

# ZBORNİK PRISPEVKOV IN POVZETKOV

*Novosti na področju  
radioterapije in  
radiobiologije:  
od raziskav do klinike*

3. junij 2022

Onkološki inštitut Ljubljana



Strokovni odbor Tanja Marinko, Onkološki inštitut Ljubljana  
Maja Čemažar, Onkološki inštitut Ljubljana

Organizacijski odbor: Tanja Marinko, Onkološki inštitut Ljubljana  
Maja Čemažar, Onkološki inštitut Ljubljana  
Simona Kranjc Brezar, Onkološki inštitut Ljubljana

Tehnična in administrativna podpora: Igor Josipovič, Onkološki inštitut Ljubljana  
Simona Kranjc Brezar, Onkološki inštitut Ljubljana

Sponzorji: Merck Sharp & Dohme, inovativna zdravila d.o.o.  
Pfizer Luxembourg SARL, Podružnica Ljubljana  
Merck d.o.o.  
Eli Lilly farmacevtska družba d.o.o.  
Bonifar d.o.o.  
VWR, International GmbH, Part of Avantor

## ZBORNİK PRISPEVKOV IN POVZETKOV

### Novosti na področju radioterapije in radiobiologije: od raziskav do klinike

Urednice: Tanja Marinko, Maja Čemažar, Simona Kranjc Brezar

Recenzenti: Maja Čemažar, Tanja Marinko, Gregor Serša, Primož Strojan

Tehnična urednica : Simona Kranjc Brezar

Oblikovanje: Simona Kranjc Brezar

Izdano pri: Onkološki inštitut Ljubljana  
Združenje za radioterapijo in onkologijo pri Slovenskem zdravniškem društvu

Tiskano pri: Fota-Cop d.o.o.

Izdaja: 1. izdaja, 100 izvodov

---

CIP - Kataložni zapis o publikaciji  
Narodna in univerzitetna knjižnica, Ljubljana

616-006-085.849(082)



NOVOSTI na področju radioterapije in radiobiologije: od raziskav do klinike (simpozij) (2022 ; Ljubljana)

Novosti na področju radioterapije in radiobiologije: od raziskav do klinike : zbornik prispevkov in povzetkov : znanstveni simpozij : 3. junij 2022, Onkološki inštitut Ljubljana / organizatorja Onkološki inštitut Ljubljana in Združenje za radioterapijo in onkologijo pri Slovenskem zdravniškem društvu ; [urednice Tanja Marinko, Maja Čemažar, Simona Kranjc Brezar]. - 1. izd. - Ljubljana : Onkološki inštitut : Združenje za radioterapijo in onkologijo pri Slovenskem zdravniškem društvu, 2022

ISBN 978-961-7029-45-1 (Onkološki inštitut)  
COBISS.SI-ID 108918275

# ZBORNİK PRISPEVKOV IN POVZETKOV

## Novosti na področju radioterapije in radiobiologije: od raziskav do klinike

Znanstveni simpozij

3. junij 2022

Onkološki inštitut Ljubljana

Organizatorja: Onkološki inštitut Ljubljana in Združenje za radioterapijo in onkologijo pri Slovenskem zdravniškem društvu



ONKOLOŠKI INŠTITUT  
INSTITUTE OF ONCOLOGY  
LJUBLJANA



**Slovensko  
Zdravniško  
Društvo**  
1861



# KAZALO VSEBINE

---

Program	5
Seznam prispevkov	8
Seznam povzetkov	9
Prispevki	11
Povzetki	58
Indeks avtorjev	73
Sponsorji	74



# PROGRAM

---

## *Petek, 3. junij 2022*

**8:00 - 8:30**      **Prijava udeležencev**

**8:30 - 8:40**      **Pozdravni nagovor**

*doc. dr. Tanja Marinko in prof. dr. Maja Čemažar*

**8:40 - 9:15**      **Artificial intelligence in radiation oncology**  
*prof. József Lövey, MD, Semmelweis University, Budapest*

## **Bazično aplikativne raziskave – 1. del**

---

*Moderator: prof. dr. Maja Čemažar*

**9:15 - 9:35**      **Učinki obsevanja dela tumorja na imunske populacije na tumorskem modelu mišjega karcinoma dojke 4T1**  
*znan. sod. dr. Tanja Jesenko, Onkološki inštitut Ljubljana*

**9:35 - 9:55**      **Liposomi, funkcionalizirani s stefinom A, kot sistem za ciljanje katepsinov S in L**  
*dr. Andreja Kozak, Institut Jožef Stefan*

**9:55 - 10:30**      **Odmor**

## **Bazične in aplikativne raziskave – 2. del**

---

*Moderator: prof. dr. Gregor Serša*

**10:30 - 10:50**      **Imunska genska terapija in možnost kombiniranja z radioterapijo**  
*prof. dr. Maja Čemažar, Onkološki inštitut Ljubljana*



# PROGRAM

---

*Petek, 3. junij 2022*

- 10:50 - 11:10**    **Odpornost glioblastoma na radioterapijo: vpliv rakavih matičnih celic in mikroolja tumorja**  
*doc. dr. Barbara Breznik, Nacionalni inštitut za biologijo*
- 11:10 - 11:30**    **Kombinacija obsevanja in žilno ciljane genske terapije za CD105 ter CD146**  
*doc. dr. Monika Savarin, Onkološki inštitut Ljubljana*
- 11:30 - 12:00**    **Odmor**

## **Klinične raziskave- 1.del**

---

*Moderator: doc. dr. Tanja Marinko*

- 12:00 - 12:20**    **miRNA kot označevalci odgovora na zdravljenje z obsevanjem pri raku dojke**  
*doc. dr. Katja Goričar, Medicinska fakulteta Univerza v Ljubljani*
- 12:20 - 12:40**    **Sedanost in prihodnost tarčnega radionuklidnega zdravljenja**  
*doc. dr. Luka Ležaič, Univerzitetni klinični center Ljubljana*
- 12:40 - 13:00**    **Akutna toksičnost pri radioterapiji raka analnega kanala**  
*izr. prof. dr. Irena Oblak, Onkološki inštitut Ljubljana*
- 13:00 - 13:20**    **Limfedem in omejena gibljivost rame po zdravljenju raka dojke – preliminarni rezultati prospektivne raziskave o celostni rehabilitaciji**  
*asist. Romi Cencelj-Arnež, Onkološki inštitut Ljubljana*
- 13:20 - 13:40**    **Odmor**

# PROGRAM

---

*Petek, 3. junij 2022*

## **Klinične raziskave- 2.del**

---

*Moderator: doc. dr. Katja Goričar*

- 13:40 - 14:00**    **Imunoterapija in obsevanje pri trojno negativnem raku dojk**  
*doc. dr. Tanja Marinko, Onkološki inštitut Ljubljana*
- 11:00 - 14:20**    **Vpliv indeksa puste telesne mase na preživetje bolnikov z rakom glave in vratu, obravnavanih v Enoti klinične prehrane Onkološkega inštituta med letoma 2014 in 2018**  
*Nina Lapornik, Onkološki inštitut Ljubljana*
- 14:20 - 14:40**    **Uporabnost FET PET/CT biomarkerjev pri diagnostiki ponovitve možganskih glijalnih tumorjev z različnim statusom IDH mutacij**  
*asist. dr. Marija Skoblar Vidmar, Onkološki inštitut Ljubljana*
- 14:40 - 15:00**    **Analiza ponovnih priprav pri raku glave in vratu na obsevalnem aparatu Halcyon 3.0 (Varian)**  
*Martina Majger, Onkološki inštitut Ljubljana*
- 15:00 - 15:10**    **Zaključek srečanja**

# SEZNAM PRISPEVKOV

1	<b>Odpornost glioblastoma na radioterapijo: vpliv rakavih matičnih celic in mikroolja tumorja</b> <i>doc. dr. Barbara Breznik</i>	12
2	<b>Imunska genska terapija in možnost kombiniranja z radioterapijo</b> <i>prof. dr. Maja Čemažar</i>	16
3	<b>miRNA kot označevalci odgovora na zdravljenje z obsevanjem pri raku dojk</b> <i>doc. dr. Katja Goričar</i>	21
4	<b>Sedanost in prihodnost tarčnega radionuklidnega zdravljenja</b> <i>doc. dr. Luka Ležaič</i>	25
5	<b>Imunoterapija in obsevanje pri trojno negativnem raku dojk</b> <i>doc. dr. Tanja Marinko</i>	31
6	<b>Kombinacija obsevanja in žilno ciljane genske terapije za CD105 ter CD146</b> <i>doc. dr. Monika Savarin</i>	37
7	<b>Uporabnost FET PET/CT biomarkerjev pri diagnostiki ponovitve možganskih glijalnih tumorjev z različnim statusom IDH mutacij</b> <i>asist. dr. Marija Skoblar Vidmar</i>	42
8	<b>Akutna toksičnost pri radioterapiji raka analnega kanala</b> <i>pred. dr. Valerija Žager Marciuš</i>	47
9	<b>Analiza ponovnih priprav pri raku glave in vratu na obsevalnem aparatu Halcyon 3.0 (Varian)</b> <i>pred. dr. Valerija Žager Marciuš</i>	54

# SEZNAM POVZETKOV

- 1 **Imunomodulatorni učinki radioterapije in genskega elektroprenosa plazmidne dna z zapisom za kemokina CCL5 in CCL17 na mišjih tumorjih**  
*Tim Božič* 59
- 2 **Limfedem in omejena gibljivost rame po zdravljenju raka dojk – preliminarni rezultati prospektivne raziskave o celostni rehabilitaciji**  
*Romi Cencelj-Arnež* 60
- 3 **Organoidi glioblastoma kot model za preučevanje odpornosti na terapijo**  
*Anamarija Habič* 62
- 4 **Učinki obsevanja dela tumorja na imunske populacije na tumorskem modelu mišjega karcinoma dojke 4T1**  
*znan.sod. dr. Tanja Jesenko* 63
- 5 **Izločanje dejavnika imunogene celične smrti HMGB1 iz celičnih linij se povečuje z dozo obsevanja**  
*Urša Kešar* 64
- 6 **Liposomi, funkcionalizirani s stefinom A, kot sistem za ciljanje katepsinov S in L**  
*dr. Andreja Kozak* 65
- 7 **Vpliv indeksa puste telesne mase na preživetje bolnikov z rakom glave in vratu, obravnavanih v enoti klinične prehrane Onkološkega inštituta med letoma 2014 in 2018**  
*Nina Lapornik* 66
- 8 **Aktivacija cGAS-STING signalne poti po obsevanju humanih tumorskih modelov karcinomov žrela**  
*Kristina Levpušček* 67
- 9 **Protitumorska učinkovitost genskega elektroprenosa plazmidne dna z zapisom za rekombinatno protitelo proti CTLA-4 v kombinaciji z obsevanjem**  
*znan. sod. dr. Boštjan Markelc* 69
- 10 **Vzpostavitev in ovrednotenje radioobčutljivosti HPV-pozitivnega mišjega modela ploščatoceličnega karcinoma ustnega predela**  
*Živa Modic* 70
- 11 **Razvoj avtologne tumorske vakcine pripravljene z obsevanjem**  
*dr. Tinkara Remic* 71



## PRISPEVKI

---

# ODPORNOST GLIOBLASTOMA NA RADIOTERAPIJO: VPLIV RAKAVIH MATIČNIH CELIC IN MIKROOLJA TUMORJA

Barbara Breznik<sup>1</sup>, Bernarda Majc<sup>1,2</sup>, Anamarija Habič<sup>1,2</sup>, Urška Ušeničnik<sup>1</sup>, Andrej Porčnik<sup>3</sup>, Roman Bošnjak<sup>3</sup>, Jernej Mlakar<sup>4</sup>, Marija Skoblar Vidmar<sup>5</sup>, Tanja Jesenko<sup>5</sup>, Maja Čemažar<sup>5</sup>, Tamara Lah Turnšek<sup>1</sup>, Metka Novak<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Oddelek za genetsko toksikologijo in biologijo raka, Nacionalni inštitut za biologijo, Večna pot 111, 1000 Ljubljana, Slovenija

<sup>2</sup> Mednarodna podiplomska šola Jožefa Stefana, Jamova cesta 39, 1000 Ljubljana, Slovenija

<sup>3</sup> Klinični oddelek za nevrokirurgijo, Univerzitetni klinični center Ljubljana, Zaloška cesta 7, 1000 Ljubljana, Slovenija

<sup>4</sup> Inštitut za patologijo, Medicinska fakulteta, Univerza v Ljubljani, Korytkova 2, 1000 Ljubljana, Slovenija

<sup>5</sup> Oddelek za eksperimentalno onkologijo, Onkološki inštitut Ljubljana, Zaloška cesta 2, 1000 Ljubljana, Slovenija

Elektronski naslov: barbara.breznik@nib.si

---

## Izvleček

Glioblastom je najpogostejši možganski tumor pri odraslih z zelo slabo prognozo preživetja bolnikov. Ta je posledica odpornosti glioblastoma na standardno zdravljenje, ki vključuje radioterapijo in kemoterapijo. Z namenom načrtovanja učinkovitejših pristopov zdravljenja preučujemo biološke mehanizme odpornosti glioblastoma na radioterapijo s poudarkom na mikrookolju tumorja in rakavih matičnih celicah. V predkliničnih raziskavah uporabljamo napredne in personalizirane celične modele, ki posnemajo mikrookolje tumorja v bolnikih in z večjo natančnostjo napovedo odziv bolnika na zdravljenje. Hkrati so takšni modeli pomembni za testiranje novih pristopov za zdravljenje kot je imunoterapija.

---

## Uvod

Glioblastom je najpogostejši in najagresivnejši primarni možganski tumor pri odraslih. Kljub napredku v onkološkem zdravljenju večine rakov v zadnjih 16 letih ni prišlo do bistvenih izboljšav pri zdravljenju glioblastoma in se pričakovana življenjska doba bolnikov v tem obdobju ni bistveno spremenila. Radioterapija skupaj s kirurško odstranitvijo tumorja in kemoterapijo predstavlja standardno zdravljenje glioblastoma (1).

Glavne izzive pri zdravljenju glioblastoma in načrtovanju novih pristopov zdravljenja predstavljajo odpornost na kemoterapijo in radioterapijo ter heterogenost glioblastoma. Glioblastom je namreč zelo heterogen tumor, tako med različnimi bolniki kot znotraj posameznega tumorja. Glioblastome klasificiramo v različne podtipе glede na molekularni profil. Ti podtipi se poleg aktivacije različnih signalnih poti med seboj razlikujejo v preživetju bolnikov in njihovem odzivu na terapijo (1-3). Mikrookolje glioblastoma je sestavljeno iz rakavih matičnih in diferenciranih rakavih celic ter nerakavih imunskih in drugih stromalnih celic kot so makrofagi, mikroglia, limfociti,

endotelijske celice in mezenhimske matične celice. Preko medcelične komunikacije in infiltracije imunskih celic je mikrookolje ključen dejavnik pri odzivu tumorja na terapijo (3).

V raziskavah patobiologije glioblastoma na Nacionalnem inštitutu za biologijo (NIB) uporabljamo tumorske vzorce bolnikov z glioblastomom in napredne tridimenzionalne (3D) eksperimentalne tumorske modele, s katerimi posnemamo heterogenost in mikrookolje tumorjev v bolnikih. S pomočjo modelov preučujemo učinke radioterapije na rakave celice kot tudi učinke radioterapije v kombinaciji z drugimi načini zdravljenja kot je kemoterapija na mikrookolje glioblastoma.

### **Rakave matične celice so odporne na radioterapijo**

Rakave matične celice so populacija rakavih celic, ki imajo sposobnost samoobnavljanja in iniciacije tumorja. V tej populaciji celic se aktivirajo signalne poti, ki so značilne za zdrave matične celice in razvoj, ter izražajo biološke označevalce kot so CD133, SOX2, OLIG2, nestin, CD44 in CD9, ki omogočajo izolacijo in detekcijo teh celic v tumorskih tkivih. V glioblastomu je dokazano, da so rakave matične celice odporne na radioterapijo, saj imajo aktivirane različne signalne poti Hedgehog, Wnt, TGF- $\beta$ , mezenhimski podtip ter odzive in popravljalne mehanizme poškodb DNA, ki omogočajo preživetje celic po obsevanju (4). V naši raziskavi smo s testom klonogenosti *in vitro* dokazali, da so glioblastomske matične celice odpornejše na obsevanjekot diferencirane glioblastomske celice. Delež preživelih celic po enkratni dozi sevanja 10 Gy je pri glioblastomskih matičnih celicah 0,3, medtem ko diferencirane glioblastomske celice niso preživele po enkratni dozi sevanja 8 Gy ali več. Enkratna nizka doza obsevanja 2 Gy je povzročila pospešeno invazijo glioblastomskih matičnih celic skozi Matrigel v Boydenovih kamricah.

### **Mikrookolje tumorjev štiti rakave celice pred terapijo**

Fenotip in lastnosti rakavih matičnih celic so odvisne od mikrookolja, v katerem se te celice nahajajo. Pokazali smo, da se rakave matične celice v glioblastomu nahajajo v tkivnih nišah ob tumorskem žilju, kjer medsebojna celična interakcija ustvarja zaščitno mikrookolje, ki štiti rakave matične celice pred učinki terapije in imunskim odzivom. Biološke označevalce rakavih matičnih celic smo detektirali ob tumorskem žilju, kjer so prisotne endotelijske celice, gladkomišične celice in mezenhimske matične celice (5). Razumevanje niš je ključnega pomena za razvoj novih terapevtikov usmerjenih proti rakavim matičnim celicam, vendar so učinki stromalnih celic, kot so mezenhimske matične celice, na rakave matične celice slabo raziskani. Mezenhimske matične celice so odrasle ne-hematopoetske multipotentne celice, ki se nahajajo v različnih tkivih in jih telo uporablja za regeneracijo ob poškodbah, infiltrirajo pa tudi v glioblastom. Poleg tega se uporabljajo kot celični vektorji za zdravljenje različnih bolezni (6).

Postavili smo 3D model kokultur rakavih matičnih celic in mezenhimskih matičnih celic, da bi vzpostavili nišo rakavih matičnih celic *in vitro* in na takšnem modelu raziskali vpliv medsebojnih celičnih interakcij na odziv na radioterapijo.

Ugotovili smo, da se je po obsevanju (1x 6 Gy) ob prisotnosti mezenhimskih matičnih celic več rakavih matičnih celic nahajalo v fazah G<sub>0</sub>/G<sub>1</sub> in S celičnega cikla in da je manjši delež rakavih matičnih celic proliferiral (Ki67+ celice) v primerjavi z obsevano



monokulturo rakavih matičnih celic. V raziskavi smo odkrili, da rakave matične celice, obsevane z nizko dozo 2 Gy, pospešeno invadirajo k mezenhimskim matičnim celicam v primerjavi z neobsevanimi celicami. Ta proces poteka pod vplivom kemokinske signalne poti CXCL12/CXCR4. Blokiranje te signale poti z antagonistom kemokinskega receptorja CXCR4 pleriksatorjem je namreč povzročilo inhibicijo invazije obsevanih rakavih matičnih celic k mezenhimskim matičnim celicam. V *in vitro* celičnih modelih smo ugotovili, da mezenhimske matične celice spremenijo odziv rakavih celic na radioterapijo.

