize in NPDXE kriterija (slika 15B). Genski terapiji s plazmidoma z zapisom kemokinov in enkratnim obsevanjem 10 Gy sta se odrezali boljše kot terapija s kontrolnim plazmidom pDNA Ctrl pri enakem obsevanju. Ta je kvalificirala en PR, dve SD in šest PD. Terapija s plazmidno DNA z zapisom za CCL5 in enkratnim obsevanjem 10 Gy je kvalificirala en PR, pet SD in tri PD. Pri genski terapiji s plazmidno DNA z zapisom za CCL17 in enkratnim obsevanjem z 10 Gy pulzi je bil kvalificiran en CR, en PR, dve SD in pet PD. Terapija s plazmidom z zapisom za CCL17 je res dosegla en popolni odziv, vendar je pomembnejše delež progresivnih bolezni manjši pri plazmidu z zapisom za CCL5. Genska terapija v kombinaciji s frakcioniranim obsevanjem 3x5 Gy je pokazala veliko boljše rezultate kot terapija v kombinaciji z obsevanjem 10 Gy. Terapija s kontrolnim plazmidom pDNA Ctrl in frakcioniranim obsevanjem 3x5 Gy je kvalificirala en CR, tri PR, tri SD in dve PD. Pri kombinaciji s frakcioniranim obsevanjem 3x5 Gy je bila najuspešnejša terapija s plazmidno DNA z zapisom za CCL5, ki je kvalificirala dva CR, štiri PR, dve SD in le eno PD. Terapija s plazmidno DNA z zapisom za CCL17 je bila z enim CR, štirimi SD in štirimi PD veliko manj uspešna od ostalih dveh skupin. V primerjavi z enkratnim obsevanjem z 10 Gy je bila terapija s kontrolnim plazmidom pDNA Ctrl veliko uspešnejša v kombinaciji z obsevanjem 3x5 Gy, terapija s plazmidom z zapisom za CCL5 veliko uspešnejša pri obsevanju 3x5 Gy, terapija s plazmidom z zapisom za CCL17 pa le nekoliko uspešnejša pri obsevanju 3x5 Gy.



Slika 14: Graf A predstavlja rastne krivulje tumorjev na ravni posamezne miši. Za pripravo rastnih krivulj je bila uporabljena DRAP funkcija `plotVolumeGC()`. Graf kvartilov B prikaže podatke v obliki pravokotnika, ki je raztegnjen od prvega kvartila (vrednost, pod katero je 25 % volumnov) do tretjega kvartila (vrednost, pod katero je 75 % volumnov). Notranja črta pokaže mediano, črta zunaj pravokotnika pa segata do minimalne in maksimalne vrednosti (razen izjemnih vrednosti). Črne pike predstavljajo posamezne volumne. V našem primeru smo analizirali volumne pri časovni točki 14. Za pripravo grafa kvartilov je bila uporabljena funkcija `plotEndpoint()` iz paketa `ggplot2`.



Slika 15: Graf A je prikaz izračunanega TGI za vsako časovno točko. Stopnja zaviranja tumorja je bila izračunana po formuli površine pod krivuljo volumna tumorja in v primerjavi s kontrolno skupino Ctrl, zato je lahko izračunana le do časovne točke 16 (največja časovna točka pri kontrolni skupini). Uporabljena je bila DRAP funkcija plotTGI(). Graf B predstavlja analizo odgovorov miši v posamezni terapevtski skupini glede na kriterij NPDXE. Odgovori po terapijah so bili opredeljeni kot PD (angl. progressive disease – progresivna bolezen), SD (angl. stable disease – stabilna bolezen), PR (angl. partial response – delni odziv) in CR (angl. complete response – popoln odziv). Uporabljena je bila DRAP funkcija plotDRLevel().