### **Organoidi kot tumorski model za preučevanje odpornosti glioblastoma na terapijo in testiranje novih pristopov za zdravljenje**

Na NIB-u smo skupaj s partnerji UKC Ljubljana, Onkološkim inštitutom Ljubljana, Medicinsko fakulteto UL in Inštitutom za patologijo, UL, vzpostavili regionalno raziskovalno biobanko gliomov, v sklopu katere zbiramo tumorski material in klinične podatke bolnikov z gliomi. Poleg tumorskih biopsij in izoliranih rakavih (matičnih) celic iz tumorjev bolnikov imamo vzpostavljene organoide glioblastoma. Organoidi predstavljajo napredne in personalizirane 3D tumorske modele, ki vključujejo tumorsko mikrookolje in molekularni profil tumorja bolnika, iz katerega so izolirani (7,8). Organoide vzpostavimo iz tumorskih biopsij, jih molekularno okarakteriziramo ter uporabimo v nadaljnjih eksperimentih. Na organoidih preučujemo odziv ter molekularne mehanizme odpornosti glioblastoma na radio- in kemoterapijo. Ugotovili smo, da enkratna doza obsevanja (10 Gy) v kombinaciji s kemoterapijo ne povzroči sprememb v viabilnosti ter invaziji organoidov glioblastoma. Smo pa pokazali, da pride v tretiranih organoidih do povečanega izražanja genov, ki kodirajo proteine, udeležene v regulaciji celičnega cikla in stabilizaciji signalne poti p53. Organoidi glioblastoma posnemajo ključne značilnosti ter dinamično sestavo mikrookolja tumorjev, kar omogoča raziskave odzivnosti in odpornosti glioblastoma na terapijo.

### **Zaključek**

Glioblastom je odporen na radioterapijo, zato je potrebno raziskati biološke mehanizme odpornosti za načrtovanje učinkovitejših pristopov zdravljenja. Na radioterapijo odporne rakave matične celice in njihovo mikrookolje, ki jih ščiti pred terapijo, so pomemben dejavnik pri napredovanju glioblastoma. V raziskavah se poslužujemo naprednih tumorskih modelov, ki vključujejo mikrookolje in heterogenost tumorjev, s katerimi lahko natančneje ocenimo odziv na zdravljenje pri bolnikih.

### **Zahvala**

Raziskave potekajo ob finančni podpori Javne agencije za raziskovalno dejavnost Republike Slovenije (P1-0245, P3-0003, J3-2526, Z3-1870, MR Bernarda Majc in Anamarija Habič) in v sklopu projekta Interreg Italija-Slovenija TRANS-GLIOMA.

### **Literatura**

1. Weller M, van den Bent M, Preusser M, Le Rhun E, Tonn JC, Minniti G, et al. EANO guidelines on the diagnosis and treatment of diffuse gliomas of adulthood. *Nat Rev Clin Oncol.* 2021;(3):170-186. doi: 10.1038/s41571-020-00447-z.

2. Verhaak RG, Hoadley KA, Purdom E, Wang V, Qi Y, Wilkerson MD, Miller CR, et al. Cancer Genome Atlas Research Network. Integrated genomic analysis identifies clinically relevant subtypes of glioblastoma characterized by abnormalities in PDGFRA, IDH1, EGFR, and NF1. *Cancer Cell*. 2010;17(1):98-110. doi: 10.1016/j.ccr.2009.12.020.
3. Lah TT, Novak M, Breznik B. Brain malignancies: Glioblastoma and brain metastases. *Semin Cancer Biol*. 2020;60:262-273. doi: 10.1016/j.semcancer.2019.10.010.
4. Bao S, Wu Q, McLendon RE, Hao Y, Shi Q, Hjelmeland AB, et al. Glioma stem cells promote radioresistance by preferential activation of the DNA damage response. *Nature*. 2006;444(7120):756-60. doi: 10.1038/nature05236.
5. Hira VVV, Breznik B, Vittori M, Loncq de Jong A, Mlakar J, Oostra RJ, et al. Similarities between stem cell niches in glioblastoma and bone marrow: rays of hope for novel treatment strategies. *J Histochem Cytochem*. 2020;68(1):33-57. doi: 10.1369/0022155419878416.
6. Breznik B, Motaln H, Vittori M, Rotter A, Lah Turnšek T. Mesenchymal stem cells differentially affect the invasion of distinct glioblastoma cell lines. *Oncotarget*. 2017;8(15):25482-25499. doi: 10.18632/oncotarget.16041.
7. Jacob F, Ming GL, Song H. Generation and biobanking of patient-derived glioblastoma organoids and their application in CAR T cell testing. *Nat Protoc*. 2020;15(12):4000-4033. doi: 10.1038/s41596-020-0402-9.
8. Majc B, Novak M, Kopitar-Jerala N, Jewett A, Breznik B. Immunotherapy of glioblastoma: current strategies and challenges in tumor model development. *Cells*. 2021;10(2):265. doi: 10.3390/cells10020265.



# IMUNSKA GENSKA TERAPIJA IN MOŽNOST KOMBINIRANJA Z RADIOTERAPIJO

Maja Čemažar<sup>1,2</sup> in Gregor Serša<sup>1,3</sup>

<sup>1</sup> *Oddelek za eksperimentalno onkologijo, Onkološki inštitut Ljubljana, Zaloška cesta 2, 1000 Ljubljana, Slovenija*

<sup>2</sup> *Fakulteta za vede o zdravju, Univerza na Primorskem, Polje 42, 6310 Izola, Slovenija*

<sup>3</sup> *Zdravstvena fakulteta, Univerza v Ljubljani, Zdravstvena pot 5, 1000 Ljubljana, Slovenija*

Elektronski naslov: mcemazar@onko-i.si; gserša@onko-i.si

---

## Izvleček

V prispevku bomo predstavili gensko imunoterapijo z interlevkinom 12 (IL-12), od predkliničnih študij do klinične študije faze I, ki se trenutno izvaja na Onkološkem inštitutu Ljubljana in Kliniki za otorinolaringologijo in maksilofacialno kirurgijo Univerzitetnega kliničnega centra Ljubljana. Poleg tega bomo predstavili osnove za kombinacijo imunskih terapij z lokalnimi ablativnimi terapijami, kot je radioterapija.

**Ključne besede:** bazalno celični karcinom, interlevkin 12, elektroporacija, genski elektroprenos, klinična študija faze I

---

## Uvod

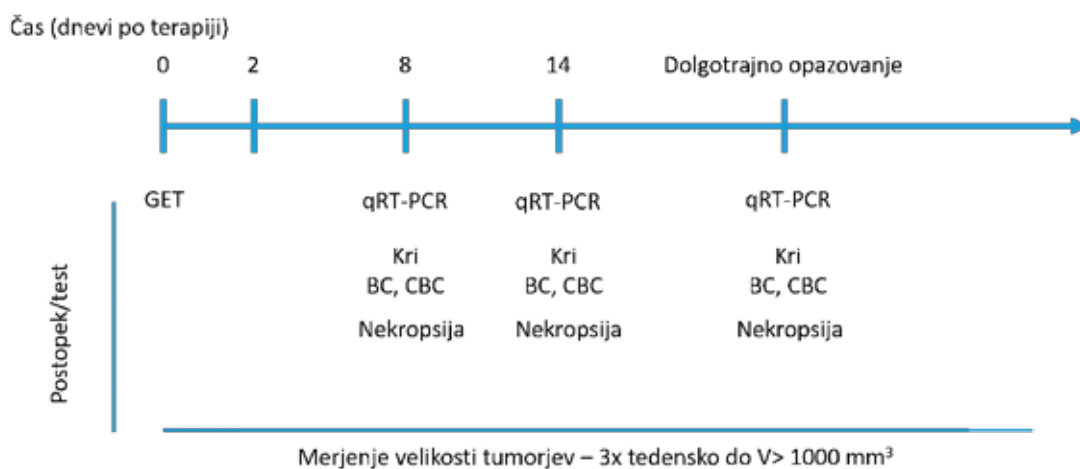
Kombinacija imunskih terapij z radioterapijo predstavlja velik izziv za raziskovalce, predvsem v iskanju pravih doz, vrstnega reda terapij in trajanja zdravljenja. Največ raziskav na področju radioterapije poteka z zaviralci imunskih kontrolnih točk. Poleg zaviralcev imunskih kontrolnih točk, pa se lahko uporabljajo tudi druge imunske molekule, kot so citokini. V naših raziskavah uporabljamo citokin interlevkin-12 (IL-12), ki ga vnesemo v celice v obliki zapisa na plazmidni DNA molekuli, kjer se potem prevede v terapevtski protein. Na osnovi dolgoletnih predkliničnih raziskav na različnih vrstah tumorjev, smo zastavili klinično preizkušanje faze I z genskim elektroprenosom plazmida z zapisom za IL-12. Za pridobitev dovoljenja za izvajanje kliničnega preizkušanja smo izvedli tudi ne-klinično testiranje zdravila. Namen faze I kliničnega preskušanja je preučiti varnost in sprejemljivost zdravila za gensko terapijo, plazmida pIL12, pri zdravljenju bazalnoceličnih karcinomov v predelu glave in vratu. Študija je zasnovana kot študija s povečevanjem odmerka z namenom ugotavljanja varnosti in sprejemljivosti zdravljenja. Poleg tega želimo ugotoviti kateri odmerek plazmida pIL12 je varen in hkrati izzove biološko aktivnost interlevkina 12 (IL-12). Rezultati te študije bodo osnova za nadaljnje klinične študije, kjer bi gensko terapijo kombinirali s standardnimi lokalnimi terapijami, kot je radioterapija.

## Genska imunoterapija z interleukinom 12

Terapije raka s spodbujanjem imunskega sistema se na najrazličnejše načine uporabljajo že vrsto let. V zadnjem času se intenzivno razvijajo terapije v obliki genske imunoterapije,

ki temelji na tem, da v organizem vnesemo gen za citokin, ki se potem v celicah izraža v nizkih količinah, ter dalj časa. To ne vodi v povišane serumske koncentracije in s tem povezano toksičnostjo in neželene učinke. Med najbolj raziskanimi citokini za zdravljenje raka je IL-12, ki nima direktnega citotoksičnega učinka na tumorske celice, ampak je ta učinek posredovan preko različnih mehanizmov. IL-12 sodeluje pri diferenciaciji naivnih celic T v celice Th1, poleg tega spodbuja rast in delovanje celic T. Spodbuja nastajanje in izločanje interferona gama (IFN- $\gamma$ ) in tumorskega nekroznega faktorja alfa (TNF- $\alpha$ ) iz celic T in naravnih celic ubijalk (NK). IL-12 ima tudi antiangiogeno delovanje, kar pomeni, da lahko blokira nastajanje novih krvnih žil. To stori preko posredovanja IFN- $\gamma$ , ki poveča proizvodnjo kemokina, imenovanega inducibilni protein-10 (IP-10 ali CXCL10).

Vnos genov v tarčne celice lahko izvedemo na več načinov, z virusnimi vektorji ali nevirusnimi vektorji, kamor spada tudi vnos plazmidne DNA z elektroporacijo – genski elektroprenos (GET). Genska imunoterapija z IL-12, ki je bila posredovana z GET, se je v mnogih predkliničnih študijah izkazala za uspešno na različnih tumorskih modelih. V neklinični študiji smo zaradi biološke neaktivnosti humanega IL-12 v miših uporabili plazmid z mišjim genom za IL-12 (plazmid pmIL12). Študijo smo izvedli na obeh spolih miši, kar je v skladu s najnovejšimi smernicami Evropske agencije za zdravila.



Slika 1. Potek poskusov na *in vivo* nivoju ne-kliničnega testiranja z izbranimi točkami testiranja. GET – genski elektroprenos, qRT-PCR – kvantitativni real time PCR, BC – biokemija, CBC – kompletna krvna slika, IgG/IgM – določevanje količine protiteles IgG in IgM v serumu.

V ne-klinični študijo smo v različnih časovnih točkah določevali biološko aktivnost, farmakodinamiko, farmakokinetiko, toksičnost in imunogenost plazmida pmIL12 (slika 1). Rezultati neklinične študije so pokazali, da v celicah nastaja biološko aktiven protein, ki ima protitumorsko učinkovitost, saj statistično značilno poveča tako zaostanek v rasti tumorjev kot preživetje miši in sicer pri vseh treh testiranih dozah. Dva dni po genskem elektroprenosu s pmIL12 v tumorje CT26, smo zaznali prisotnost pmIL12 v vseh analiziranih organih/tkivih, razen v očesu ter pljučih, štirinajst dni po genskem elektroprenosu pa je prisoten samo še v koži nad in okoli tumorja. Dokazali smo, da nastaja biološko aktiven protein mIL-12, ki poveča infiltracijo imunskih celic v tumor

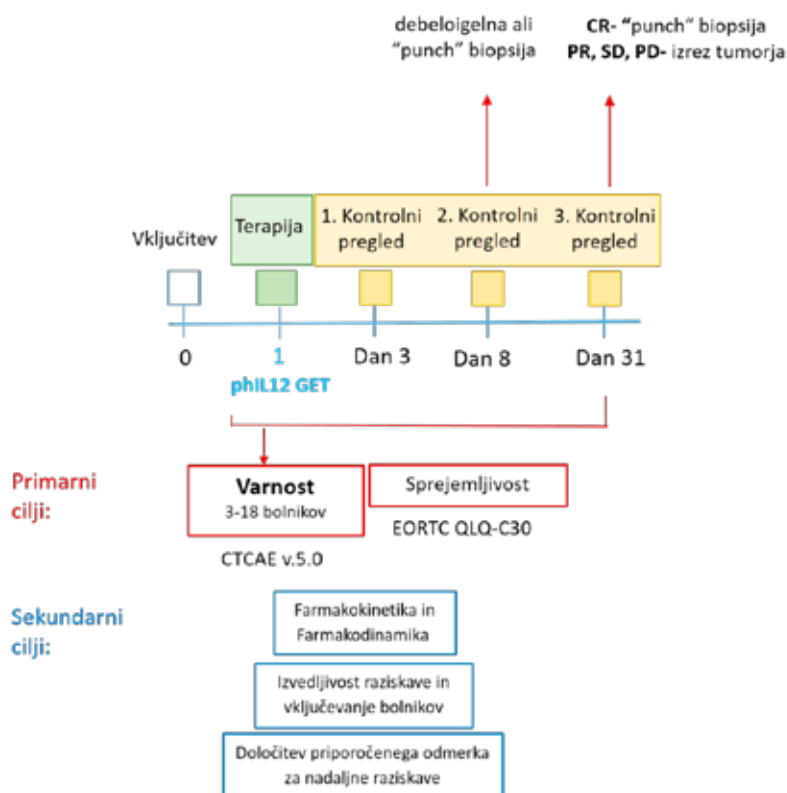
ter kožo nad in okoli tumorja in da na sistemskem nivoju ne povzroča nobenih zaznavnih toksičnih sprememb v primerjavi z naivnimi in kontrolnimi mišmi. Na osnovi teh rezultatov, smo pripravili dokumentacijo za prijavo klinične faze I pri bolnikih z bazalno celičnim karcinomom.

### Klinična študija faze I pri bazalno celičnem karcinomu

V fazi I klinične študije so vključeni bolniki z bazalno celičnim karcinomom, ki ima največje mutacijsko breme v primerjavi z drugimi kožnimi raki, in je zato primeren tip tumorja za testiranje imunskih terapij. Klinično študijo smo zasnovali kot nerandomizirano študijo faze 1 za testiranje varnosti in sprejemljivosti naraščajočega odmerka plazmidne DNA phIL12 pri zdravljenju operabilnih bazalno celičnih karcinomov v področju glave in vratu.

Primarna cilja študije sta oceniti varnost in sprejemljivost genske imuno terapije. Sekundarni cilji pa so določiti farmakokinetiko, farmakodinamiko, izvedljivost raziskave in predvsem določiti odmerek plazmida, ki vodi v produkcijo proteina IL-12, ki je biološko aktiven, povzroči infiltracijo imunskih celic v tumor in ni toksičen, kar bo osnova za nadaljnje klinične raziskave.

Študijo sta odobrili Komisija Medicinske etike Republike Slovenije (RS) (0120-524/2020-12) in Javna agencija za zdravila in medicinske pripomočke RS. Študijo smo registrirali v podatkovni bazi ISRCTN (ISRCTN15479959) in Clinical Trials (NCT05077033), kjer so navedeni tudi vsi vključitveni in izključitveni kriteriji. Shema zdravljenja in kontrolni pregledi so predstavljeni na sliki 1.



Slika 2: Shema poteka klinične raziskave.

V študiji bomo testirali 3 odmerke pHIL12 (0,5 mg/mL, 1 mg/mL and 2 mg/mL). Odmerke plazmidne DNA, protokol elektroporacije in število ponovitev terapije smo določili v ne-kliničnem delu študije, ki smo jo izvedli z mišjim ortologom pHIL12 (pmIL12). Zdravljenje bomo izvedli v splošni anesteziji ali sedaciji, odvisno od presoje anesteziologa. Plazmidna DNA bo injicirana intratumorsko in 5 minut za tem bomo na tumor dovedli električne pulze, ki se uporabljajo za elektrokemoterapijo, z generatorjem električnih pulzov Cliniporator. Po koncu terapije bo rana oskrbljena s standardnimi postopki. Ko se bodo bolniki prebudili iz anestezije, bo ocenjena toksičnost in morebitni neželeni učinki ter bolečina po zdravljenju (VAS lestvica). O času odpusta in potrebi po analgeziji se odloči glavni raziskovalec. Kontrolni pregledi so predvideni 3, 8, in 31 dan, kjer bomo bolnikom jemali brise iz mesta aplikacije plazmida, kri in bioptični vzorec za določitev farmakodinamike (koncentracija IL-12 in interferona  $\gamma$  v tumorju, število kopij plazmida v tumorju) in farmakokinetike (koncentracija IL-12 v serumu). Varnost terapije se bo ocenila po kriterijih CTCAEv5.0. Sprejemljivost terapije se bo spremljala z vprašalnikom o kakovosti življenja EORTC QLQ-C30. Če 31. dan po terapiji ne bo dosežen popolni odgovor tumorja, bo le-ta kirurško odstranjen. Odgovor tumorja se bo določal po RECISTv1.1 kriteriju.

Do sedaj smo v študijo vključili 4 bolnike; trije so bili zdravljeni z najnižjim odmerkom plazmida (0,5 mg/mL), eden pa s srednjim odmerkom 1 mg/mL). Pri vseh smo ugotovili, da je terapija varna, sprejemljiva, izvedljiva in da neželenih učinkov ni bilo. Pri vseh bolnikih je bila izvedena tudi kirurška odstranitev tumorja po 31. dnevu, ker sama genska imunska terapija z IL-12 pri uporabljenih odmerkih pHIL12 ni vodila v popolni odgovor tumorja.

### **Kombinacija z radioterapijo**

Genska imunska terapija z IL-12 v kombinaciji z radioterapijo, vključno z stereotaktičnim obsevanje je bila testirana v predkliničnih študijah na različnih tumorskih modelih, vključno z tumorji pankreasa. Dokazano je bilo, da dosežemo boljši protitumorski učinek kot z samo radioterapijo in da se razvije tudi imunski spomin. Kot vektorje za lokalni vnos IL-12 so bili uporabljene, mikrosfere za rekombinanten IL-12, ter adenovirusni vektorji, in tudi genski elektroprenos plazmidne DNA. Radioterapija se uporablja v kombinaciji z imunskimi terapijami kot in situ vakcinacija, ki povzroči sproščanje tumorskih antigenov, ki sprožijo z IL-12 povezan protitumorski imunski odziv. Kombinacija genskih imunskih terapij in radioterapije ima sposobnost, da močno okrepi sistemski imunski odziv in s tem širi uporabnost na napredovale bolezni. Izzivi, ki obstajajo za nadaljnje študije pa so predvsem v iskanju prave doze in frakcioniranega režima obsevanja, doze in načina aplikacije plazmidne DNA, optimalne sestave plazmidne DNA, parametrov genskega elektroprenosa, časovnega zaporedja terapij, ter seveda v iskanju prediktivnih biomarkerjev za selekcijo tumorjev/bolnikov, ki so primerni za tako zdravljenje.

### **Literatura**

1. Bhatia S, Longino NV, Miller NJ, Kulikauskas R, Iyer JG, Ibrani D, et al. Intratumoral delivery of plasmid IL12 via electroporation leads to regression of injected and noninjected tumors in Merkel cell carcinoma. Clin Cancer Res. 2020;26:598-607. doi: 10.1158/1078-0432.CCR-19-0972

2. Cemazar M, Jarm T, Sersa G. Cancer Electrogene Therapy with Interleukin-12. *Curr Gene Ther.* 2010;10:300-11. doi: 10.2174/156652310791823425
3. Daud AI, DeConti RC, Andrews S, Urbas P, Riker AI, Sondak VK, et al. Phase I trial of interleukin-12 plasmid electroporation in patients with metastatic melanoma. *J Clin Oncol.* 2008;26:5896-903. doi: 10.1200/JCO.2007.15.6794
4. Kos S, Bosnjak M, Jesenko T, Markelc B, Kamensek U, Znidar K, et al. Non-clinical *in vitro* evaluation of antibiotic resistance gene-free plasmids encoding human or murine IL-12 intended for first-in-human clinical study. *Pharmaceutics.* 2021;13:1739. doi: 10.3390/PHARMACEUTICS13101739
5. Groselj A, Bosnjak M, Jesenko T, Cemazar M, Markelc B, Strojan P, Sersa G. Treatment of skin tumors with intratumoral interleukin 12 gene electrotransfer in the head and neck region: a first-in-human clinical trial protocol. *Radiol Oncol.* 2022; in press. doi:10.2478/raon-2022-0021
6. Čemažar M, Jesenko T, Bošnjak M, Markelc B, Kamenšek U, Kranjc Brezar S, et al. Genska terapija v onkologiji, prvi razvojni koraki v Sloveniji / Gene therapy in oncology, first steps of development in Slovenia. *Onkologija* 2022;16:12-21. doi:10.25670/oi2022-002on
7. Telli ML, Nagata H, Wapnir I, Acharya CR, Zablotsky K, Fox BA, et al. Intratumoral plasmid IL12 expands CD8 + T cells and induces a CXCR3 gene signature in triple-negative breast tumors that sensitizes patients to anti-PD-1 therapy. *Clin Cancer Res.* 2021;27:2481-93. doi: 10.1158/1078-0432.CCR-20-3944
8. Yu CF, Chang CH, Wang CC, Hong JH, Chiang CS, Chen FH. Local interleukin-12 treatment enhances the efficacy of radiation therapy by overcoming radiation-induced immune suppression. *Int J Mol Sci.* 2021;22(18):10053. doi: 10.3390/ijms221810053.
9. Mills BN, Connolly KA, Ye J, Murphy JD, Uccello TP, Han BJ, et al. Stereotactic Body radiation and interleukin-12 combination therapy eradicates pancreatic tumors by repolarizing the immune microenvironment. *Cell Rep.* 2019;8;29(2):406-21.e5. doi: 10.1016/j.celrep.2019.08.095.



# miRNA KOT OZNAČEVALCI ODGOVORA NA ZDRAVLJENJE Z OBSEVANJEM PRI RAKU DOJK

Katja Goričar<sup>1,2</sup>, Vita Dolžan<sup>1</sup>, Tanja Marinko<sup>2,3</sup>

<sup>1</sup> Laboratorij za farmakogenetiko, Inštitut za biokemijo in molekularno genetiko, Medicinska fakulteta, Univerza v Ljubljani, Vrazov trg 2, 1000 Ljubljana, Slovenija

<sup>2</sup> Onkološki inštitut Ljubljana, Zaloška cesta 2, 1000 Ljubljana, Slovenija

<sup>3</sup> Medicinska fakulteta, Univerza v Ljubljani, Vrazov trg 2, 1000 Ljubljana, Slovenija

Email: katja.goricar@mf.uni-lj.si

---

## Izvleček

Med bolnicami z rakom dojk obstajajo velike razlike v pojavnosti neželenih učinkov po obsevanju, k čemur lahko prispevajo tudi različni molekularni dejavniki. V raziskavi želimo poiskati miRNA, ki bi lahko služile kot označevalci odgovora na zdravljenje z obsevanjem ter raziskati povezavo med izražanjem miRNA v plazmi in neželenimi učinki zdravljenja z obsevanjem na koži in na srcu pri bolnicah z duktalnim karcinomom *in situ*.

---

## Uvod

Rak dojk je najpogostejša oblika raka pri ženskah in njegova incidenca še narašča (1). Okoli 20 % novo ugotovljenih primerov raka dojk predstavlja duktalni karcinom *in situ* (angl. ductal carcinoma *in situ*, DCIS), neinvazivna oblika raka dojk, ki se razvije v duktusu mamarne žleze (2).

Bolnice z DCIS večinoma zdravimo kirurško in z obsevanjem. Dopolnilno obsevanje izboljša lokalno kontrolo bolezni, vendar pa se pri bolnicah, ki se zdravijo z obsevanjem, lahko pojavijo tako akutni kot kasni neželeni učinki zdravljenja, kar zmanjšuje kakovost življenja bolnic (3). Najpogosteje se pojavijo neželeni učinki na koži, med najbolj problematičnimi pa so neželeni učinki na srcu.

Sedanje strategije zdravljenja DCIS temeljijo na konvencionalnih klinično-patoloških napovednih dejavnikih in ne omogočajo prilagajanja zdravljenja na podlagi individualnega tveganja za ponovitev bolezni, napredovanje v invazivno bolezen ali pojav neželenih učinkov, kar lahko vodi v premalo ali preveč agresivno zdravljenje (3-5). K interindividualnim razlikam v pojavnosti neželenih učinkov po obsevanju lahko prispevajo tudi različni molekularni dejavniki, med drugimi tudi miRNA.

miRNA so kratke nekodirajoče RNA, vključene v potranskripcijsko uravnavanje izražanja genov. Vežejo se na 3'-neprevedljivo regijo tarčnih mRNA, kar vodi do zmanjšanja translacije ali celo razgradnje mRNA (6). Pri raku je uravnavanje miRNA spremenjeno, kar lahko spodbudi ali inhibira napredovanje tumorjev ali metastaz (2). Različne miRNA lahko uravnavajo celični cikel, apoptozo, celično proliferacijo in diferenciacijo, migracijo, invazijo in metastaziranje (7). V tumorskem tkivu in krvi bolnic z rakom dojk je pogosto povišana raven izražanja onkogenih miRNA, ki uravnavajo izražanje tumor supresorskih genov. Pri DCIS so miRNA vpletene v regulacijo adhezije celic, signalizacijo TGF- $\beta$  in v modulacijo zunajceličnega matriksa (2). Raziskave kažejo, da lahko miRNA sodelujejo



tudi pri odgovoru na zdravljenje z obsevanjem, njihova vloga pri razvoju neželenih učinkov obsevanja pa še ni dobro pojasnjena (8).

V naši raziskavi želimo poiskati miRNA, ki bi lahko služile kot označevalci odgovora na zdravljenje z obsevanjem, ter raziskati povezavo med izražanjem miRNA v plazmi in neželenimi učinki zdravljenja z obsevanjem pri bolnicah z DCIS.

## **Zasnova raziskave in metode**

### **Bioinformatična analiza**

S pomočjo podatkovnih zbirk in pregleda literature smo določili nabor miRNA, ki so povezane z izpostavljenostjo sevanju v različnih modelnih sistemih (6). Z uporabo podatkovne zbirke Human microRNA Disease Database (HMDD) smo poiskali miRNA, povezane z rakom dojk, za katere so potrdili, da se spremenjeno izražajo v krvi (9). Za miRNA smo preverili tudi izražanje v tumorskem tkivu raka dojk v podatkovni zbirki miR-TV, ki omogoča analizo podatkov, zbranih v zbirki The Cancer Genome Atlas (TCGA) (10).

Ker na izražanje miRNA lahko vplivajo tudi genetske spremembe, smo v genih, ki kodirajo za izbrane miRNA, s pomočjo pregleda literature in podatkovne zbirke dbSNP poiskali še potencialno funkcionalne polimorfizme, ki so pogosti v evropski populaciji (frekvenca redkejšega alela več kot 5 %).

### **Klinična raziskava**

V prospektivno raziskavo bomo vključili 121 bolnic z DCIS, ki so bile zdravljene z obsevanjem na Onkološkem inštitutu Ljubljana. Za vse bolnice smo zbrali vzorce krvi pred začetkom zdravljenja z obsevanjem, po zaključku obsevanja in ob kontrolnem pregledu po 6 mesecih. Raziskavo je odobrila Komisija Republike Slovenije za medicinsko etiko.

Za bolnice bomo pridobili podatke o akutnih neželenih učinkih zdravljenja z obsevanjem. Za spremljanje neželenih učinkov na koži bomo uporabili kriterije CTCAEv.5 in LENT-SOMA, za spremljanje neželenih učinkov na srcu pa nivo N-konca pro-B-tipa natriuretičnega peptida (NT-proBNP) in oceno morebitnega srčnega popuščanja s pomočjo lestvice Newyorškega združenja za srce (angl. New York Heart Association, NYHA). Prav tako bomo pri bolnicah spremljali pojav morebitnih zgodnjih sprememb na srcu s pomočjo slikovnih preiskav (ultrazvok in magnetna resonanca).

Pri bolnicah bomo spremljali izražanje izbranih miRNA v plazmi in določili prisotnost pogostih polimorfizmov v genih za miRNA. Za izolacijo miRNA bomo uporabili vzorce plazme, za izolacijo DNA pa vzorce periferne krvi. Za določanje izražanja miRNA v različnih časovnih točkah bomo uporabili kvantitativni PCR, za določanje polimorfizmov pa alelno-specifični PCR. Preverili bomo, ali se izražanje izbranih miRNA pri bolnicah z DCIS pri zdravljenju z obsevanjem spremeni, ter ovrednotili povezavo teh miRNA in njihove genetske variabilnosti s pojavom neželenih učinkov obsevanja.

## Rezultati

### Rezultati bioinformatičke analize

V različnih modelnih sistemih je bilo 20 miRNA povezanih z izpostavljenostjo sevanju (6). Glede na podatke HMDD so v dosedanjih raziskavah poročali o 163 miRNA, katerih izražanje v krvi je bilo spremenjeno pri vsaj eni obliki raka dojke. Od teh je bilo 53 (32,5 %) miRNA identificiranih v več kot eni raziskavi. S presekom rezultatov obeh analiz smo dobili nabor 11 miRNA, ki bi lahko služile kot potencialni neinvazivni označevalci odgovora na zdravljenje z obsevanjem pri raku dojke (Tabela 1). Pri vseh teh miRNA je bilo tudi v tumorskem tkivu pri raku dojke izražanje drugačno kot v normalnem tkivu. V genih za miRNA smo identificirali 9 pogostih polimorfizmov, ki bi lahko vplivali na njihovo izražanje (Tabela 1).

### Pričakovani rezultati prospektivne raziskave

V raziskavi bomo opredelili, kako se izražanje izbranih miRNA spreminja tekom zdravljenja z obsevanjem ter preverili, ali miRNA oziroma njihova genetska variabilnost vpliva na izid zdravljenja. Pričakujemo, da bomo tako identificirali nove biološke označevalce, povezane z akutnimi neželenimi učinki zdravljenja z obsevanjem, kar bi lahko pripomoglo k boljšemu razumevanju odgovora na zdravljenje pri bolnicah z DCIS. Izražanje cirkulirajočih miRNA pred terapijo bi lahko pomagalo napovedati akutne neželene učinke, izražanje miRNA po obsevanju pa bi lahko pomagalo pri identifikaciji bolnic, ki potrebujejo spremembo zdravljenja ali pa bi pomagalo napovedati pojav neželenih učinkov (11).

Tabela 1. Seznam miRNA, ki bi lahko služile kot neinvazivni označevalci odgovora na zdravljenje z obsevanjem pri raku dojke.

miRNA	Izražanje v tumorskem tkivu pri raku dojke	Izbrani polimorfizmi v genih za miRNA
hsa-let-7a	Znižano	rs10739971
hsa-miR-16	Povišano	rs9535416
hsa-miR-17	Povišano	rs9588884
hsa-miR-19b	Povišano	/
hsa-miR-20a	Povišano	/
hsa-miR-21	Povišano	rs1292037
hsa-miR-34a	Povišano	rs2666433
hsa-miR-106b	Povišano	rs999885
hsa-miR-125b	Znižano	rs2241490
hsa-miR-143	Znižano	rs4705343
hsa-miR-221	Minimalno povišano	rs2858060

### Zaključek

V raziskavi želimo identificirati miRNA, ki bi lahko služile kot označevalci odgovora na zdravljenje z obsevanjem pri raku dojke. Boljše poznavanje molekularnih mehanizmov, ki sodelujejo pri odgovoru na zdravljenje z obsevanjem, je ključno za identifikacijo novih

napovednih dejavnikov, ki bi omogočili bolniku prilagojeno zdravljenje, na primer stratifikacijo bolnic in izbor zdravljenja pri DCIS, kar bi lahko zmanjšalo pojav neželenih učinkov in izboljšalo izid zdravljenja.

## Zahvala

Zahvaljujemo se vsem sodelavkam in sodelavcem OI, MF in UKC Ljubljana, ki sodelujejo v raziskavi, ter vsem bolnicam, ki so že ali pa še bodo privolile v sodelovanje v raziskavi.

Raziskovalna sredstva: ARRS J3-1753, ARRS J3-2527 in ARRS P3-0321.

## Literatura

1. Cardoso F, Kyriakides S, Ohno S, Penault-Llorca F, Poortmans P, Rubio IT, et al. Early breast cancer: ESMO Clinical Practice Guidelines for diagnosis, treatment and follow-up. *Ann Oncol.* 2019;30(8):1194-220.
2. Hannafon BN, Ding WQ. Functional Role of miRNAs in the Progression of Breast Ductal Carcinoma in Situ. *Am J Pathol.* 2019;189(5):966-74.
3. Karlsson P. Postoperative radiotherapy after DCIS: Useful for whom? *Breast.* 2017;34 Suppl 1:S43-s6.
4. Benson JR, Wishart GC. Predictors of recurrence for ductal carcinoma in situ after breast-conserving surgery. *Lancet Oncol.* 2013;14(9):e348-57.
5. Pajic M, Froio D, Daly S, Doculara L, Millar E, Graham PH, et al. miR-139-5p Modulates Radiotherapy Resistance in Breast Cancer by Repressing Multiple Gene Networks of DNA Repair and ROS Defense. *Cancer Res.* 2018;78(2):501-15.
6. Jacobs LA, Bewicke-Copley F, Poolman MG, Pink RC, Mulcahy LA, Baker I, et al. Meta-analysis using a novel database, miRStress, reveals miRNAs that are frequently associated with the radiation and hypoxia stress-responses. *PloS One.* 2013;8(11):e80844.
7. Khordadmehr M, Shahbazi R, Ezzati H, Jigari-Asl F, Sadreddini S, Baradaran B. Key microRNAs in the biology of breast cancer; emerging evidence in the last decade. *J Cell Physiol.* 2019;234(6):8316-26.
8. Gandellini P, Rancati T, Valdagni R, Zaffaroni N. miRNAs in tumor radiation response: bystanders or participants? *Trends Mol Med.* 2014;20(9):529-39.
9. Huang Z, Shi J, Gao Y, Cui C, Zhang S, Li J, et al. HMDD v3.0: a database for experimentally supported human microRNA-disease associations. *Nucleic Acids Res.* 2019;47(D1):D1013-D7.
10. Pan CY, Lin WC. miR-TV: an interactive microRNA Target Viewer for microRNA and target gene expression interrogation for human cancer studies. *Database : the journal of biological databases and curation.* 2020;2020.
11. Tomasik B, Chałubińska-Fendler J, Chowdhury D, Fendler W. Potential of serum microRNAs as biomarkers of radiation injury and tools for individualization of radiotherapy. *Transl Res.* 2018;201:71-83.

# SEDANJOST IN PRIHODNOST TARČNEGA RADIONUKLIDNEGA ZDRAVLJENJA

Luka Ležaić

*Klinika za nuklearno medicino, Univerzitetni klinični center Ljubljana, Zaloška cesta 7, 1525 Ljubljana*

Elektronski naslov: luka.lezaic@kclj.si

---

## Izvleček

Tarčno radionuklidno zdravljenje je v klinični uporabi že desetletja. Model teranostike – uporaba enakega vektorja za slikovno diagnostiko in zdravljenje – se je razvil iz uporabe radioaktivnega joda pri benignih in malignih obolenjih ščitnice in se postopoma uveljavil tudi pri nekaterih drugih indikacijah, predvsem v diagnostiki in zdravljenju nevroendokrinih tumorjev, kjer danes predstavlja del standardne obravnave. Zaradi dokazane klinične učinkovitosti, dobrega prenašanja, redkih stranskih učinkov in v zadnjem desetletju s prenosom modela na najpogostejše maligne bolezni pričakujemo, da bo tarčno radionuklidno zdravljenje ob obetavnih novostih postopoma zavzemalo vse večji in pomembnejši del obravnave številnih malignih bolezni.

---

## Uvod

Nuklearna medicina je veja medicine, ki za diagnostiko in zdravljenje uporablja odprte vire sevanja, kar pomeni, da je ob njihovi neustrezni uporabi možno sproščanje radioaktivnosti v okolje. Dejavnost je zato ustrezno regulirana in nadzorovana. V namen diagnostike in zdravljenja uporablja radiofarmake, radioaktivno označene snovi, ki se po aplikaciji v telo razporejajo v skladu s svojimi biološkimi lastnostmi. Radiofarmaki so običajno sestavljeni iz dveh komponent – liganda in radionuklida. Razporejanje radiofarmaka v telesu določajo lastnosti liganda (na primer vezava na mesto pregrajevanja kostnine, vezava na specifičen receptor, ...), radionuklid pa oddaja sevanje. V primeru diagnostičnega radionuklida (gama sevalec – najpogosteje metastabilni tehneций-99 (99mTc), ali jod-123 (123I); pozitronski sevalec – najpogosteje fluor-18 (18F) ali galij-68 (68Ga)) gama kamera ali naprava za pozitronsko izsevno tomografijo/računalniško tomografijo (PET/CT) zaznava oddano sevanje izven telesa in iz zajetih podatkov omogoča prikaz prostorske raporeditve radiofarmaka. V primeru terapevtskega radionuklida (beta sevalec – najpogosteje jod-131 (131I), lutecij-177 (177Lu), itrij-90 (90Y); alfa sevalec, na primer radij-223 (223Ra), bizmut-213 (213Bi), aktinij-225 (225Ac)...) pa radiofarmak oddaja veliko količino energije v majhnem prostoru (beta sevalci – nekaj milimetrov; alfa sevalci – premer celice) in povzroči uničenje tarčnega tkiva. Uničenje tarčnega tkiva lahko nastopi kot posledica poškodbe celičnih struktur (organelov), v največji meri pa kot posledica poškodbe kromatina (dednega materiala). Beta-sevalci oddajajo elektrone, ki z zmerno visoko gostoto ionizacije povzročajo enojne prelome dezoksiribonukleinske kisline (DNA); alfa-sevalci, ki oddajajo helijeva jedra, pa dvojne prelome DNA. Ker je za uničenje tkiva potrebna visoka aktivnost in ustrezna koncentracija radiofarmaka v tarčnem tkivu, si želimo, da razporejanje terapevtskega radiofarmaka v telesu učinkovito napovemo; želimo pa tudi učinkovito spremljati učinke zdravljenja.