## 8. RAZPRAVA

Prvi del raziskave je pokazal, da ima genska terapija GET plazmidov na mišjem modelu raka debelega črevesa CT26 zaviralni učinek na rast tumorjev. Rastne krivulje uporabljenih plazmidov (pUNO1-mcs, pUNO1-mCCL5 in pUNO1-mCCL17) med seboj niso pokazale dovolj razlik, da bi lahko trdili, da je tako zdravljenje s plazmidom z zapisom za določen kemokin (CCL5 oz. CCL17) opazno boljše od zdravljenja s praznim, kontrolnim plazmidom (pDNA Ctrl). To ugotovitev lahko pripišemo dejstvu, da se ne glede na vrsto vnesene plazmidne DNA aktivirajo DNA senzori (proteini v celicah, ki zaznavajo prisotnost tuje DNA), kar lahko sproži imunski odziv [62], [63]. Ta učinek prevlada nad učinki kemokinov, zapisanih na plazmidih, zato ni očitnih razlik med plazmidi. Po drugi strani pa lahko z gotovostjo trdimo, da obstajajo razlike med zdravljenjem z GET ECT oz. GET HV-LV, kjer se je, glede na odgovore po terapiji, ECT izkazal za uspešnejšega.

V drugem delu raziskave smo ugotovili, da kombinacija GET plazmidov z obsevanjem pokaže velik učinek zaviranja rasti tumorjev, pokazale pa so se tudi večje razlike med rastnimi krivuljami različnih plazmidov. Plazmid z zapisom kemokina za CCL5 je bil opazno uspešnejši od kontrolnega plazmida pri obeh tipih obsevanja. Plazmid z zapisom za CCL17 je bil pri obsevanju 10 Gy nekoliko uspešnejši od kontrolnega plazmida, pri obsevanju 3x5 Gy pa slabši od kontrolnega plazmida. Obsevanje 3x5 Gy se je izkazalo kot uspešnejše od obsevanja 10 Gy. Vse terapije v kombinaciji z obsevanjem 3x5 Gy so skupaj kvalificirale 4 popolne odzive in 7 delnih odzivov, terapije v kombinaciji z obsevanjem 10 Gy pa so skupaj kvalificirale le 1 popoln odziv in 3 delne odzive. Frakcioniranje je omogočilo, da radiorezistentne tumorske celice preidejo v občutljivo fazo cikla, preden je bilo dovedeno naslednje sevanje.

Kombinacija genske terapije GET z vnosom plazmidov z zapisom za CCL5 in radioterapije s frakcioniranim obsevanjem 3x5 Gy se je izkazala za uspešno, zato bi bilo smiselno to kombinacijo še bolj preučiti.

Že prejšnje študije so pokazale uspešnost genske terapije s plazmidi, ki nosijo zapis za citokine za zdravljenje različnih vrst raka. Eni od bolj pogosto uporabljenih citokinov in vrste raka, ki jih zdravijo so: IL-1 (fibrosarkom), IL-6 in IL-15 (melanom), IL-12 (rak debelega črevesa in danke, rak dojke, karcinom Merklvih celic in maligni melanom), IFN- $\gamma$  (rak prostate), GM-CSF (rak debelega črevesa in danke), TNF- $\alpha$  (rak sečnega mehurja) [64]. Raziskani so bili tudi uspešni primeri GET plazmidov, ki nosijo zapis za citokine. Najbolj raziskan zapis citokina na plazmidni DNA za GET terapijo je IL-12, ki se je izkazal kot uspešen pri zdravljenju metastatskega melanoma [65]. Kot eden izmed najuspešnejših se je plazmid z zapisom IL-12 izkazal tudi pri terapiji GET v kombinaciji z obsevanjem, pri katerem je sam GET z IL-12 povzročil do 28 % popolnih odzivov tumorjev, v kombinaciji pa se je ozdravljivost povečala do 100 %. [66]