## Teranostika

V širšem smislu pod pojmom razumemo smiselno kombinacijo diagnostike in terapije: na področju nuklearne medicine to pomeni, da uporabo terapevtskega radiofarmaka opredeljuje potrditev ustrezne tarče, ugotovljene z diagnostičnim radiofarmakom, ki ga običajno lahko uporabimo tudi za oceno učinkovitosti zdravljenja (pristop v zadnjem času opisujejo tudi kot parna diagnostika – companion diagnostics). V ožjem smislu pa teranostiko v nuklearni medicini razumemo kot uporabo enakega (ali zelo podobnega) vektorja, na katerega je vezan diagnostični in kasneje terapevtski radionuklid: govorimo o teranostičnem paru. Teranostični radiofarmak je običajno sestavljen iz radionuklida, ki je preko bifunkcionalnega kelatorja in distančnika vezan na ligand, manj pogosto pa je teranostični radiofarmak kar sam radionuklid.

## Sedanost

Kljub sodobnemu zvenu je teranostični princip na področju nuklearne medicine star. Uporaba radioaktivnega joda sprva za opredelitev fiziologije, nato pa v diagnostične in terapevtske namene tako pri benignih kot malignih boleznih ščitnice sega v čas okoli druge svetovne vojne (1); danes predstavlja del standardnega zdravljenja benignih boleznih ščitnice s prekomernim izločanjem ščitničnih hormonov (bazedovka, avtonomni gomolj ščitnice) in rakavih boleznih ščitnice (diferencirani rak ščitnice) (2). Uporaba z  $^{131}\text{I}$  in kasneje z  $^{123}\text{I}$  označenega metajodobenzilgvanidina (MIBG) – strukturnega analoga noradrenalina – v diagnostiki in zdravljenju tumorjev avtonomnega živčnega sistema (feokromocitom, paragangliom) in izvorno sorodnih pediatričnih tumorjev (nevroblastom) je prav tako v uporabi že od konca prejšnjega stoletja (3), čeprav širše uporabe izven specializiranih institucij in raziskav teranostični par ni dosegel. Pred kratkim je bil terapevtski radiofarmak [ $^{131}\text{I}$ ]MIBG (Azedra<sup>®</sup>) odobren s strani ameriške Uprave za hrano in zdravila (FDA) (4).

Skelet je predilekcijsko mesto za metastaze številnih malignomov. Scintigrafija skeleta z uporabo s [ $^{99\text{mTc}}$ ]-označenih bisfosfonatov z vezavo na kristale hidroksiapatita prikaže mesta aktivnega pregrajevanja kostnine in s tem osteoblastno aktivne zasevke v skeletu. Za zdravljenje bolečine, povzročene s kostnimi metastazami, uporabljamo s samarijem-153 ( $^{153}\text{Sm}$ ) označene bisfosfonate ([ $^{153}\text{Sm}$ ]HEDP), pa tudi nekatere druge radiofarmake (5,6).

Nuklearna medicina ima osrednjo vlogo v diagnostiki nevroendokrinih neoplastičnih procesov (NEN), ki najpogosteje izvirajo iz prebavil in pljuč. Izkorišča biološko lastnost pogoste in visoke gostote izražanja somatostatinskih receptorjev (SSTR) na površini tumorskih celic. Za diagnostiko NEN so najširše dostopni z enofotonskimi sevalci označeni analogi somatostatina ([ $^{111}\text{In}$ ]DTPA-OC – Octreoscan<sup>®</sup>, [ $^{99\text{mTc}}$ ]HYNIC-TOC – Tektrotyd<sup>®</sup>), bistveno višjo diagnostično vrednost pa imajo s pozitronskim sevalcem  $^{68}\text{Ga}$  označeni analogi – [ $^{68}\text{Ga}$ ]DOTA-TATE/TOC/NOC (v UKC Ljubljana ga uporabljamo od leta 2018). V primeru metastatske bolezni in odpovedi terapije prve ali druge linije lahko pri dobro in srednje diferenciranih NEN uporabimo isti vektor z vezanim terapevtskim radionuklidom (beta sevalcem; običajno  $^{177}\text{Lu}$ ; predhodno  $^{90}\text{Y}$ ) in izvajamo ciljano notranje obsevanje metastaz z zmanjšano sevalno obremenitvijo priležnih zdravih tkiv (postopek imenujemo peptidna receptorska radionuklidna terapija, PRRT). Pristop je bil razvit v devetdesetih letih 20. stoletja

(zdravljenje metastatskih NEN z [90Y]DOTA-TOC, Basel, Švica), v UKC Ljubljana pa ga uporabljamo od leta 2010 (sprva [90Y]DOTA-TOC, nato [177Lu]DOTA-TATE – teranostični par [68Ga]/[177Lu]DOTA-TATE). Učinkovitost zdravljenja pri različnih NEN so pokazale številne manjše raziskave in retrospektivne ter meta-analize (7). Na podlagi randomizirane multicentrične raziskave NETTER-1 (8) je PRRT terapija izbora druge linije pri metastatskih NEN tankega črevesa, čemur je sledila tudi registracija terapevtskega radiofarmaka (LutaThera®). Trenutno potekajoče raziskave (NETTER-2, COMPETE) so usmerjene v oceno uporabe PRRT pri srednje in slabše diferenciranih NEN in pri pankreatičnih NEN kot terapijo prve linije v primerjavi s standardnim zdravljenjem.

Rak prostate je najpogostejši malignom pri moških. Izbira zdravljenja in prognoza je povezana z zamejitvijo in diferenciranostjo bolezni. Nuklearnomedicinske preiskave rutinsko uporabljamo pri izhodiščni zamejitvi (scintigrafija skeleta) in pri biokemični ponovitni bolezni (porast za prostato specifičnega antigena, PSA; PET/CT z [18F]holinom ali z [68Ga] označenim ligandom na za prostato specifičnim membranskim antigenom, [68Ga]PSMA), ki je z visoko gostoto izražen na površini tumorskih celic. Pri metastatski, na kastracijo rezistentni obliki bolezni (mKORP), ki napreduje kljub zdravljenju z novimi antiandrogeni in/ali kemoterapijo, lahko ob prisotnih skeletnih metastazah, potrjenih s scintigrafijo skeleta in ob odsotnosti visceralnih metastaz uporabimo alfa sevalec (223Ra, Xofigo® (9)), v primeru, da so prisotne tudi visceralne metastaze, pa ob ustrezni izraženosti PSMA (potrjeni z [68Ga]PSMA PET/CT) terapevtski radiofarmak [177Lu]PSMA, kar analogno s PRRT imenujemo PSMA tarčna ligandna terapija (PRLT; teranostični par [68Ga]/[177Lu]PSMA). V manjših raziskavah in meta-analizah dokazano učinkovit pristop (10) je bilo potrjen tudi v randomizirani raziskavi v primerjavi z najboljšim standardnim oziroma podpornim zdravljenjem (VISION) (11), na podlagi katere je ameriška FDA zdravljenje odobrila, v drugi polovici leta 2022 pa pričakujemo odobritev še s strani Evropske agencije za zdravila (EMA).

## **Prihodnost**

Zdravljenje metastatskih NEN s PRRT je z dokazano učinkovitostjo model za nadgradnjo nuklearnomedicinske teranostike pri istih in novih indikacijah. PRRT je načeloma uporabna pri vseh malignih procesih, ki izražajo SSTR z ustrezno gostoto: poleg redkejših NEN (feokromocitom, paragangliom (12), nevroblastom (13), medularni rak ščitnice (14)) je v raziskovalni uporabi pri nekaterih oblikah raka pljuč (15), ščitnice (16), meningioma (17) in celo pri benignih procesih kot je sarkoidoza (18). Doslej malo uporabljan pristop je kombinacija različnih terapevtskih radionuklidov z različnim dosegom v tkivu (177Lu: 2 do 3 mm; 90Y: do 10 mm) z namenom učinkovitejšega obsevanja različno velikih lezij (19); za razliko od NEN so izkušnje z 90Y pri zdravljenju napredovelega raka prostate zelo omejene (20). Običajne terapevtske radionuklide lahko nadomestimo z alfa-sevalci (213Bi, 225At), katerih doseg v tkivu po redu velikosti odgovarja celičnemu nivoju in posledično ne obsevajo priležnih zdravih tkiv. Pri metastatskih NEN je PRRT z alfa-sevalci dokazano uspešna tudi po odpovedi PRRT z beta-sevalci (21), enako pri PRLT pri raku prostate (22), kjer so alfa-sevalci celo radionuklid izbire v primeru intenzivne ali difuzne infiltracije kostnega mozga, saj je mielotoksičnost zdravljenja v tem primeru bistveno nižja. Omejitev predstavlja predvsem

zadostna produkcija in dostopnost alfa-sevalcev za pripravo terapevtskega radiofarmaka. V zadnjem času pa se teranostika NEN odmika od konvencionalnega modela uporabe agonistov SSTR: po tem modelu je za učinkovito slikovno molekularno diagnostiko in terapijo NEN potrebna internalizacija radiofarmaka, ki sledi aktivaciji receptorja. Uporaba antagonistov SSTR (v prvi vrsti [68Ga]OPS-11) pa kaže, da je – očitno zaradi večjega števila in stabilnosti vezavnih mest na receptorju – slikovna molekularna diagnostika učinkovitejša kot pri uporabi agonistov (23), po prvih podatkih pa tudi uporabna v sklopu PRRT (24).

Iz PRRT pri NEN razvit teranostični model, ki se je nato hitro uveljavil v obliki PRLT pri raku prostate, je uporaben tudi pri nekaterih novejših ligandih in tarčnih molekulah. Atraktivna tarča je CXC-kemokinski receptor 4 (CXCR4), ki igra pomembno vlogo pri rasti, invazivnosti, mikro-okolju in zasevanju številnih neoplastičnih procesov. Izraznost CXCR4 na tumorskih celicah prikažemo z diagnostičnim radiofarmakom ([68Ga]pentiksafor) in ob ustrezni gostoti receptorjev uporabimo terapevtski radiofarmak ([177Lu] ali [90Y]pentiksater). Teranostični par je lahko učinkovit pri zdravljenju napredovalih hematoloških malignomov (plazmocitom, difuzni velikocelični B-limfom, akutna mieloična levkemija (25)), primerna izraznost CXCR4 pri solidnih tumorjih (adenokarcinom in NEN pankreasa, holangiokarcinom, hepatocelularni karcinom, svetlocelični karcinom ledvice, rak ovarijske in prostate) pa je prisotna le v dobri polovici primerov (26). V idealnem primeru za tarčno radionuklidno zdravljenje prihaja torej v poštev tarčna molekula, ki se z visoko gostoto izraža na številnih neoplastičnih procesih, minimalno ali odsotno na zdravih tkivih. Nedavno je bil razvit z 68Ga označen ligand opisanih lastnosti – inhibitor za fibroblaste aktivacijskega proteina (fibroblast activation protein inhibitor, [68Ga]FAPI), ki je z visoko gostoto izražen v stromi številnih neoplastičnih procesov (27). Na podlagi izkušenj je bil hitro razvit nov teranostični par [68Ga]/[90Y]FAPI in klinično uporabljen pri bolnikih z nekaterimi napredovalimi malignomi in izčrpanim zdravljenjem (rak debelega črevesja in danke, rak dojke, rak trebušne slinavke, sarkom) (28, 29).

## Zaključek

Tarčno radionuklidno zdravljenje z uporabo teranostičnega principa je že desetletja del klinične rutine v obravnavi izbranih rakavih boleznih. V zadnjih dveh desetletjih se je področje nuklearnomedicinske teranostike z uporabo modela PRRT pri NEN uveljavilo in na podlagi izkušenj izjemno hitro razvilo pri zdravljenju raka prostate, kjer pričakujemo, da bo postalo del klinične rutine. Že uveljavljeni in novi teranostični pari bodo v bodočnosti igrali vidno vlogo v obravnavi številnih rakavih boleznih, najverjetneje pa tudi pri nekaterih benignih bolezenskih procesih.

## Literatura

1. Hertz B. A tribute to Dr. Saul Hertz: the discovery of the medical uses of radioiodine. *World J Nucl Med.* 2019;18:8-12.
2. Luster M, Clarke SE, Dietlein M, et al. Guidelines for radioiodine therapy of differentiated thyroid cancer. *Eur J Nucl Med Mol Imaging.* 2008;35:1941-59.
3. Fahey FH, Grant FD, Thrall JH. Saul Hertz, MD, and the birth of radionuclide therapy. *EJNMMI Phys.* 2017; 4:15.

4. Giammarile F, Chiti A, Lassmann M, Brans B, Flux G. EANM procedure guidelines for <sup>131</sup>I-meta-iodobenzylguanidine (<sup>131</sup>I- mIBG) therapy. *Eur J Nucl Med Mol Imaging*. 2008;35:1039-47.
5. Noto RB, Pryma DA, Jensen J, et al: Phase 1 Study of high-specific-activity I-131 MIBG for metastatic and/or recurrent pheochromocytoma or paraganglioma. *J Clin Endocrinol Metab*. 2018;103:213-20.
6. Jansen DR, Krijger GC, Kolar ZI, Zonnenberg BA, Zeevaart JR. Targeted radiotherapy of bone malignancies. *Curr Drug Discov Technol*. 2010;7:233-46.
7. Wang LF, Lin L, Wang MJ, Li Y. The therapeutic efficacy of <sup>177</sup>Lu-DOTATATE/ DOTATOC in advanced neuroendocrine tumors: A meta-analysis. *Medicine (Baltimore)*. 2020;99:e19304.
8. Strosberg J, El-Haddad G, Wolin E, et al.; NETTER-1 trial investigators. Phase 3 trial of <sup>177</sup>Lu-dotatate for midgut neuroendocrine tumors. *N Engl J Med*. 2017; 376: 125-35.
9. Gallicchio R, Mastrangelo PA, Nardelli A, Mainenti PP, Colasurdo AP, Landriscina M, Guglielmi G, Storto G. Radium-223 for the treatment of bone metastases in castration-resistant prostate cancer: when and why. *Tumori*. 2019; 105: 367-377.
10. von Eyben FE, Roviello G, Kiljunen T, et al. Third-line treatment and <sup>177</sup>Lu-PSMA radioligand therapy of metastatic castration-resistant prostate cancer: a systematic review. *Eur J Nucl Med Mol Imaging*. 2018; 45:496-508.
11. Sartor O, de Bono J, Chi KN, et al; VISION investigators. Lutetium-177-PSMA-617 for metastatic castration-resistant prostate cancer. *N Engl J Med*. 2021;385(12):1091-103.
12. Kong G, Grozinsky-Glasberg S, Hofman MS, et al. Efficacy of Peptide Receptor Radionuclide Therapy for Functional Metastatic Paraganglioma and Pheochromocytoma. *J Clin Endocrinol Metab*. 2017;102:3278-87.
13. Gains JE, Bomanji JB, Fersht NL, et al. <sup>177</sup>Lu-DOTATATE molecular radiotherapy for childhood neuroblastoma. *J Nucl Med*. 2011;52:1041-7.
14. Beukhof CM, Brabander T, van Nederveen FH, et al. Peptide receptor radionuclide therapy in patients with medullary thyroid carcinoma: predictors and pitfalls. *BMC Cancer*. 2019;19:325.
15. Kim C, Liu SV, Subramaniam DS, et al. Phase I study of the (<sup>177</sup>)Lu-DOTA(0)-Tyr(3)-Octreotate (lutathera) in combination with nivolumab in patients with neuroendocrine tumors of the lung. *J Immunother Cancer*. 2020;8(2):e000980.
16. Roll W, Riemann B, Schäfers M, et al. <sup>177</sup>Lu-DOTATATE Therapy in Radioiodine-refractory differentiated thyroid cancer: a single center experience. *Clin Nucl Med*. 2018;43: e346-51.
17. Marincek N, Radojewski P, Dumont RA, et al. Somatostatin receptor-targeted radiopeptide therapy with <sup>90</sup>Y-DOTATOC and <sup>177</sup>Lu-DOTATOC in progressive meningioma: long-term results of a phase II clinical trial. *J Nucl Med*. 2015; 56:171-6.
18. Lapa C, Kircher M, Hänscheid H, et al. Peptide receptor radionuclide therapy as



a new tool in treatment-refractory sarcoidosis - initial experience in two patients. *Theranostics*. 2018;8: 644-49.

19. Kunikowska J, Królicki L, Hubalewska-Dydejczyk A, et al. Clinical results of radionuclide therapy of neuroendocrine tumours with <sup>90</sup>Y-DOTATATE and tandem <sup>90</sup>Y/<sup>177</sup>Lu-DOTATATE: which is a better therapy option? *Eur J Nucl Med Mol Imaging*. 2011;38:1788-97.
20. Rathke H, Flechsig P, Mier W, et al. Dosimetry estimate and initial clinical experience with <sup>90</sup>Y-PSMA-617. *J Nucl Med*. 2019;60: 806-11.
21. Kratochwil C, Giesel FL, Bruchertseifer F, et al. <sup>213</sup>Bi-DOTATOC receptor-targeted alpha-radionuclide therapy induces remission in neuroendocrine tumours refractory to beta radiation: a first-in-human experience. *Eur J Nucl Med Mol Imaging*. 2014; 41:2106-19.
22. Kratochwil C, Bruchertseifer F, Giesel FL, et al. <sup>225</sup>Ac-PSMA-617 for PSMA-targeted  $\alpha$ -radiation therapy of metastatic castration-resistant prostate cancer. *J Nucl Med*. 2016; 57:1941-44.
23. Nicolas GP, Beykan S, Bouterfa H, et al. Safety, biodistribution, and radiation dosimetry of <sup>68</sup>Ga-OPS202 in Patients with gastroenteropancreatic neuroendocrine tumors: a prospective phase I imaging study. *J Nucl Med*. 2018; 59:909-14.
24. Wild D, Fani M, Fischer R, et al. Comparison of somatostatin receptor agonist and antagonist for peptide receptor radionuclide therapy: a pilot study. *J Nucl Med*. 2014;55:1248-52.
25. Walenkamp AME, Lapa C, Herrmann K, et al. CXCR4 Ligands: The next big hit? *J Nucl Med*. 2017;58:77S-82S.
26. Werner RA, Kircher S, Higuchi T, et al. CXCR4-directed imaging in solid tumors. *Front Oncol*. 2019; 9: 770.
27. Kratochwil C, Flechsig P, Lindner T, et al. <sup>68</sup>Ga-FAPI PET/CT: tracer uptake in 28 different kinds of cancer. *J Nucl Med*. 2019;60:801-5.
28. Rathke H, Fuxius S, Giesel FL, et al. Two tumors, one target: preliminary experience with <sup>90</sup>Y-FAPI therapy in a patient with metastasized breast and colorectal cancer. *Clin Nucl Med*. 2021; 46(10):842-44.
29. Ferdinandus J, Costa PF, Kessler L, et al. Initial clinical experience with <sup>90</sup>Y-FAPI-46 radioligand therapy for advanced-stage solid tumors: a case series of 9 patients. *J Nucl Med*. 2022; 63(5):727-34.



# IMUNOTERAPIJA IN OBSEVANJE PRI TROJNO NEGATIVNEM RAKU DOJK

Tanja Marinko<sup>1,2</sup>

<sup>1</sup> Sektor radioterapije, Onkološki inštitut Ljubljana, Zaloška cesta 2, 1000 Ljubljana;

<sup>2</sup> Medicinska fakulteta, Univerza v Ljubljani, Korytkova 2, 1000 Ljubljana, Slovenija

Elektronski naslov: tmarinko@onko-i.si

---

## Izvleček

Imunoterapija je vrsta tarčnega zdravljenja. Pri nekaterih rakih je glede na ostale vrste sistemskega onkološkega zdravljenja že v ospredju, pri raku dojk pa se iz zadnjih linij zdravljenja počasi prebija v ospredje. Prispevek opisuje trenutno mesto imunoterapije v zdravljenju raka dojk ter nudi pregled dosedanjih in novih indikacij za zdravljenje z imunoterapijo pri trojno negativnem raku dojk, s poudarkom na kombinaciji z obsevanjem.

---

## Trojno negativen rak dojk

Rak dojk je najpogostejši rak pri ženskah. Glede na patohistološke lastnosti ga delimo na več različnih podtipov, eden izmed njih je trojno negativen rak dojk (TNRD), ki predstavlja okrog 15% vseh rakov dojk. Za ta podtip je značilno, da tumorske celice ne izražajo estrogenskih (ER) in progesteronskih receptorjev (PR) ter receptorjev za humani epidermalni rastni faktor 2 (HER2) (1).

TNRD je bolj agresiven, kot ostali podtipi raka dojk in ima slabše preživetje (1,2). Pogosto ga odkrijemo pri ženskah, mlajših od 40 let. Pogost je pri bolnicah in bolnikih z dednim rakom dojk. Do 20% TNRD je povezanih s prisotno zarodno mutacijo v genu BRCA, še posebno BRCA1. Za TNRD je značilna hitra rast. Celice tumorja so navadno slabo diferencirane. Po primarnem zdravljenju TNRD, je tveganje za razsoj največje v prvih treh letih, nato pa strmo pade.

## Imunoterapija

Imunoterapija je vrsta tarčnega zdravljenja, pri katerem zdravimo z zaviralci imunskih kontrolnih točk. Imunske kontrolne točke so vključene v imunski odgovor organizma na tumor in preprečujejo preveč buren odziv organizma na tumor. Med njimi je ena najbolj proučevanih PD-1 (receptor za programirano celično smrt-1, angl. programmed death), ki je prisoten na T-limfocitih in spodbuja apoptozo antigensko specifičnih T-celic v bezgavkah ter zmanjšuje apoptozo regulatornih T-celic. Nanj se lahko veže ligand PD-L1. PD-1 izražajo imunske celice in s tem regulirajo imunski odziv, izražajo pa ga tudi tumorske celice (3). Ligand PD-L1 izražajo predvsem tumor infiltrirajoče imunske celice, in sicer veliko bolj, kot pa sam tumor (2). Vezava PD-L1 na PD-1 tumorskim celicam omogoča, da se izognejo uničenju z efektorskimi imunskimi celicami, saj le-te tumorskih celic ne prepoznajo kot nevarne (3). Z zdravljenjem z zaviralci imunskih kontrolnih točk omogočimo, da se zavrt imunski odziv na tumor ponovno zažene.

Zaviralci imunskih kontrolnih točk so monoklonska protitelesa. Pri raku dojk v klinični praksi uporabljamo zaviralce kontrolnih točk proti PD-1 (pembrolizumab) in PD-L1 (atezolizumab).

Raziskave z imunoterapijo so se pri raku dojk najprej začele pri metastatskem TNRD. Najprej so preizkušali zdravljenje z imunoterapijo kot monoterapijo, a je bil delež objektivnih odgovorov na zdravljenje majhen, le 5-23%. Veliko boljše rezultate je prineslo zdravljenje z imunoterapijo v kombinaciji s kemoterapijo, ki lahko deluje sinergistično z imunoterapijo. Kemoterapija namreč povzroči nekrozo tumorskih celic, pri čemer se sproščajo neoantigeni, kar sproži aktivacijo imunskega sistema (3). V raziskavah, kjer kombinirajo imunoterapijo s kemoterapijo, poteka zdravljenje z imunoterapijo do progressa bolezni, kemoterapijo pa zaključijo po 4-6 ciklih oziroma ob pojavu omejujočih neželenih učinkov zdravljenja.

### **Imunoterapija in obsevanje**

Številni dokazi kažejo, da lahko sevanje spodbudi imunske celice v mikrookolju tumorja, kar je ključni razlog za kombiniranje radioterapije z imunoterapijo (4). Pri številnih vrstah raka se tumorsko mikrookolje spremeni iz stanja imunskega prepoznavanja/antagonizma v stanje imunskega pobega, v katerem imunski sistem postane nesposoben za boj proti tumorju (5). Biološke spremembe, ki so običajno povezane z imunskim pobegom, vključujejo zmanjšano izražanje MHC razreda 1, povečano število inhibitornih ligandov in citokinov ter povečano število mieloidnih supresorskih celic (14). Čeprav je glavni mehanizem, s katerim sevanje povzroča lokalno celično smrt, indukcija dvoveržnih prekinitev DNA, se je izkazalo, da je sevanje imunogeno z neposredno in posredno aktivacijo prirojenega in pridobljenega imunskega odziva (6). Lokalna celična smrt, ki jo povzroči sevanje, spodbudi neposredno sproščanje tumorskih antigenov ter spodbuja aktivacijo citotoksičnih celic T. Poleg tega lahko sevanje s stimulacijo kalretikulina, beljakovine, ki veže kalcij in spodbuja fagocitozo, spodbuja sposobnost celic, ki predstavljajo antigene, da predstavijo tumorske antigene naivnim celicam T (7). Nasprotno pa je bilo ugotovljeno, da sevanje tudi zmanjšuje prisotnost CD47, beljakovine, ki signalizira zmanjšanje regulacije fagocitoze (8). Pokazalo se je, da veliki odmerki sevanja povečajo izražanje MHC-1, kar poveča verjetnost predstavitve tumorsko specifičnih peptidov s strani antigen predstavitev celic naivnim T celicam (9). Ta fenotip v povezavi s povečanim izražanjem receptorjev za smrt, kot je Fas, olajša sposobnost imunskega sistema, da uniči tumorske celice, saj poveča vidnost tumorja za citotoksične celice T (10, 11). Pokazalo se je tudi, da zmerni odmerki sevanja aktivirajo odziv interferona tipa I v tumorskih celicah z zaznavanjem citoplazemske DNA, pridobljene iz tumorskih mikrojeder po poti cGAS-STING (12). S temi različnimi procesi radioterapija na koncu ustvari provnetno tumorsko mikrookolje, ki spodbudi imunsko aktivacijo na način, ki je lahko sinergističen z imunoterapijo.

### **Trenutne indikacije za zdravljenje z imunoterapijo pri raku dojk**

V Evropi je bila imunoterapija za zdravljenje TNRD prvič registrirana avgusta leta 2019. Na podlagi rezultatov raziskave Impassion 130 je Evropska agencija za zdravila EMA (European Medical Agency) odobrila zdravljenje z Atezolizumabom (2, 13). Gre za randomizirano raziskavo faze III, kjer so v eni roki bolnice z metastatskim TNRD

zdravili z nab- paklitakselom v kombinaciji s placebom, v drugi, raziskovalni roki pa z nab- paklitakselom v kombinaciji z atezolizumabom. V vsako raziskovalno roko so vključili 451 bolnic. Bolnice so z omeneno kombinacijo zdravili do progressa bolezni oziroma do pojava nesprejemljivih neželenih učinkov zdravljenja. Bolnice so razvrstili glede na izraženost PD-L1 pred začetkom zdravljenja. Primarna cilja raziskave sta bila čas do progressa bolezni in celokupno preživetje. Po srednjem času sledenja 12,9 mesecev je bi čas do progressa bolezni značilno daljši v skupini bolnic, ki so bile zdravljene s kombinacijo imunoterapije in taksanov (7,2 meseca) v primerjavi s skupino, ki je bila zdravljena samo s taksani (5,5 mesecev) (razmerje tveganj (HR) 0,80; 95% interval zaupanja (IZ), 0,69 do 0,92;  $p = 0,002$ ). Med bolniki s PD-L1-pozitivnimi tumorji je bil srednji čas do progressa bolezni 7,5 oziroma 5 mesecev (HR 0,62; 95 % IZ, 0,49 do 0,78;  $P < 0,001$ ).

Registraciji atezolizumaba je za zdravljenje metastatskega TNRD na podlagi rezultatov raziskave Keynote 355 septembra 2021 sledila še odobritev pembrolizumaba. V mednarodno multicentrično randomizirano dvojno slepo klinično raziskavo faze III so vključevali le bolnice s PD-L1 pozitivnimi tumorji. V standardni roki so bolnice z metastatskim TNRD zdravili s kemoterapijo v kombinaciji s placebom (281 bolnic), v raziskovalni študijski roki pa v kombinaciji s kemoterapijo in pembrolizumabom (566 bolnic). Od kemotrapevtikov so bili dovoljeni nab-paklitaksel, paklitaksel ali kombinacija gemcitabina in karboplatina). Pri bolnicah s CPS (combined positive score) 10 ali več je bil srednji čas do progressa bolezni značilno daljši: 9,7 mesecev pri bolnicah v skupini s pembrolizumabom in 5,6 mesecev v skupini s kemoterapijo in placebom (HR 0,65, 95 % IZ 0,49-0,86;  $p = 0,0012$ ) (14).

V kratkem v Evropi pričakujemo še odobritev imunoterapije za zdravljenje nemetastatskega TNRD, ki je v Ameriki že odobrena in vključena v klinične smernice. Ameriška agencija za zdravila (FDA) odobrila zdravljenje s pembrolizumabom na podlagi rezultatov raziskave Keynote 522 (15, 16). Gre za randomizirano raziskavo faze III, v katero so vključili bolnice z nezdravljenim TNRD stadija II in III. Bolnice so zdravili z neoadjuvantno kemoterapijo, v kombinaciji z imunoterapijo, s katero so nadaljevali tudi po operaciji. Bolnice so najprej prejele neoadjuvantno zdravljenje s štirimi cikli pembrolizumaba (v odmerku 200 mg) ali placeba vsake tri tedne ter kemoterapijo s paklitakselom in karboplatinom. Sledili so štirje cikli pembrolizumaba ali placeba ter kemoterapija v kombinaciji doksorubicin-ciklofosamid ali epirubicin-ciklofosamid. Po operaciji, ki je sledila neoadjuvantnemu zdravljenju, so bolnice v skupini, ki so jo zdravili z imunoterapijo, vsake tri tedne do skupno devet mesecev dopolnilno prejemale pembrolizumab, bolnice v skupini s placebom, pa so prejemale placebo. Primarni cilj raziskave so bili patološki popolni odgovori na neoadjuvantno zdravljenje in preživetje brez dogodka, ki je opredeljeno kot čas od randomizacije do datuma napredovanja bolezni, lokalne ali oddaljene ponovitve bolezni, pojava drugega primarnega raka, ali smrti zaradi katerega koli vzroka. Od 1174 bolnic, ki so bile randomizirane, jih je bilo 784 razvrščenih v raziskovalno skupino (pembrolizumab v kombinaciji s kemoterapijo) in 390 v standardno skupino (placebo v kombinaciji s kemoterapijo). Po srednjem času spremljanja 39,1 meseca je bilo v skupini bolnic, zdravljenih z imunoterapijo in kemoterapijo, ocenjeno preživetje brez dogodkov po 36 mesecih 84,5 % (95 % IZ, 81,7 do 86,9), v primerjavi s 76,8 % (95 % IZ, 72,2 do 80,7 %) v skupini s placebom in kemoterapijo (HR za dogodek ali smrt 0,63; 95 % IZ, 0,48 do 0,82;  $p < 0,001$ ). Neželeni

dogodki so se pojavljali predvsem v neoadjuvantni fazi in so se ujemali z že znanimi pojavi zdravljenja s pembrolizumabom in kemoterapijo.

### **Kombinacija radioterapije in imunoterapije v raziskavah pri trojno negativnem raku dojk**

V raziskavah, na katerih so temeljile odobritve imunoterapije za standardno zdravljenje bolnic s TNRD, je radioterapija le bežno omenjena ali pa sploh ni omenjena. Tako je na primer v prispevku o raziskavi Impassion 130, v katero so vključevali bolnice z metastatskim rakom dojk, ne omenjajo. V raziskavi Keynote 522, kjer so imunoterapijo kombinirali z neoadjuvantno kemoterapijo, ter nato z njo nadaljevali kot adjuvantno zdravljenje, je dopolnilna radioterapija potekala sočasno z imunoterapijo. Zdravljenje z obsevanjem so predpisovali po ustaljenih kliničnih smernicah. Ne poročajo, da bi sočasno zdravljenje z dopolnilno radioterapijo in imunoterapijo kakorkoli vplivalo na opisovan spekter neželenih učinkov zdravljenja z imunoterapijo (16).

Učinkovitost in varnost kombinacije pembrolizumaba in radioterapije pri bolnicah z metastatskim TNRD so preverjali v majhni klinični raziskavi faze II, v kateri tumorjev niso selekcionirali glede na izražanje PD-L1 (17). Razskava je imela eno samo skupino, v katero so vključili 17 bolnic z metastatskim TNRD. Vsaka od bolnic je imela vsaj en zasevek, ki so ga paliativno obsevali v 5-7 dneh z odmerkom 30 Gy v 5-ih frakcijah, ter vsaj en zasevek, ki ni bil obsevan. Velikost in odgovor vseh zasevkov na zdravljenje so ocenjevali po RECIST (Response Evaluation Criteria in Solid Tumors version 1.1) kriterijih. Imunoterapijo s pembrolizumabom v odmerku 200 mg i.v. so dodali 1-3 dni po prvi frakciji obsevanja in nato vsake tri tedne vse do napredovanja bolezni. Primarni cilj raziskave je bil odgovor neobsevanih zasevkov na zdravljenje, izmerjen 13. teden po začetku zdravljenja, torej morebitni abskopalni učinek obsevanja. Ker je TNRD nepredvidljiv in zelo agresiven, pa je že pred 13. tednom pri 8 bolnicah bolezen napredovala, od tega je 5 bolnic zaradi napredovanja bolezni umrlo. Pri bolnicah, ki so jih analizirali so ugotovili približno enako učinkovitost kombiniranega zdravljenja z obsevanjem in imunoterapijo, kot jo poročajo v raziskavah, kjer so bolnice zdravili samo z imunoterapijo. Neželeni učinki kombiniranega zdravljenja so bili sprejemljivi in podobni tistim, o katerih poročajo v registracijskih raziskavah za imunoterapijo pri TNRD (17).

### **Zaključek**

Imunoterapija počasi vstopa v zdravljenje raka dojk, še posebno TNRD, ki je med vsemi podtipi raka dojk najbolj imunogen in zato najbolj dovzeten za zdravljenje z imunoterapijo. Hkrati je TNRD tudi najbolj agresiven podtip raka dojk, za katerega imamo trenutno na voljo manj različnih vrst zdravil, kot za druge pod tipe raka dojk, zato se pri tem podtipu še bolj intenzivno išče nove vrste in kombinacije zdravljenj.

Kombinacijo imunoterapije z radioterapijo, ki je pri nekaterih drugih rakih že dobro proučevana in obetajoča, pri raku dojk še intenzivno proučujejo, rezultati raziskav bodo na voljo v prihodnjih letih.

## Literatura

1. Loibl S, Poortmans P, Morrow M, Denkert C, Curigliano G. Breast cancer. *Lancet*. 2021;397(10286):1750-69.
2. Schmid P, Rugo HS, Adams S, Schneeweiss A, Barrios CH, Iwata H, et al. Atezolizumab plus nab-paclitaxel as first-line treatment for unresectable, locally advanced or metastatic triple-negative breast cancer (IMpassion130): updated efficacy results from a randomised, double-blind, placebo-controlled, phase 3 trial. *Lancet Oncol*. 2020;21(1):44-59.
3. Grašič-Kuhar C. Mesto imunoterapije pri zdravljenju raka. 2017.
4. Wang Y, Liu ZG, Yuan H, Deng W, Li J, Huang Y, et al. The reciprocity between radiotherapy and cancer immunotherapy. *Clin Cancer Res*. 2019;25(6):1709-17.
5. Wang Y, Deng W, Li N, Neri S, Sharma A, Jiang W, et al. Combining immunotherapy and radiotherapy for cancer treatment: current challenges and future directions. *Front Pharmacol*. 2018;9:185.
6. Jiang W, Chan CK, Weissman IL, Kim BYS, Hahn SM. Immune priming of the tumor microenvironment by radiation. *Trends Cancer*. 2016;2(11):638-45.
7. Obeid M, Tesniere A, Ghiringhelli F, Fimia GM, Apetoh L, Perfettini JL, et al. Calreticulin exposure dictates the immunogenicity of cancer cell death. *Nat Med*. 2007;13(1):54-61.
8. Vermeer DW, Spanos WC, Vermeer PD, Bruns AM, Lee KM, Lee JH. Radiation-induced loss of cell surface CD47 enhances immune-mediated clearance of human papillomavirus-positive cancer. *Int J Cancer*. 2013;133(1):120-9.
9. Reits EA, Hodge JW, Herberts CA, Groothuis TA, Chakraborty M, Wansley EK, et al. Radiation modulates the peptide repertoire, enhances MHC class I expression, and induces successful antitumor immunotherapy. *J Exp Med*. 2006;203(5):1259-71.
10. Marincola FM, Jaffee EM, Hicklin DJ, Ferrone S. Escape of human solid tumors from T-cell recognition: molecular mechanisms and functional significance. *Adv Immunol*. 2000;74:181-273.
11. Werner LR, Kler JS, Gressett MM, Riegert M, Werner LK, Heinze CM, et al. Transcriptional-mediated effects of radiation on the expression of immune susceptibility markers in melanoma. *Radiother Oncol*. 2017;124(3):418-26.
12. Vanpouille-Box C, Alard A, Aryankalayil MJ, Sarfraz Y, Diamond JM, Schneider RJ, et al. DNA exonuclease Trex1 regulates radiotherapy-induced tumour immunogenicity. *Nat Commun*. 2017;8:15618.
13. Emens LA, Adams S, Barrios CH, Diéras V, Iwata H, Loi S, et al. First-line atezolizumab plus nab-paclitaxel for unresectable, locally advanced, or metastatic triple-negative breast cancer: IMpassion130 final overall survival analysis. *Ann Oncol*. 2021;32(8):983-93.
14. Cortes J, Cescon DW, Rugo HS, Nowecki Z, Im SA, Yusof MM, et al. Pembrolizumab plus chemotherapy versus placebo plus chemotherapy for previously untreated locally

recurrent inoperable or metastatic triple-negative breast cancer (KEYNOTE-355): a randomised, placebo-controlled, double-blind, phase 3 clinical trial. *Lancet*. 2020;396(10265):1817-28.

15. Schmid P, Cortes J, Puztai L, McArthur H, Kümmel S, Bergh J, et al. Pembrolizumab for early triple-negative breast cancer. *N Engl J Med*. 2020;382(9):810-21.
16. Schmid P, Cortes J, Dent R, Puztai L, McArthur H, Kümmel S, et al. Event-free survival with pembrolizumab in early triple-negative breast cancer. *N Engl J Med*. 2022;386(6):556-67.
17. Ho AY, Barker CA, Arnold BB, Powell SN, Hu ZI, Gucalp A, et al. A phase 2 clinical trial assessing the efficacy and safety of pembrolizumab and radiotherapy in patients with metastatic triple-negative breast cancer. *Cancer*. 2020;126(4):850-60.



# KOMBINACIJA OBSEVANJA IN ŽILNO CILJANE GENSKE TERAPIJE ZA CD105 TER CD146

Monika Savarin<sup>1,2</sup>, Maja Čemažar<sup>1,2</sup>, Gregor Serša<sup>1,3</sup>

<sup>1</sup> Oddelek za eksperimentalno onkologijo, Onkološki inštitut Ljubljana, Zaloška cesta 2, 1000 Ljubljana, Slovenija

<sup>2</sup> Fakulteta za vede o zdravju, Univerza na Primorskem, Polje 42, 6310 Izola, Slovenija

<sup>3</sup> Zdravstvena fakulteta, Univerza v Ljubljani, Zdravstvena pot 5, 1000 Ljubljana, Slovenija

Elektronski naslov: msavarin@onko-i.si

---

## Izvleček

Kombinacija radioterapije z drugimi terapijami je dobro uveljavljen pristop k zdravljenju raka, saj se na ta način izboljša izid terapije. V zadnjem času je veliko pozornosti namenjene tudi tumorskemu žilju, saj je to ključno za rast, razvoj in napredovanje tumorjev. Z vplivanjem na tumorsko žilje in prekrvavitev tumorjev lahko vplivamo na občutljivost tumorjev na ionizirajoče sevanje in izboljšamo njegov protitumorski učinek. Pomemben aspekt je kombinacija utišanja večih signalnih poti tumorskega endotelija sočasno, med pomembnima tarčnima molekulama pa sta CD105 ter MCAM. S pomočjo genskega elektroprenosa takih terapevtskih plazmidov, ki nosijo zapis za antiangiogene molekule in nimajo zapisa za antibiotično rezistenco, razvijamo nov pristop kombiniranega zdravljenja, ki ima velik translacijski potencial za klinične študije.