Orodje DRAP je znatno pospešilo prikaz in interpretacijo rezultatov. Njegove funkcije so omogočile tudi primerjavo TGI in analizo stopnje odziva, kar bi bilo zamudno delati ročno. Funkcije je možno prilagoditi po želji uporabnika, da zanj bolj ustrezno prikažejo rezultate. Z orodjem DRAP smo pokazali razliko med protokoli genskega elektroprenosa za dostavo plazmidne DNA v tumorje *in vivo*. Pri kombiniranih genskih terapijah z obsevanjem smo z orodjem DRAP pokazali razlike med posameznimi terapijami in ovrednotili njihovo učinkovitost. Pri tem smo določili tudi najuspešnejšo terapijo GET s CCL5 v kombinaciji s frakcioniranim obsevanjem 3x5 Gy. Tako se je DRAP izkazal kot primerno orodje, ki bi lahko pomagalo pri interpretaciji rezultatov genskih terapij pri prihodnjih predkliničnih raziskavah.

## 9. ZAKLJUČEK

V raziskavi smo ugotovili, da je za dostavo plazmidne DNA protokol genskega elektroprenosa ECT primernejši od protokola HV-LV. S tem smo potrdili našo hipotezo, da pri GET plazmidne DNA obstaja razlika v odgovoru tumorjev glede na tip uporabljenega protokola.

Dokazana je bila tudi uspešnost kombinacije genske terapije GET (ECT) z vnosom plazmidov z zapisom za CCL5 in radioterapije s frakcioniranim obsevanjem 3x5 Gy. Tako smo potrdili hipotezo, da bo genska terapija s plazmidno DNA z zapisom za kemokine pripomogla k učinkovitosti radioterapije.

Potrjena je bila še zadnja hipoteza, da je modeliranje rastnih krivulj tumorjev s paketom DRAP primerna metoda za napoved odgovorov tumorjev na terapijo, saj je DRAP omogočil hitro in natančno analizo podatkov. Brez tega orodja bi interpretacija rezultatov potekala veliko dlje, prav tako pa bo napisan program omogočal analizo novih podatkov volumnov tumorjev v prihodnosti. Rezultati so s pomočjo orodja DRAP bolj natančni in predstavljeni kot i) graf volumnov tumorjev na ravni posamezne miši vsake skupine, ii) graf izračunanega TGI in iii) graf analize stopnje odziva na terapijo.

V nalogi sem imel možnost spoznati celoten potek raziskave in izvesti končni del – analiza pridobljenih podatkov. Rezultati so pokazali uspešnost enega od protokolov GET, kot tudi uspešnost GET v kombinaciji z obsevanjem pri plazmidu z zapisom za kemokin CCL5, kar še ni bilo preučeno v prejšnjih študijah. Z nalogo sem spoznal resnico znanstvenega raziskovanja, da je potrebno ogromno število študij, da pridemo do uporabnega rezultata in v tem primeru do primerne metode zdravljenja z gensko terapijo. Delo s pravimi podatki in raziskovanje teoretičnega ozadja na področju zdravljenja raka z gensko terapijo mi je prineslo veliko motivacije in zanimanja za to področje, pa tudi dosti znanja, ki se mi zdi uporabno in zanimivo. Če bi imel priložnost nadaljnjega dela na tem področju bi si želel raziskati še zdravljenje ostalih vrst raka ali drugačnih terapij, morda še kakšno najnovejšo metodo. Velik potencial predstavlja tudi uporabniški vmesnik za analizo podatkov z orodjem DRAP, saj vsi biologi niso večji programirani, zato bi jim bilo lažje le odpreti aplikacijo, naložiti tabele in označiti, s katerimi funkcijami želijo analizirati rezultate.