---

## Obsevanje

Med klasične pristope zdravljenja raka sodi radioterapija, kjer lokalno ciljamo tumorsko maso. Ionizirajoče sevanje uspešno pobija celice preko neposrednih in posrednih poškodb DNA (1) in spodbudi delovanje imunskega sistema. Imunomodulatorni učinek povzročijo številni citokini, v tumorskem mikrookolju pa zaradi sporočanja tumorskih antigenov iz apoptotskih in nekrotičnih celic, pride do aktivacije imunskih celic, ki spodbudijo delovanje citotoksičnih T limfocitov, T-celic: te nato lažje prepoznavajo tudi viabilne tumorske celice (2). Možno je, da obsevalne poškodbe niso letalne in da tumorska celica uspe ohraniti svojo viabilnost (3). To predstavlja težavo pri zdravljenju predvsem večjih in slabo dostopnih tumorjev, ki so večinoma hipoksični in zato bolj radiorezistentni. Potreben je drugačen način zdravljenja, med obetavne pa sodi modulacija tumorskega žilja in s tem prekrvavljenosti tumorske mase.

## Žilno ciljane terapije

Tumor potrebuje lastno žilje za nemoteno samooskrbo z metaboliti, hranili in kisikom, ter za nadaljnji razvoj in metastaziranje. Za omejitev rasti tumorja in doseganje boljših terapevtskih učinkov lahko uporabljamo žilno ciljane terapije, ki jih delimo v dve podskupini; antiangiogene ter žilno razdiralne terapije. V prvi, avaskularni fazi tumorske rasti je difuzija snovi iz okolice v tumor še ustrezna (4). Na tej stopnji se lahko uporabi različne zaviralce angiogenih faktorjev, ki preprečijo nastanek tumorskega žilja. Take terapije so antiangiogene in med prevladujočimi tarčami je predvsem vaskularni endotelni rastni faktor (VEGF) in njegove signalne poti. Z antiangiogenimi terapijami



lahko normaliziramo tumorsko žilje, kar vodi v boljšo oksigenacijo tumorjev (5).

Drug način, žilno razdiralne terapije, uporabljamo pri večjih tumorjih v vaskularni fazi rasti. Uničenje žilja spodbudi nastanek centralne hemoragične nekroze ter ishemije, ki spodbudita kaskado umiranja tumorskih celic, ter sočasno nastanek viabilnega oksigeniranega roba (5).

### **Učinki kombinacije obsevanja in žilno ciljanih terapij**

Kljub dobrim rezultatom uporaba samo žilno ciljane terapije le redko privedejo do popolnih ozdravitev in uničenja tumorjev. Zaradi tega jih največkrat kombiniramo z drugimi terapijami, kot je obsevanje. Za učinkovito obsevanje je ključnega pomena primerna oksigenacija tumorjev, zato je kombinacija žilno ciljane terapije ter radioterapije obetaven pristop, s katerim lahko dosežemo radiosenzibilizacijo tumorjev.

Učinki kombinirane antiangiogene terapije in radioterapije so se pokazali kot sinergistični in aditivni, z dobrim protitumorskim učinkom. V kliničnih študijah se najpogosteje uporablja bevacizumab, monoklonsko protitelo, ki vpliva na izražanje VEGF signalne poti, v kombinaciji z obsevanjem ter z nekaterimi kemoterapevtki za zdravljenje različnih vrst raka, pri čemer pa se kljub dobrim protitumorskim učinkom in visokim deležem popolnih ozdravitev lahko pojavijo hudi, tudi potencialno letalni stranski učinki. Poleg tega imajo protitelesa tudi krajši čas delovanja, tumorji pa razvijejo nanje rezistenco in preko povratnih zank aktivirajo druge signalne poti, neodvisne od utišanih (6).

Za kombiniranje žilno razdiralne terapije in obsevanja so bili dalj časa prisotni zadržki, saj uničenje tumorskega žilja privede do centralne nekroze tumorjev, ki bi lahko pripomogla k višji radiorezistenci tumorjev. Vendar pa so ugotovili, da v tumorju po žilno razdiralni terapiji nastane dobro oksigeniran in viabilen rob, ki je potencialna tarča obsevanja. Z uničenjem obstoječega žilja se tako odstrani slabo oksigenirano radiorezistentno subpopulacijo tumorskih celic (5). V primerjavi z antiangiogenimi terapijami je na tem področju izvedenih manj kliničnih študij, kljub temu pa so uspeli dokazati, da so take terapije podaljšale preživetje nekaterih onkoloških pacientov (7).

Zato so potrebne raziskave, usmerjene v nove, bolj ciljane terapije, ki imajo bolj specifično in dolgotrajno delovanje, s katerimi bo dosežen boljši protitumorski učinek in več popolnih ozdravitev z minimalnimi stranskimi učinki.

### **CD105**

Ena izmed alternativnih tarč žilno ciljane terapije je CD105 (ENG, endoglin) (8). CD105 je ko-receptor receptorskega kompleksa transformirajočega faktorja beta (TGF- $\beta$ ), ki skupaj z ligandi tvori kompleksen signalni sistem, sodelujoč v različnih celičnih procesih, ki uravnavajo migracijo, proliferacijo, diferenciacijo ter adhezijo celic. V različnih *in vitro* raziskavah so dokazali, da ima utišanje izražanja CD105 antiangiogeni učinek, kar je posledica delovanja na endotelijske celice. Na tumorskih modelih se je njegovo utišanje odražalo v značilnem zaostanku v rasti tumorjev in protimetastatskem učinku, ki sta bili posledici obeh žilno razdiralnih učinkov. CD105 so ciljali predvsem z uporabo protiteles (8,9), boljša učinkovitost pa se je dosegla pri uporabi bolj tarčnih molekul z daljšim delovanjem. Med te sodijo mala interferenčna RNA (siRNA) (10) ter mala lasnična RNA (shRNA) (11,12), z delovanjem po mehanizmu interference RNA.

Učinke delovanja *in vivo* smo dokazali tudi s pomočjo histoloških analiz tumorjev in na modelu dorzalnega okna, kjer se je pokazala korelacija med pretokom krvi in površino žil v tumorju (13).

## CD146

Tudi molekula CD146 (MCAM, melanoma cell adhesion molecule) je prav tako pomembna v tumorskem endoteliju. Ta sodeluje pri številnih znotrajceličnih signalnih poteh, ki omogočajo nastanek metastaz in angiogenezo, vodijo v migracijo normalnih in invazijo tumorskih celic, inhibirajo apoptozo ter povečujejo sposobnost preživetja tumorskih celic. Zaradi raznovrstnosti je ta molekula zanimiva tarča: nas zanima predvsem kot alternativa TGF- $\beta$  signalne poti v procesu angiogeneze. Znano je, da je CD146 koreceptor VEGF-R2 in v endotelijskih celicah aktivira NF- $\kappa$ B (jedrni faktor kapa B) ter s tem spodbuja transkripcijo proangiogenih faktorjev (IL-8, IL-6, VEGF, ICAM-1, celične adhezijske molekule žil VCAM-1, metaloproteinaze matriksa itd.) (14). Dokazano je, da ima utišanje izražanja molekule CD146 z molekulami shRNA antiangiogeni učinek v endotelijskih celicah, kot tudi protitumorski učinek na celice melanoma, ki ga izražajo (15,16).

## Genski elektroprenos plazmida

Molekule shRNA se v tarčne celice vnaša kot del plazmida, ki se v njenem jedru prepíše v pre-shRNA. Nato v citoplazmi poteka odstranitev lasnične zanke, nastane siRNA, ki nadalje z vezavo v različnih encimskih kompleksih privede do vezave na tarčno mRNA. S tem povzroči njeno razgradnjo in torej onemogoči nadaljnjo biosintezo proteina. Gre za delovanje po mehanizmu interference RNA, ki na post-transkripcijski ravni uravnava izražanje genov (17). Znano je, da po vnosu siRNA ta interferenčni učinek traja manj kot teden dni, kar je posledica razgradnje siRNA z nukleazami ter izgub molekul po celičnih delitvah. Prednost uporabe shRNA je v tem, da lahko dosežemo dolgotrajno utišanje tarčnega gena, saj je plazmid bolj odporen na razgradnjo in omogoča dolgotrajno in večkratno prepisovanje shRNA iz plazmidnega vektorja.

Plazmidi so velike molekule, ki v celice same ne morejo vstopiti. Da bi torej tako tarčno molekulo vnesli v celice, lahko uporabimo različne metode vnosa, ki jih v grobem delimo na virusne in nevirusne. Genski elektroprenos sodi med varne in učinkovite nevirusne fizikalne metode, kjer za vnos nukleinskih kislin v različna tkiva uporabimo elektroporacijo. Tu celice izpostavimo zunanemu električnemu polju, ki privede do strukturnih sprememb v celični membrani in s tem do povečanja njene prepustnosti tudi za velike molekule, kot je plazmid (18). Učinkovitost takega načina genske terapije je bila dokazna v različnih študijah, kjer so uspešno vnašali plazmide z zapisom za imunomodulatorne (IL-12) (19) in antiangiogene (anti-CD105, anti-MCAM) molekule (12,15,16).

Kombiniranje žilno ciljanega genskega elektroprenosa in radioterapije je pri različnih tumorskih modelih privedlo do izboljšane protitumorske učinkovitosti (11,12,16). Pri tumorjih kot je mišji melanom, se s tako terapijo lahko spodbudi delovanje imunskega sistema (preko sproščenih molekul DNA v tumorsko mikrookolje). Tovpliva tudi na imunski spomin, saj je po ponovni nasaditvi tumorjev več kot polovica že ozdravljenih miši nedovzetnih na njihovo izrast (12,16). Pomen takega genskega elektroprenosa

je pokazal dober radiosenzibilizirajoči učinek na tumorje, ki se je kazal v značilnih zaostankih v rasti tumorjev, pa tudi v histoloških analizah tako tretiranih tumorjev: zmanjšano je bilo število tumorskih žil in proliferirajočih tumorskih celic, povečan je bil delež hipoksije, nekroze in apoptoze (12,16). Pri raziskavah pa se je ob tem izpostavil še drug pomemben aspect: fenotip ter imunsko mikrookolje tumorjev. Ista kombinirana terapija namreč lahko deluje drugače pri različnih tumorskih modelih. Na melanomskem modelu B16F10, ki je v primerjavi z mamarnim adenokarcinomom TS/A bolj imunogen, smo dokazali, da lahko značilen protitumorski učinek dosežemo že pri kombinaciji obsevanja z genskim elektroprenosom plazmida, ki ne nosi zapisa za tarčni gen, saj je tu dejavnih veliko več citosolnih senzorjev DNA (12).

### Izzivi za prihodnost

Do sedaj še ni bilo narejenih raziskav, kjer bi sočasno ciljali dve različni signalni poti tumorskega žilja z dvema molekulama shRNA na enem plazmidu, ter ugotavljali terapevtske učinke ter mehanizme delovanja na *in vitro* ter *in vivo* ravni. V naši raziskovalni skupini smo naslovili tudi to področje in uspešno konstruirali tak plazmid, ki sočasno cilja (utiša) izražanje CD105 in CD146, ter je brez zapisa za odpornost proti antibiotikom (kot selekcijski označevalec). Na ta način dodatno zagotavljamo varnost bolnikov ter okolja (preprečitev horizontalnega genskega prenosa na komenzalne bakterije). Na *in vitro* ravni smo že preverili njegovo učinkovitost (20), ter dokazali antiangiogeni potencial. V teku so tudi študije *in vivo*, kjer bomo preverjali vpliv plazmida na radiosenzibilizacijo tumorjev ter mehanizme delovanja s pomočjo analize senzorjev DNA ter histoloških preiskav.

### Literatura

1. Baskar R, Lee KA, Yeo R, Yeoh K-W, Baskar R, Phil M. Cancer and radiation therapy: current advances and future directions. *Int J Med Sci.* 2012;9(3):193-9.
2. Deng L, Liang H, Fu S, R. weichselbaum R, Fu YX. From DNA Damage to nucleic acid sensing: a strategy to enhance radiation therapy. *Clin Cancer Res.* 2016;22(1):20-5.
3. Hanahan D. Hallmarks of cancer: new dimensions. *Cancer Discov.* 2022;12(1):31-46.
4. Folkman J. Angiogenesis: an organizing principle for drug discovery? *Nat Rev Drug Discov.* 2007;6(4):273-86.
5. Ciric E, Sersa G, Serša G. Radiotherapy in combination with vascular-targeted therapies. *Radiol Oncol.* 2010;44(2): 67-78.
6. Chinot OL, Wick W, Mason W, Henriksson R, Saran F, Nishikawa R, et al. Bevacizumab plus radiotherapy-temozolomide for newly diagnosed glioblastoma. *N. Engl. J. Med.* 2014;8(20):709-31.
7. Tsang W, Gan L, Zhang Z, Li T, Luo Y, Zhong L, et al. Clinical application of tumor vascular disrupting therapy: a systematic review and meta-analysis. 2021; *Onco Targets Ther.* 2021;14:5085-5093
8. Muñoz TG, Amaral AT, Puerto-Camacho P, Peinado H, de Álava E. Endoglin in the

spotlight to treat cancer. *Int J Mol Sci.* 2021; 22(6), 3186.

9. Liu Y, Paauwe M, Nixon AB, Hawinkels LJAC. Endoglin targeting: lessons learned and questions that remain. *Int J Mol Sci.* 2021;22(1):147.
10. Dolinsek T, Markelc B, Sersa G, Coer A, Stimac M, Lavrencak J, et al. Multiple delivery of siRNA against endoglin into murine mammary adenocarcinoma prevents angiogenesis and delays tumor growth. *PLoS One.* 2013;5;8(3):e587.
11. Stimac M, Kamensek U, Cemazar M, Kranjc S, Coer A, Sersa G. Tumor radiosensitization by gene therapy against endoglin. *Cancer Gene Ther.* 2016;23(7):214-20.
12. Savarin M, Kamensek U, Cemazar M, Heller R, Sersa G. Electrotransfer of plasmid DNA radiosensitizes B16F10 tumors through activation of immune response. *Radiol Oncol.* 2017; 30-9.
13. Savarin M, Prevc A, Rzek M, Bosnjak M, Vojvodic I, Cemazar M, et al. Intravital Monitoring of vasculature after targeted gene therapy alone or combined with tumor irradiation. *Technol Cancer Res Treat.* 2018;17:1533033818784208.
14. Jiang T, Zhuang J, Duan H, Luo Y, Zeng Q, Fan K, et al. CD146 Is a coreceptor for VEGFR-2 in tumor angiogenesis. *Blood.* 2012;120(11):2330-9.
15. Prosen L, Hudoklin S, Cemazar M, Stimac M, Lamprecht Tratar U, Ota M, et al. Magnetic field contributes to the cellular uptake for effective therapy with magnetofection using plasmid DNA encoding against MCAM in B16F10 melanoma *in vivo*. *Nanomedicine (Lond).* 2016;11(6):627-41.
16. Brezar SK, Mrak V, Bosnjak M, Savarin M, Sersa G, Cemazar M. Intratumoral gene electrotransfer of plasmid dna encoding shRNA against melanoma cell adhesion molecule radiosensitizes tumors by antivascular effects and activation of an immune response. *Vaccines.* 2020;8(1):135.
17. Wilson RC, Doudna JA. Molecular mechanisms of RNA interference. *Annu. Rev. Biophys.* 2013;42(1):217–39.
18. Neumann E, Rosenheck K. Permeability Changes Induced By Electric Impulses In Vesicular Membranes. *J Membr Biol.* 1972;10(1):279-90.
19. Daud AI, Deconti RC, Andrews S, Urbas P, Riker AI, Sondak VK, et al. Phase I trial of interleukin-12 plasmid electroporation in patients with metastatic melanoma. *J Clin Oncol.* 2008; 26(36):5896-903.
20. Savarin M, Kamensek U, Znidar K, Todorovic V, Sersa G, Cemazar M. Evaluation of a novel plasmid for simultaneous gene electrotransfer-mediated silencing of CD105 and CD146 in combination with irradiation. *Int J Mol Sci.* 2021;22(6):3069.



# UPORABNOST FET PET/CT BIOMARKERJEV PRI DIAGNOSTIKI PONOVIČNE MOŽGANSKIH GLIALNIH TUMORJEV Z RAZLIČNIM STATUSOM IDH MUTACIJ

Marija Skoblar Vidmar<sup>1</sup>, Andrej Doma<sup>1</sup>, Uroš Smrdel<sup>1</sup>, Katarina Zevnik<sup>1</sup>, Andrej Studen<sup>2</sup>

<sup>1</sup> Onkološki inštitut Ljubljana, Zaloška cesta 2, 1000 Ljubljana, Slovenija

<sup>2</sup> Institut Jožef Stefan, Jamova cesta 39, 1000 Ljubljana, Slovenija

Elektronski naslov: mskoblar@onko-i.si

---

## Izvleček

Mutacije v genih ki kodirajo izocitrat dehidrogenazo, imajo ključno vlogo pri klasifikaciji gliomov in so neodvisen prediktivni dejavnik povezan z boljšim preživetjem. V vsakdanjem kliničnem delu temelji ocena odziva možganskih tumorjev na zdravljenje na slikovni diagnostiki, v prvi vrsti magnetni resonanci glave. Korelacija terapevtskega odziva s slikovnimi izsledki je zapletena in otežena zaradi *t. i.* psevdoprogresa in radiacijske nekroze, ki pogosto simulirata progres / relaps tumorja. V pomoč je FET PET preiskava, ki temelji na merjenju privzema z izotopom označene aminokislinske tirozin s PET kamero. Namen raziskave je opredeliti diagnostično vrednost različnih biomarkerjev preiskave FET PET v kombinaciji z računalniško tomografijo za razlikovanje med progresom in radiacijsko nekrozo pri predhodno zdravljenih bolnikih z možganskimi tumorji različnih statusov IDH mutacij. Naša raziskava je pokazala, da je kombinacija TBR max in TBR mean signifikantna v skupini IDH mutiranih v nasprotju z IDH nemutirano skupino bolnikov, v napovedi tumorskega relapsa oz. progresa. V skupini IDH nemutiranih je pomembnejši biomarker TTP.

---

## Klasifikacija tumorjev centralnega živčnega sistema

Peta izdaja klasifikacije tumorjev centralnega živčnega sistema Svetovne zdravstvene organizacije (SZO; WHO CNS 5) s konca leta 2021 vključuje številne molekularne biomarkerje, ki so koristni s kliničnega vidika, ker vplivajo na potek zdravljenja in hkrati spreminjajo priporočila za zdravljenje (1). Mutacije v genih, ki kodirajo izocitrat dehidrogenazo (IDH), imajo ključno vlogo pri klasifikaciji gliomov. IDH mutacija je neodvisen prediktivni dejavnik, ki je povezan z boljšim preživetjem in je v obratni korelaciji s tumorskim gradusom (2-4).

IDH divji tip glialnega tumorja gradusa 4 ali glioblastom predstavlja približno 50 % vseh gliomov. Srednje preživetje bolnikov z glioblastomom je 12 do 15 mesecev, 5 letno preživetje pa je manj kot 5 %. Standardno zdravljenje glioblastoma in večine gliomov vključuje maksimalno kirurško resekcijo ter dodatno radiokemoterapijo s temozolomidom. Zaradi proliferativne, radiorezistentne in kemorezistentne narave tumorja ter izrazite heterogenosti, se bolezen ponavlja, možnosti dodatnega zdravljenja pa so zelo skromne (5,6).

## Slikovna in funkcionalna diagnostika v oceni odziva na zdravljenje

V vsakdanjem kliničnem delu temelji ocena odziva možganskih tumorjev na zdravljenje

na slikovni diagnostiki, v prvi vrsti magnetni resonanci (MR) glave. Žal je korelacija terapijskega odziva s slikovnimi izsledki zapletena in otežena zaradi t. i. psevdoprogresa in radiacijske nekroze, ki pogosto simulirata progres tumorja. Obsevanje možganskih tumorjev povzroča poškodbo krvno možganske pregrade, kar lahko vodi v zunajžilno iztekanje kontrastnega sredstva, ki ima lahko na MR posnetkih enak videz kot vitalni ostanek ali progres tumorja. Ta neželeni učinek onkološkega zdravljenja je opredeljen kot psevdoprogres in se začne pojavljati približno tri mesece po obsevanju, njegova incidenca pa znaša pri kombiniranem onkološkem zdravljenju do 50 %. Drugi stranski učinek, ki ima na postkontrastnih MR slikah videz ostanka ali ponovitve tumorja, je radiacijska nekroza. Njena incidenca je ocenjena na do 30 % in se viša z daljšanjem obdobja od obsevanja. Pojavljati se začne 6 mesecev po obsevanju, pogostoje šele 1 do 2 leti po zaključeni radioterapiji. Uporabljajo se dodatne slikovne metode, kot sta MR s perfuzijo ali MR spektroskopija, ter funkcionalne metode, kot je FET PET (ang. O-2-fluoro-(18F)-ethyl-L-thyrosine positron emission tomography), vendar razlikovanje stranskih učinkov onkološkega zdravljenja od progresa tumorja še vedno predstavlja izziv (7-9).

Preiskava FET PET temelji na merjenju privzema z izotopom označene aminokislone tirozin s PET kamero. Maligna tkiva imajo intenzivnejši privzem aminokislin kot benigna. Preiskava je uveljavljena pri malignih spremembah možganov, saj je funkcionalno slikanje FDG PET (ang. 2-deoxy-2-[F-18]fluoro-D-glucose-positron emission tomography) zaradi velike fiziološke aktivnosti v možganih le delno uporabno za te namene (10).

Namen raziskave je bil opredeliti diagnostično vrednost različnih biomarkerjev preiskave FET PET v kombinaciji z računalniško tomografijo (CT) za razlikovanje med progresom in radiacijsko nekrozo pri predhodno zdravljenih bolnikih z možganskimi tumorji različnih statusov IDH mutacij.

Raziskava je bila odobrena na seji KSOPKR konec leta 2021. Retrospektivno smo opravili analizo medicinske dokumentacije 47 bolnikov, ki su bili napoteni na FET PET/CT preiskavo v obdobju od aprila 2019 do oktobra 2021. Vsi bolniki so imeli predhodno opravljeno MR glave in ni bilo možno razlikovati progresa od postterapevtskih sprememb.

### **IDH status**

Status mutacije IDH je bil določen imunohistokemijsko do začetka leta 2017 (15 bolnikov), nato pa z uporabo sekvenciranja naslednje generacije genskega panela, prilagojenega gliomu (39 bolnikov). Za analizo so bili bolniki razdeljeni na IDH mutirano in IDH nemutirano skupino.

### **FET PET / CT**

Uporabljen je integriran PET/CT sistem (Biograph mCT 64; Siemens, Erlangen, Nemčija) za pridobivanje dinamičnih PET slik v 40 minutah takoj po injiciranju 3MBq 18F-FET na kilogram telesne teže.

Analizirani so FET PET parametri za vse bolnike, posebej pa za IDH mutirano in IDH nemutirano skupino.

Analizirani parametri, ki so se izkazali kot pomembni za raziskavo:

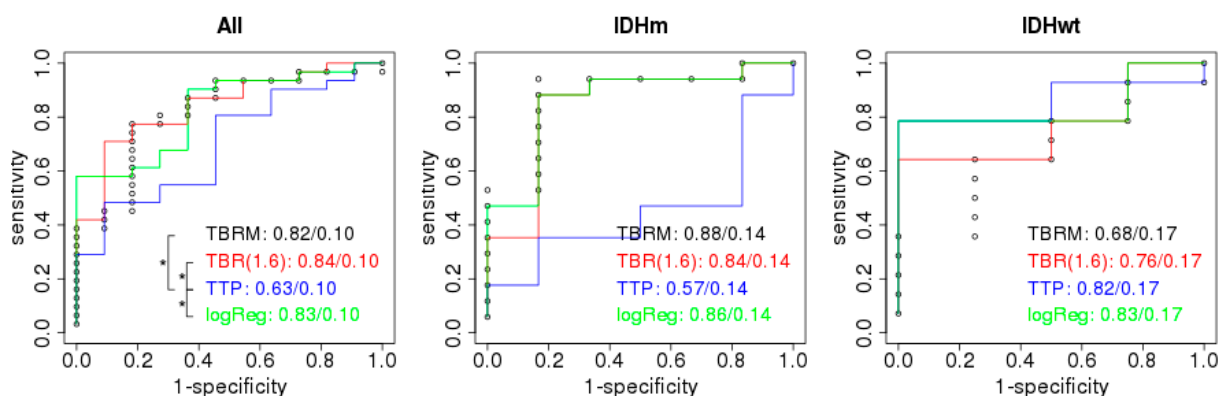
- TBR (ang. tumor to background ratio)- razmerje med tumorjem in ozadjem je glede na podatke iz dosedanje že citirane literature 1.6 mg/ml
- TBR mean (ang. tumor to background ratio mean) in TBR max (ang. tumor to background ratio max)
- TAC (ang. time activity curve )- krivulja časovne aktivnosti, ki prikazuje koncentracijo izotopa v tumorju skozi čas
- TTP (ang. time to peak)- čas ko koncentracija izotopa doseže maksimum v tumorju v minutah

Diagnoza pravega progressa bolezni je temeljila na histopatološki potrditvi in/ali nadaljnjem progressu na MR glave najmanj 4 tedne po opravljeni FET PET / CT preiskavi in /ali jasnem kliničnem progressu. Nasprotno, potrditev radiacijske nekroze je temeljila na negativnem histopatološkem izvidu, stabilnem kliničnem stanju poleg stagnacije ali regresa na MR glave.

### Analiza in preliminarni rezultati

Analizirali smo medicinsko dokumentacijo 47 bolnikov z glialnimi tumorji, 44 jih je bilo primernih za končno analizo. Poprečna starost je bila 44 let, več je bilo moških (61, 4 %). V skupini IDH mutiranih je bilo 26 bolnikov, v skupini nemutiranih pa 18. Pri 2 bolnikih ni bila možna določitev statusa IDH mutacije.

FET PET parametre smo analizirali s pomočjo statistične programske opreme R Foundation for Statistical Computing, Dunaj, Avstrija. <https://www.R-project.org/>. Za oceno statistično pomembnih razlik v ROC krivuljah smo izvedli neparametrično ROC analizo. Skupine bolnikov smo primerjali z Mann-Whitney-Wilcoxonovim testom. Združili smo oceno TAC, status mutacije IDH in TBR mean in max napovedi z uporabo modela logistične regresije (LR). Rezultati z vrednostjo p pod 0,05 so se šteli za statistično pomembne, za količinsko opredelitev negotovosti v statistično izpeljanih vrednostih pa so bili uporabljeni 95 % intervali zaupanja (CI 95 %) (11,12).



Slika 1: primerjava ROC krivulj za različne PET FET parametre. All: vsi bolniki; IDHm: skupina bolnikov z IDH mutacijo; IDHwt: skupina bolnikov brez IDH mutacije

Preliminarni rezultati (grafično prikazani na sliki 1) nakazujejo, da je v skupini vseh bolnikov kombinacija vrednosti TBR max in TBR mean statistično značilna v napovedi progressa / relapsa bolezni. Podobne rezultate smo dobili v skupini bolnikov z mutacijo IDH. Nasprotno, pri bolnikih brez IDH mutacije je vrednost TTP značilna, za razliko od kombinacije TBR max in TBR mean, ki je v tej skupini nepomembna.

## Zaključek

Razlikovanje tumorskega progressa /relapsa od postterapevtskih sprememb predstavlja najpogostejšo indikacijo za uporabo aminokislinskega PET-a v kliničnem delu. Zato je delovna skupina RANO (ang. Response Assessment in Neuro -Oncology) izdala dodatna priporočila za uporabo aminokislinskega PET slikanja v diagnostiki možganskih tumorjev (13).

V naši raziskavi smo poskušali ugotoviti kateri FET PET parametri so najpomembnejši v razlikovanju progressa/ relapsa od postterapevtskih sprememb, glede na dve različni molekularni skupini možganskih tumorjev. Dinamična krivulja, ki jo opisuje parameter TTP ima pomembno vlogo v sledenju možganskih tumorjev brez IDH mutacije, v primeru IDH mutiranih pa bi se sčasoma morda lahko opustila.

## Literatura

1. Louis DN, Perry A, Wesseling P, Brat DJ, Cree IA, Figarella-Branger D, et al. The 2021 WHO Classification of Tumors of the Central Nervous System: a summary. *Neuro Oncol.* 2021 Aug 1;23(8):1231-51.
2. Burke HB. Predicting Clinical Outcomes Using Molecular Biomarkers. *Biomark Cancer.* 2016 Jun 6;8:89-99.
3. Huang J, Yu J, Tu L, Huang N, Li H, Luo Y. Isocitrate Dehydrogenase Mutations in Glioma: From Basic Discovery to Therapeutics Development. *Front Oncol.* 2019 Jun 12;9:506
4. Kaminska B, Czapski B, Guzik R, Król SK, Gielniewski B. Consequences of IDH1/2 Mutations in Gliomas and an Assessment of Inhibitors Targeting Mutated IDH Proteins. *Molecules.* 2019 Mar 9;24(5):968.
5. Weller M, van den Bent M, Preusser M, Le Rhun E, Tonn JC, Minniti G, et al. EANO guidelines on the diagnosis and treatment of diffuse gliomas of adulthood. *Nat Rev Clin Oncol* 2021;18(3):170-86.
6. Poon MTC, Sudlow CLM, Figueroa JD, Brennan PM. Longer-term ( $\geq 2$  years) survival in patients with glioblastoma in population-based studies pre- and post-2005: a systematic review and meta-analysis. *Sci Rep.* 2020;10:11622.
7. Villanueva-Meyer JE, Mabray MC, Cha S. Current Clinical Brain Tumor Imaging. *Neurosurgery.* 2017 Sep 1;81(3):397-415.
8. Chourmouzi D, Papadopoulou E, Marias K, Drevelegas A. Imaging of brain tumors. *Surg Oncol Clin N Am.* 2014 Oct;23(4):629-84.
9. Verma N, Cowperthwaite MC, Burnett MG, Markey MK. Differentiating tumor recurrence from treatment necrosis: a review of neuro-oncologic imaging strategies. *Neuro Oncol.* 2013 May;15(5):515-34.



10. Pauleit D, Floeth F, Hamacher K, Riemenschneider MJ, Reifenberger G, Müller at al. O-(2-[18F]fluoroethyl)-L-tyrosine PET combined with MRI improves the diagnostic assessment of cerebral gliomas. *Brain*. 2005 Mar;128(Pt 3):678-87
11. DeLong ER, DeLong DM, Clarke-Pearson DL. Comparing the areas under two or more correlated receiver operating characteristic curves: a nonparametric approach. *Biometrics*. 1988 Sep;44(3):837-45.
12. Lai CY, Tian L, Schisterman EF. Exact confidence interval estimation for the Youden index and its corresponding optimal cut-point. *Comput Stat Data Anal*. 2012 May 1;56(5):1103-1114.
13. Albert NL, Weller M, Suchorska B, Galldiks N, Soffietti R, Kim MM at al. Response assessment in neuro-oncology working group and European Association for Neuro-Oncology recommendations for the clinical use of PET imaging in gliomas. *Neuro Oncol*. 2016 Sep;18(9):1199-208.



# AKUTNA TOKSIČNOST PRI RADIOTERAPIJI RAKA ANALNEGA KANALA

Valerija Žager Marcuš<sup>1,2</sup>, Metka Meznarič<sup>3</sup>, Irena Oblak<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Oddelek za teleradioterapijo, Onkološki inštitut Ljubljana, Zaloška cesta 2, 1000 Ljubljana, Slovenija

<sup>2</sup> Oddelek za radiološko tehnologijo, Zdravstvena fakulteta, Univerza v Ljubljani, Zdravstvena pot 5, 1000 Ljubljana, Slovenija

<sup>3</sup> Radiološki oddelek, Univerzitetni klinični center Maribor, Ljubljanska ulica 5, 2000 Maribor

Elektronski naslov: ioblak@onko-i.si

---

## Izvleček

V radioterapiji se za zdravljenje raka analnega kanala uporablja več obsevalnih tehnik. IMRT in VMAT obsevalni tehniki z boljšo porazdelitvijo doze v tumorju in manjšo obsevanostjo okolnih zdravih tkiv, omogočata boljši izid zdravljenja z manj neželenimi učinki. Namen raziskave je bil ugotoviti vrsto takojšnjih neželenih učinkov in njihovo pojavnost ter izraženost pri bolnikih z rakom analnega kanala, ki so zdravljeni z IMRT ali z VMAT in jih primerjati s 3D CRT obsevalno tehniko. Metode dela: Izvedla se je retrospektivna raziskava s pregledom podatkov pri 93 bolnikih, ki so se od novembra 2012 do novembra 2019 radikalno zdravili na Onkološkem inštitutu v Ljubljani zaradi raka analnega kanala. Za statistično obdelavo podatkov smo uporabili osnovno frekvenčno statistiko porazdelitve podatkov akutne toksičnosti. Za oceno preživetja smo uporabili Kaplan-Maierjevo krivuljo preživetja. Izračunali smo Coxov regresijski model.

Kot resnejši neželeni učinek stopnje 3 je bil najpogosteje opisan radiodermatitis pri 65,6 % bolnikih, sledi okužba (31,2 %), radiomukozitis (7,7 %) in slabost z bruhanjem (1,1 %). Ostali neželeni učinki so bili blažje izraženi. Kompletan odgovor na zdravljenje je bil zabeležen pri 79,1 % bolnikih, pri 20,9 % bolnikih pa je bil potrjen ostanek oziroma ponovitev bolezni. Petletno PBPBLR znaša 83 %, petletno PBPB pa 77 %. Novejšim obsevalnim tehnikam smo dokazali statistično značilen boljši izid zdravljenja ( $p=0,0026$ ). S primerjavo izraženosti neželenih učinkov ocenjujemo, da se le-ti z izjemo radiodermatitisa pojavljajo pri uporabi IMRT in VMAT v blažji obliki.

Pri uporabi IMRT ali VMAT obsevalnih tehnik imajo bolniki z rakom analnega kanala blažje akutne neželene učinke zdravljenja, kar omogoča zdravljenje brez škodljivih prekinitev ter posledično uspešnejše zdravljenje.

**Ključne besede:** rak analnega kanala, radiokemoterapija, toksičnost, IMRT, VMAT

---

## Uvod

Tumorji prebavil, kamor spada tudi rak analnega kanala, predstavljajo obsežno skupino rakavih obolenj, vendar je pojavnost raka analnega kanala redka (1). Zadnjik je končni del prebavne cevi in je sestavljen iz analnega kanala, ki je dolg 3 do 4 cm, ter analnega roba. Največji delež analnega kanala predstavlja ploščatocelični epitel, zato se tukaj najpogosteje pojavlja ploščatocelični karcinom, in sicer v kar 90 %. Bolniki z rakom analnega kanala najprej opazijo srbečico oziroma bolečino na področju zadnjika, občutek polnosti, krvavitve in zaprtje. Bolezen se pogosteje pojavlja pri ženskah, pri osebah z oslabljenim imunskim sistemom, pri osebah z različnimi avtoimunimi obolenji in pri

kadilcih. Prav tako se ga povezuje s spolno prenosljivimi okužbami humanega papiloma virusa (HPV) (2).

V letu 2018 je za rakom analnega kanala v Sloveniji zbolelo 27 ljudi, in sicer 6 moških in 21 žensk (3). Temeljni način zdravljenja za bolnike z rakom analnega kanala s stadijem I-III je radikalna radiokemoterapija. Pri radikalnem zdravljenju se na Onkološkem inštitutu v Ljubljani (OI LJ) ne uporablja več 3-dimenzionalne konformne tehnike (3D CRT), ampak kompleksnejši obsevalni tehniki, to sta intenzitetno modulirana radioterapija (IMRT) s simultanim integriranim dodatkom doze (SIB) ali volumetrična ločna radioterapija (VMAT). Kompleksnejše tehnike obsevanja na splošno omogočajo manj toksičnih učinkov med ali po zdravljenju, obenem pa najverjetneje tudi boljšo učinkovitost zdravljenja, kar pomeni boljše lokoregionalno kontrolo bolezni in preživetje. Po priporočilih se bolniki obsevajo na linearnih pospeševalnikih s fotonskim snopom energij 6 MV, redkeje več. Klinični tarčni obsevalni volumen obsega primarni tumor z 2,5 cm varnostnega roba, patološko spremenjene bezgavke z 1-2 cm varnostnega roba in področje bezgavk analnega kanala. Skupna doza za tumorje v stadiju T1-2 je 54 Gy v 30 frakcijah po 1,8 Gy, za stadij T3-4 pa je 57 Gy v 30 frakcijah po 1,9 Gy. V primeru, da tumor izhaja izven analnega kanala ali zajema še zunanji sfinkter, bolniku med pripravo na obsevanje analnega kanala apliciramo na zajeto področje bolus iz želatine z namenom dvigniti dozo proti površini, da tarčni volumen prejme optimalno dozo. Posledica je izrazitejši razvoj neželenih učinkov na koži in sluznici. Sočasna uporaba kemoterapije je namenjena bolj učinkovitemu obsevanju in sterilizaciji morebitnih mikrozasevkov. Shema kemoterapevtskega zdravljenja sestoji iz 96-urne aplikacije 5-fluorouracila (5-FU) z dozo 1000 mg/m<sup>2</sup>/dan, ki jo bolnik prejme 1. in 5. teden obsevanja ali peroralnega kapecitabina z dozo 825 mg/m<sup>2</sup> dvakrat dnevno le na obsevalne dni. Prvi ali na drugi dan obsevanja se doda še citostatik mitomicinom C (MMC) v dozi 10 mg/m<sup>2</sup>, pri čemer je maksimalni odmerek 20 mg (4).

Neželeni učinki obsevanja se praviloma razvijejo znotraj obsevanega področja. Individualno od bolnika in načina obsevanja sta odvisna pojavnost in intenziteta neželenih učinkov. Glede na čas nastanka ločimo akutne oziroma zgodnje in kronične oziroma pozne učinke obsevanja. Akutni se lahko pojavijo že za čas obsevanja in najkasneje do 3 mesece po obsevanju. V področju medenice se kot akutni neželeni učinki obsevanja lahko pojavljajo pekoče uriniranje, driske in radiodermatitis ter radiomukozitisi (5).

Med citostatskim zdravljenjem je zmanjšano dozorevanje vseh vrst krvnih celic, najpogosteje pa se pojavlja nevtropenija, zaznana sta tudi levkopenija in trombocitopenija. Neželeni učinki zdravljenja s citostatiki so odvisni od individualnih značilnosti bolnika in vrste, doze citostatika in njihove kombinacije. Za zdravljenje s citostatiki (5-FU, MMC in kapecitabin), ki se uporabljajo pri bolnikih z rakom analnega kanala, se lahko pojavijo slabost ali bruhanje, vnetje ustne sluznice, driska, ter kožne spremembe (hiperpigmentacija kože in sindrom roka noga) (6).