## 10. LITERATURA

- [1] RAK (2022) NIJZ. Dostopno na: <https://nijz.si/nenalezljive-bolezni/rak/> (Dostopano: 23. september 2023).
- [2] Rak (bolezen) (2023) Wikipedia. Dostopno na: [https://sl.wikipedia.org/wiki/Rak\\_\(bolezen\)](https://sl.wikipedia.org/wiki/Rak_(bolezen)) (Dostopano: 23. september 2023).
- [3] Rak v Sloveniji 2019 (2022) Onkološki inštitut Ljubljana, Epidemiologija in register raka, Register raka Republike Slovenije.
- [4] Sodobne metode zdravljenja raka (2019) OI Ljubljana. Dostopno na: [https://www.onko-i.si/za\\_javnost\\_in\\_bolnike/zdravljenje/sodobne\\_metode\\_zdravljenja\\_raka](https://www.onko-i.si/za_javnost_in_bolnike/zdravljenje/sodobne_metode_zdravljenja_raka) (Dostopano: 23. september 2023).
- [5] Radiation therapy (2023) Mayo Clinic. Dostopno na: <https://www.mayoclinic.org/tests-procedures/radiation-therapy/about/pac-20385162> (Dostopano: 3. januar 2024).
- [6] Radiotherapy (2023) NHS choices. Dostopno na: <https://www.nhs.uk/conditions/radiotherapy/> (Dostopano: 3. januar 2024).
- [7] Radiation therapy (2024) Wikipedia. Dostopno na: [https://en.wikipedia.org/wiki/Radiation\\_therapy](https://en.wikipedia.org/wiki/Radiation_therapy) (Dostopano: 3. januar 2024).
- [8] Ang KK (1998). 'Altered fractionation trials in head and neck cancer'. *Seminars in Radiation Oncology*, 8 (4): 230–236. doi:10.1016/S1053-4296(98)80020-9.
- [9] Kaufmann, K.B. in sod. (2013) 'Gene therapy on the move', *EMBO Molecular Medicine*, 5(11), str. 1642–1661. doi:10.1002/emmm.201202287.
- [10] El-Aneed, A. (2004) 'Current strategies in cancer gene therapy', *European Journal of Pharmacology*, 498(1–3), str. 1–8. doi:10.1016/j.ejphar.2004.06.054.
- [11] Kamensek, U., Sersa, G. (2008) 'Targeted gene therapy in radiotherapy', *Radiology and Oncology*, 42(3). doi:10.2478/v10019-008-0009-1.
- [12] Kontomanolis, E.N. in sod. (2020) 'Role of oncogenes and tumor-suppressor genes in carcinogenesis: A Review', *Anticancer Research*, 40(11), str. 6009–6015. doi:10.21873/anticancer.14622.
- [13] Mondal, M. in sod. (2020) 'Recent advances of oncolytic virus in cancer therapy', *Human Vaccines & Immunotherapeutics*, 16(10), str. 2389–2402. doi:10.1080/21645515.2020.1723363.
- [14] Saeb, S. in sod. (2022) 'Suicide gene therapy in cancer and HIV-1 infection: An alternative to conventional treatments', *Biochemical Pharmacology*, 197, str. 114893. doi:10.1016/j.bcp.2021.114893.
- [15] Israel, M.A. (1993) 'Molecular approaches to cancer therapy', *Advances in Cancer Research*, str. 57–85. doi:10.1016/s0065-230x(08)60955-0.
- [16] Britovšek, N.K., Čemažar, M., Serša, G. (2012) 'Gensko zdravljenje raka', *Farmaceutski vestnik*, str. 14–22.
- [17] Chen, K. in sod. (2018) 'Chemokines in homeostasis and diseases', *Cellular & Molecular Immunology*, 15(4), str. 324–334. doi:10.1038/cmi.2017.134.
- [18] Ransohoff, R.M. (2009) 'Chemokines and chemokine receptors: Standing at the crossroads of immunobiology and neurobiology', *Immunity*, 31(5), str. 711–721. doi:10.1016/j.immuni.2009.09.010.
- [19] Nagarsheth, N., Wicha, M.S. and Zou, W. (2017) 'Chemokines in the cancer microenvironment and their relevance in cancer immunotherapy', *Nature Reviews Immunology*, 17(9), str. 559–572. doi:10.1038/nri.2017.49.
- [20] Chow, M.T. and Luster, A.D. (2014) 'Chemokines in cancer', *Cancer Immunology Research*, 2(12), str. 1125–1131. doi:10.1158/2326-6066.cir-14-0160.
- [21] Lavergne, E. in sod. (2004) 'Intratumoral CC chemokine ligand 5 overexpression delays tumor growth and increases tumor cell infiltration', *The Journal of Immunology*, 173(6), str. 3755–3762. doi:10.4049/jimmunol.173.6.3755.
- [22] Esche, C., Stellato, C. and Beck, L.A. (2005) 'Chemokines: Key players in innate and adaptive immunity', *Journal of Investigative Dermatology*, 125(4), str. 615–628. doi:10.1111/j.0022-202x.2005.23841.x.
- [23] Dangaj, D. in sod. (2019) 'Cooperation between constitutive and inducible chemokines enables T cell engraftment and immune attack in solid tumors', *Cancer Cell*, 35(6). doi:10.1016/j.ccell.2019.05.004.
- [24] González-Martín, A. in sod. (2011) 'Maximal T cell-mediated antitumor responses rely upon CCR5 expression in both CD4+ and CD8+ T cells', *Cancer Research*, 71(16), str. 5455–5466. doi:10.1158/0008-5472.can-11-1687.

- [25] Böttcher, J.P. in sod. (2018) 'NK cells stimulate recruitment of CDC1 into the tumor microenvironment promoting cancer immune control', *Cell*, 172(5). doi:10.1016/j.cell.2018.01.004.
- [26] Melaiu, O. in sod. (2020) 'Cellular and gene signatures of tumor-infiltrating dendritic cells and natural-killer cells predict prognosis of neuroblastoma', *Nature Communications*, 11(1). doi:10.1038/s41467-020-19781-y.
- [27] Kranjc, M.K. in sod. (2019) 'Cytokine CCL5 and receptor CCR5 axis in glioblastoma multiforme', *Radiology and Oncology*, 53(4), str. 397–406. doi:10.2478/raon-2019-0057.
- [28] Trellakis, S. in sod. (2011a) 'Polymorphonuclear granulocytes in human head and neck cancer: Enhanced inflammatory activity, modulation by cancer cells and expansion in advanced disease', *International Journal of Cancer*, 129(9), str. 2183–2193. doi:10.1002/ijc.25892.
- [29] Imai, T. in sod. (1997) 'The T cell-directed CC chemokine TARC is a highly specific biological ligand for CC chemokine receptor 4', *Journal of Biological Chemistry*, 272(23), str. 15036–15042. doi:10.1074/jbc.272.23.15036.
- [30] Scheu, S. in sod. (2017) 'The C-C chemokines CCL17 and CCL22 and their receptor CCR4 in CNS autoimmunity', *International Journal of Molecular Sciences*, 18(11), str. 2306. doi:10.3390/ijms18112306.
- [31] Semmling, V. in sod. (2010) 'Alternative cross-priming through CCL17-CCR4-mediated attraction of ctls toward NKT cell-licensed DCS', *Nature Immunology*, 11(4), str. 313–320. doi:10.1038/ni.1848.
- [32] Kanagawa, N. in sod. (2007) 'CC-chemokine ligand 17 gene therapy induces tumor regression through augmentation of tumor-infiltrating immune cells in a murine model of preexisting CT26 colon carcinoma', *International Journal of Cancer*, 121(9), str. 2013–2022. doi:10.1002/ijc.22908.
- [33] Cornforth, A.N. in sod. (2009) 'Increases in serum TARC/CCL17 levels are associated with progression-free survival in advanced melanoma patients in response to dendritic cell-based immunotherapy', *Journal of Clinical Immunology*, 29(5), str. 657–664. doi:10.1007/s10875-009-9299-3.
- [34] Milisav I. (2002) 'Zdravljenje z gensko terapijo', ZDRAV VESTN 2003.
- [35] Mountain, A. (2000) 'Gene therapy: The First decade', *Trends in Biotechnology*, 18(3), str. 119–128. doi:10.1016/s0167-7799(99)01416-x.
- [36] El-Aneed, A. (2004) 'An overview of current delivery systems in cancer gene therapy', *Journal of Controlled Release*, 94(1), str. 1–14. doi:10.1016/j.jconrel.2003.09.013.
- [37] Rosazza, C. in sod. (2016) 'Gene Electrotransfer: A mechanistic perspective', *Current Gene Therapy*, 16(2), str. 98–129. doi:10.2174/1566523216666160331130040.
- [38] Gehl, J. (2003) 'Electroporation: Theory and methods, perspectives for drug delivery, gene therapy and research', *Acta Physiologica Scandinavica*, 177(4), str. 437–447. doi:10.1046/j.1365-201x.2003.01093.x.
- [39] Miklavčič, D. in sod. (1998) 'The importance of electric field distribution for effective *in vivo* electroporation of tissues', *Biophysical Journal*, 74(5), str. 2152–2158. doi:10.1016/s0006-3495(98)77924-x.
- [40] Hait, W.N. (2010) 'Anticancer drug development: The grand challenges', *Nature Reviews Drug Discovery*, 9(4), str. 253–254. doi:10.1038/nrd3144.
- [41] DiMasi, J.A. in sod. (2013) 'Clinical approval success rates for Investigational Cancer Drugs', *Clinical Pharmacology & Therapeutics*, 94(3), str. 329–335. doi:10.1038/clpt.2013.117.
- [42] Hidalgo, M. in sod. (2014) 'Patient-derived xenograft models: An emerging platform for translational cancer research', *Cancer Discovery*, 4(9), str. 998–1013. doi:10.1158/2159-8290.cd-14-0001.
- [43] Lai, Y. in sod. (2017) 'Current status and perspectives of patient-derived xenograft models in cancer research', *Journal of Hematology & Oncology*, 10(1). doi:10.1186/s13045-017-0470-7.
- [44] Stewart, E. in sod. (2017) 'Orthotopic patient-derived xenografts of paediatric solid tumours', *Nature*, 549(7670), str. 96–100. doi:10.1038/nature23647.
- [45] Li, Q. in sod. (2019) 'DRAP: A Toolbox for Drug Response Analysis and visualization tailored for preclinical drug testing on patient-derived xenograft models', *Journal of Translational Medicine*, 17(1). doi:10.1186/s12967-019-1785-7.
- [46] Bozic, T. in sod. (2021) 'Gene electrotransfer of proinflammatory chemokines CCL5 and CCL17 as a novel approach of modifying cytokine expression profile in the tumor microenvironment', *Bioelectrochemistry*, 140, str. 107795. doi:10.1016/j.bioelechem.2021.107795.
- [47] Forjanic, T. in sod. (2019) 'Electroporation-induced stress response and its effect on gene electrotransfer efficacy: *in vivo* imaging and numerical modeling', *IEEE Transactions on Biomedical Engineering*, 66(9), str. 2671–2683. doi:10.1109/tbme.2019.2894659.

- [48] Kranjc, S. in sod. (2005) 'Radiosensitising effect of electrochemotherapy with bleomycin in LPB sarcoma cells and tumors in mice', *BMC Cancer*, 5(1). doi:10.1186/1471-2407-5-115.
- [49] What is R? R. Dostopno na: <https://www.r-project.org/about.html> (Dostopano: 14. oktober 2023).
- [50] Pauli, C. in sod. (2017) 'Personalized *in vitro* and *in vivo* cancer models to guide Precision Medicine', *Cancer Discovery*, 7(5), str. 462–477. doi:10.1158/2159-8290.cd-16-1154.
- [51] Pearson, A. in sod. (2016) 'High-level clonal *fgfr* amplification and response to FGFR inhibition in a translational clinical trial', *Cancer Discovery*, 6(8), str. 838–851. doi:10.1158/2159-8290.cd-15-1246.
- [52] Neurath, P., Hollander, M., Wolfe, D.A. (1976) 'Nonparametric statistical methods.', *Contemporary Sociology*, 5(4), str. 469. doi:10.2307/2063815.
- [53] Krepler, C. in sod. (2016) 'Personalized preclinical trials in BRAF inhibitor-resistant patient-derived xenograft models identify second-line combination therapies', *Clinical Cancer Research*, 22(7), str. 1592–1602. doi:10.1158/1078-0432.ccr-15-1762.
- [54] Castro, M.A. in sod. (2015) 'Regulators of genetic risk of breast cancer identified by Integrative Network Analysis', *Nature Genetics*, 48(1), str. 12–21. doi:10.1038/ng.3458.
- [55] Elso, C.M. in sod. (2003) 'Leishmaniasis host response loci (LMR1–3) modify disease severity through a th1/th2-independent pathway', *Genes & Immunity*, 5(2), str. 93–100. doi:10.1038/sj.gene.6364042.
- [56] Stewart, E. in sod. (2014) 'Targeting the DNA repair pathway in Ewing Sarcoma', *Cell Reports*, 9(3), str. 829–840. doi:10.1016/j.celrep.2014.09.028.
- [57] Gao, H. in sod. (2015) 'High-throughput screening using patient-derived tumor xenografts to predict clinical trial drug response', *Nature Medicine*, 21(11), str. 1318–1325. doi:10.1038/nm.3954.
- [58] Guo, S., Mao, B., Li, H.Q. (2017) 'Theory and methodology for the design and analysis of PDX Mouse Clinical Trials', *Cancer Research*, 77(13\_Supplement), str. 4534–4534. doi:10.1158/1538-7445.am2017-4534.
- [59] Zou, J. in sod. (2018) 'Establishment and genomic characterizations of patient-derived esophageal squamous cell carcinoma xenograft models using biopsies for treatment optimization', *Journal of Translational Medicine*, 16(1). doi:10.1186/s12967-018-1379-9.
- [60] Houghton, P.J. in sod. (2006) 'The Pediatric Preclinical Testing Program: Description of models and early testing results', *Pediatric Blood & Cancer*, 49(7), str. 928–940. doi:10.1002/pbc.21078.
- [61] Hoeflich, K.P. in sod. (2012) 'Intermittent administration of MEK inhibitor GDC-0973 plus PI3K inhibitor GDC-0941 triggers robust apoptosis and tumor growth inhibition', *Cancer Research*, 72(1), str. 210–219. doi:10.1158/0008-5472.can-11-1515.
- [62] Motwani, M., Pesiridis, S., Fitzgerald, K.A. (2019) 'DNA sensing by the cgas–sting pathway in health and disease', *Nature Reviews Genetics*, 20(11), str. 657–674. doi:10.1038/s41576-019-0151-1.
- [63] Mackenzie, K.J. in sod. (2017) 'CGAS surveillance of micronuclei links genome instability to innate immunity', *Nature*, 548(7668), str. 461–465. doi:10.1038/nature23449.
- [64] Chopra, S., Satkauskas, S. (2018) 'Electrotransfer of cytokine genes for cancer treatment', *CBU International Conference Proceedings*, 6, str. 1036–1041. doi:10.12955/cbup.v6.1291.
- [65] Daud, A.I. in sod. (2008) 'Phase I trial of interleukin-12 plasmid electroporation in patients with metastatic melanoma', *Journal of Clinical Oncology*, 26(36), str. 5896–5903. doi:10.1200/jco.2007.15.6794.
- [66] Bray, D. in sod. (2003) 'Combination nonviral interleukin 2 gene therapy and external-beam radiation therapy for head and neck cancer', *Archives of Otolaryngology–Head & Neck Surgery*, 129(6), str. 618. doi:10.1001/archotol.129.6.618.