Na OI LJ je bila leta 2009 izvedena raziskava na temo akutne toksičnosti pri radioterapiji raka analnega kanala za 50 bolnikov obsevanih s 3D-CRT (7). Podobno raziskavo so ponovili leta 2012 (8). Raziskava iz leta 2016 vključuje bolnike, ki so se zdravili s 3D-CRT in IMRT obsevalnima tehnikama (9). Raziskave v tujini kažejo, da IMRT zmanjša pojavnost akutne toksičnosti v primerjavi s konvencionalnimi obsevalnimi tehnikami. Zato priporočajo IMRT obsevalno tehniko kot standard za radikalno radiokemoterapijo

pri zdravljenju raka analnega kanala, saj pripomore k nižji stopnji akutne toksičnosti (10-15) in višji stopnji preživetja brez ponovitve bolezni (16-17).

## **Namen**

Namen raziskave je bil ugotoviti, kakšni in v kolikšni meri so prisotni akutni toksični učinki pri bolnikih z rakom analnega kanala, ki so bili zdravljeni z IMRT ali VMAT obsevalno tehniko, in oceniti učinkovitost zdravljenja ter jih primerjati s preteklimi rezultati zdravljenja s 3D CRT tehniko.

## **Metode**

V retrospektivno raziskavo je bilo vključenih 93 bolnikov, zdravljenih na OI LJ med novembrom 2012 in novembrom 2019, ki so bili obsevani z IMRT ali VMAT obsevalno tehniko. Podatke o zdravljenju, bolnikovem kliničnem stanju in opravljeni diagnostiki smo pridobili iz kliničnih informacijskih sistemov WebDoctor in/ali ThinkClinical. Za namen raziskave smo zbrali splošne podatke o bolnikih, o spolu, starosti, splošnem stanju bolnika, patohistološki vrsti tumorja in stadiju bolezni, podatke o zdravljenju z obsevanjem in kemoterapijo, krvne parametre, akutne toksične učinke zdravljenja in ocene rezultatov zdravljenja. Podatke o akutni toksičnosti smo beležili po skupnih terminoloških toksikoloških kriterijih (ang. Common Terminology Criteria for Adverse Events-CTCAE, vs.5.0, 2017). V sklopu akutne toksičnosti smo po stopnjah od 0 do 4 beležili izraženost slabosti in bruhanja, okužbe, driske, pekočega uriniranja, vnetja ustne sluznice, inkontinence za blato, radiodermatitisa in radiomukozitisa. Beležili smo tudi hematološko toksičnost in sicer vrednosti hemoglobina (anemija), levkocitov (levkopenija), nevtrofilcev (nevtropenija) in trombocitov (trombocitopenija) po skupnih terminoloških toksikoloških kriterijih-CTCAE vs.5, razdeljenih v stopnje. Uspešnost zdravljenja smo beležili glede na kompleten ali delen odgovor, brez odgovora ali ponovitev bolezni. V primeru ponovitve bolezni smo zabeležili, kje se je bolezen pojavila: lokalno, regionalno ali z oddaljenimi zasevki.

Statistično analizo smo izvedli s pomočjo programov Microsoft Excel 2016 in programa IBM SPSS 26. Za statistično obdelavo smo uporabili osnovno frekvenčno statistiko porazdelitve podatkov. Naredili smo Kaplan-Meierjevo analizo, s katero prikazujemo PBPBLR in PBPB. V PBPBLR so vključeni kot dogodki le ponovitev bolezni lokalno na mestu vznika tumorja ali v področnih bezgavkah, v PBPB pa tudi ponovitev z oddaljenimi zasevki. Za preverjanje teh preživetvenih krivulj smo uporabili tudi Coxov regresijski model. Mejo za statistično značilno razliko smo postavili pri  $p < 0,05$ . Pri uporabi podatkov smo upoštevali bolnikovo zasebnost in bolnike anonimizirali. Izvedba klinične raziskave je bila potrjena s strani ERID-KSOPKR-0004/2020 in ERIDEK-0006/2020.

Naredili smo primerjavo naših rezultatov z rezultati preteklih objavljenih raziskav, kjer so uporabljali starejše tehnike obsevanja. Rezultate zdravljenja z navedbami akutne toksičnosti pri zdravljenju raka analnega kanala so raziskovalci OI LJ navajali v 3 raziskavah, objavljenih v letih 2009, 2012 in 2016.

## Rezultati

V raziskavo je bilo zajetih 93 bolnikov, od tega 23 moških (24,7 %) in 70 žensk (75,3 %). Njihova povprečna starost je bila 63,3 leta (od 18,3 do 87,3 let). Glede na histološki tip tumorja je imelo 80 bolnikov (85,7 %) ploščatocelični tip in 13 bolnikov (14,3 %) bazaloidni tip. Kemoterapijo je prejelo 84 bolnikov (90,3 %), od tega 11 bolnikov (11,8 %) kontinuirano infuzijo s 5-FU in 73 bolnikov (78,5 %) peroralni citostatik kapecitabin. MMC je prejelo 82 bolnikov (88,2 %). Z IMRT tehniko obsevanja je bilo zdravljenih 25 bolnikov (26,9 %) in z VMAT tehniko 68 bolnikov (73,1 %). Kompletni klinični odgovor na zdravljenje je doseglo 74 bolnikov (79,1 %), ostanek bolezni ali ponovitev je bila dokazana pri 19 bolnikih (20,9 %). Pri 19 bolnikih (20,9 %), pri katerih je bil dokazan ostanek ali ponovitev bolezni, smo beležili ali je šlo za ostanek oziroma ponovitev (lokalna, regionalna) in ali so se razvili oddaljeni zasevki. Naši bolniki imajo 86 % PBPBLR ob dveh letih in 83 % ob petih letih sledenja. PBPB je po dveh letih 80 % ter po petih letih sledenja 77 %, kar sovpada z rezultatom, da je le 8,8 % bolnikov razvilo oddaljene zasevke.

### Akutna toksičnost

Radiodermatitis je najpogostejši neželeni učinek zdravljenja, ki se je pri 27 bolnikih (29 %) izrazil s stopnjo 2 in kar pri 61 bolnikih (65,6 %) s stopnjo 3. Drugi najpogostejši neželeni učinek zdravljenja je bila okužba, ki se je pojavila pri 29 bolnikih (31,2 %) stopnje 3. Drugi neželeni učinki so bili pri naših bolnikih zastopani redko, praviloma stopnje 1 ali 2.

V sklopu hematološke toksičnosti izstopa anemija, kajti 1 bolnik (1,1 %) je razvil toksičnost stopnje 4. Toksičnost stopnje 3 je razvil pri anemiji 1 bolnik (1,1 %), pri levkopeniji 7 bolnikov (7,7 %), pri nevtropeniji 5 bolnikov (5,5 %) in pri trombocitopeniji 2 bolnika (2,2 %) (Tabela 1).

**Tabela 1.** Akutna toksičnost, razdeljena na stopnje

Učinek [N=93] / stopnja [%]	0	1	2	3	4	Skupaj [%]
Slabost in bruhanje	63,4	11,8	23,7	1,1	0	100
Okužba	64,5	0	4,3	31,2	0	100
Driska	44,1	33,3	22,6	0	0	100
Pekoče uriniranje	51,6	47,3	1,1	0	0	100
Vnetje ustne sluznice	98,9	1,1	0	0	0	100
Inkontinenca za blato	87,9	8,8	3,3	0	/	100
Radiodermatitis	2,2	3,2	29,0	65,6	0	100
Radiomukozitis	86,8	3,3	2,2	7,7	/	100
Luščenje roka-noga	96,8	3,2	0	0	0	100
Anemija	40,6	38,5	18,7	1,1	1,1	100
Levkopenija	29,6	30,8	31,9	7,7	/	100
Nevropenija	78,0	4,4	12,1	5,5	/	100
Trombocitopenija	48,4	40,6	8,8	2,2	/	100

Radiodermatitis stopnje 4 se pri naših bolnikih ni razvil, pri uporabi starejših obsevalnih tehnik pa poročajo pojavnost pri 1 (2 %) bolnikov. Radiodermatitis stopnje 3 se je pri naših bolnikih razvil v 65 %, pri uporabi starejših obsevalnih tehnik pa v 57 (64 %) bolnikov, kar je primerljivo.

Okužbe stopnje 4 v naši raziskavi nismo beležili, v preteklih pa se je pojavila pri 3 (4 %) bolnikov. Okužba stopnje 3 pa se je v naši raziskavi pojavila kar pri 31,2 % bolnikov, v starejših raziskavah pri 7 do 10 % bolnikov (Tabela 2).

**Tabela 2.** Primerjava akutne toksičnosti pri starejših in novejših obsevalnih tehnikah

Učinek / stopnja [%]		0	1	2	3	4	Skupaj
Okužba	IMRT, VMAT	64,5	0,0	4,3	31,2	0,0	100
	3D CRT, IMRT <sup>9</sup>	51	14	23	9	3	100
	3D CRT 2012 <sup>8</sup>	55	17	18	7	3	100
	3D CRT 2009 <sup>7</sup>	50	16	20	10	4	100
Radiodermatitis	IMRT, VMAT	2,2	3,2	29,0	65,6	0,0	100
	3D CRT, IMRT <sup>9</sup>	10	12	13	64	1	100
	3D CRT 2012 <sup>8</sup>	12	14	16	57	1	100
	3D CRT 2009 <sup>7</sup>	4	18	12	64	2	100

Povzeto po: 7,8,9.

Pri novejših tehnikah obsevanja opazimo statistično značilen boljši izid zdravljenja ( $p=0,0026$ ), kar je razvidno iz tabele 3.

**Tabela 3.** Primerjava uspešnosti zdravljenja med novejšimi in starejšimi tehnikami obsevanja

	PBPBLR [%]	PBPB [%]
3D CRT 2012	71	68
3D CRT, IMRT	72	71
IMRT, VMAT	83	77

## Razprava

Rak analnega kanala se lahko pojavi v katerem koli starostnem obdobju, vendar se pojavlja pogosteje v poznih srednjih letih (3). Naše ugotovitve so podobne tistim iz predhodnih raziskav in poročil iz literature (10,12-13, 16).

Pri petini bolnikov smo po zdravljenju ugotavljali ostanek oziroma ponovitev bolezni. Po zastopanosti je bil največkrat ugotovljen ostanek oziroma ponovitev lokalno, sledijo oddaljeni zasevki in najredkeje ponovitev bolezni v področnih bezgavkah. O podobnih rezultatih zdravljenja poročajo tudi drugi 10. PBPBLR je bil pri naših bolnikih dve leti po zaključku zdravljenja 86 %, po 5 letih pa 83 %. PBPB je bilo ob dveh letih po zaključku zdravljenja 80 %, po petih letih pa 77%. Do podobnih ugotovitev so prišli tudi v dveh tujih raziskavah (12,14).

Pri naši seriji bolnikov smo kot resnejši neželeni učinek (stopnje 3) najpogosteje beležili radiodermatitis, in sicer pri 65,6 % bolnikih, vendar nobeden ni razvil radiodermatitisa stopnje 4, ta se je pri posameznih bolnikih razvil pri uporabi starejših obsevalnih tehnik (7-9). Kot resnejši neželeni učinek (stopnje 3) smo pri 31,2 % bolnikih beležili okužbo, pri 7,7 % radiomukozitis in pri 1,1 % slabost in bruhanje, kar povezujemo z višjim deležem bolnikov, ki so prejeli kemoterapijo v primerjavi s preteklimi serijami. O radiodermatitisu kot najpogostejšem akutnem neželenem učinku zdravljenja poročajo tudi v raziskavah, kjer so uporabljali 3D CRT tehniko obsevanja 7-9 v Sloveniji in v tujini (15,17).

## Zaključek

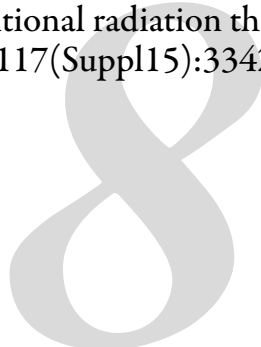
Uspešnost zdravljenja ne vključuje le visokega deleža popolnih kliničnih odgovorov in dobrega preživetja bolnikov, temveč tudi čim manjše posledice zdravljenja in s tem boljšo kvaliteto bolnikovega življenja. Novejše tehnike obsevanja omogočajo boljšo konformnost obsevalnega polja in bolj strm padec doze proti sosednjim zdravim tkivom ter posledično manj neželenih učinkov zdravljenja.

## Literatura

1. Anderluh F. Karcinom analnega kanala: diagnostika in epidemiologija. V: 4. šola tumorjev prebavil. Ljubljana: Onkološki inštitut, 2015.
2. Velenik V, Krebs B, But-Hanžič J. Raki spodnjih prebavil. V: Onkologija: učbenik za študente medicine. Ljubljana: Onkološki inštitut, 2018: 602-618.
3. Onkološki inštitut Ljubljana, Epidemiologija in register raka, Register raka Republike Slovenije. Rak v Sloveniji 2018. Ljubljana: Onkološki inštitut Ljubljana, Epidemiologija in register raka, Register raka Republike Slovenije, 2020.
4. Oblak I, Velenik V, Anderluh F, Šečerov Ermenc A, Jeromen Peressuti A, Breclj E. et al. Smernice za obravnavo bolnikov s skvamoznoceličnim karcinomom analnega kanala in kože perianalno (analnega roba): smernice. Ljubljana: Onkološki inštitut, 2021.
5. Oblak I. Neželeni učinki zdravljenja z obsevanjem. V: Onkologija: učbenik za študente medicine. Ljubljana: Onkološki inštitut, 2018: 256-261.
6. Jezeršek Novakovič B, Pajk B. Sistemsko zdravljenje: neželeni učinki. V: Onkologija:

raziskovanje, diagnostika in zdravljenje raka. Ljubljana: Mladinska knjiga, 2009: 293-315.

7. Oblak I, Petric P, Andrelih F, Velenik V, Fras AP. Anal cancer chemoirradiation with curative intent - a single institution experience. *Neoplasma* 2009; 56(Suppl 2): 150-155.
8. Oblak I, Petrič P, Anderlih F, Velenik V, Fras AP. Long term outcome after combined modality treatment for anal cancer. *Radiol Oncol* 2012; 46(Suppl 2): 145-152.
9. Oblak I, Cesnjevar M, Anzic M, But Hadzic J, Secerov Ermenc A, Anderlih F et al. The impact of anaemia on treatment outcome in patients with squamous cell carcinoma of anal canal and anal margin. *Radiol Oncol* 2016; 50(Suppl 1): 113-120.
10. Dell'Acqua V, Surgo A, Arculeo S, Zerella MA, Bagnardi V, Frassoni S et al. Intensity-modulated radiotherapy (IMRT) in the treatment of squamous cell anal canal cancer: acute and early-late toxicity, outcome, and efficacy. *Int J Colorectal Dis* 2020; 35(Suppl 4): 685-694.
11. Ghareeb A, Paramasevon K, Mokool P, van der Voet H, Jha M. Toxicity and survival of anal cancer patients treated with intensity-modulated radiation therapy. *Ann R Coll Surg Engl* 2018; 101(Suppl 3): 168–175.
12. Yordanov K, Cima S, Richetti A, Pesce G, Martucci F, Azinwi NC et al. Concurrent chemoradiation with volumetric modulated Arc therapy of patients treated for anal cancer-acute toxicity and treatment outcome. *J Gastrointest Oncol* 2017; 8(Suppl 2):361-367.
13. Franco P, Mistrangelo M, Arcadipane F, Munoz F, Sciacero P, Spadi R et al. Intensity-modulated radiation therapy with simultaneous integrated boost combined with concurrent chemotherapy for the treatment of anal cancer patients: 4-year results of a consecutive case series. *Cancer Invest* 2015; 33(Suppl 6):259-66.
14. Han K, Cummings, BJ, Lindsay P, Skliarenko J, Craig T, Le WL et al. Prospective evaluation of acute toxicity and quality of life after IMRT and concurrent chemotherapy for anal canal and perianal Cancer. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 2014; 90(Suppl 3): 587-594.
15. Chuong MD, Freilich M, Hoffe SE, Fulp W, Weber JM, Almhanna K et al. Intensity-modulated radiation therapy *vs.* 3D conformal radiation therapy for squamous cell carcinoma of the anal canal. *Gastrointest Cancer Res* 2013; 6(Suppl 2):39-45.
16. Belgioia L, Vagge S, Agnese D, Garelli S, Murialdo R, Fornarini G et al. Intensified intensity-modulated radiotherapy in anal cancer with prevalent HPV p16 positivity. *World J Gastroenterol* 2015; 21(Suppl37):10688-96.
17. Bazan GJ, Hara W, Hsu A, Kunz PA, Ford J, Fisher GA et al. Intensity-modulated radiation therapy versus conventional radiation therapy for squamous cell carcinoma of the anal canal *Cancer* 2011; 117(Suppl15):3342-51.





# ANALIZA PONOVIH PRIPRAV PRI RAKU GLAVE IN VRATU NA OBSEVALNEM APARATU HALCYON 3.0 (VARIAN)

Lea Pogorevčnik<sup>1</sup>, Anja Robida<sup>1</sup>, Martina Majger<sup>2</sup>, Valerija Žager Marciuš<sup>1,2</sup>

<sup>1</sup> Oddelék za teleradioterapijo, Onkološki inštitut Ljubljana, Zaloška cesta 2, 1000 Ljubljana, Slovenija

<sup>2</sup> Oddelék za radiološko tehnologijo, Zdravstvena fakulteta, Univerza v Ljubljani, Zdravstvena pot 5, 1000 Ljubljana, Slovenija

Elektronski naslov: vzager@onko-i.si; valerija.zager@zf.uni-lj.si

---

## Izvleček

Z radioterapijo je zdravljenih več kot 80 % bolnikov z rakom glave in vratu. Pri zdravljenju s teleradioterapijo se med obsevanjem lahko pojavijo anatomske spremembe, ki vodijo do prenizke doze na tarčni volumen in previsokega odmerka doze na kritične organe. V primeru večjih odstopanj lege kostnih struktur je pomembno, da se ponovno opravi celoten postopek priprave bolnika na obsevanje. Z raziskavo smo želeli analizirati pogostnost in vzroke za ponovno napotitev bolnikov z rakom glave in vratu na pripravo na obsevanje bolnikov.

S pregledom spiska bolnikov z rakom glave in vratu, ki so bili od novembra 2020 do marca 2022 obsevani na linearnem pospeševalniku Halcyon 3.0 (Varian), smo določili koliko je bilo ponovnih priprav na obsevanje; kdaj (pri kateri frakciji) in zakaj je do njih prišlo. Ta obsevalni aparat je bil izbran zaradi možnosti preverjanja natančnosti lege bolnika s kV računalniškim tomografskim sistemom s konusnim snopom (CBCT).

V analiziranem časovnem obdobju so bili na linearnem pospeševalniku zdravljeni 203 bolniki; pri 30 bolnikih (15 %) je bila izvedena ponovna priprava na obsevanje na CT simulatorju. Najpogostejši vzrok za napotitev bolnika na ponovno pripravo na CT simulator je bila izguba telesne teže (30 %) med obsevanjem. Pri šestih bolnikih je bila ponovna priprava izvedena pred/po 1. frakciji in tudi po 2. - 5. frakciji, zaradi neujemanja položaja hrbtenice, zmanjšanja tumorja ali pa bolnik zaradi otekline in posledičnega težkega dihanja ni mogel zdržati pod masko.

Uporaba kV CBCT omogoča dober vpogled v anatomske spremembe, ki se zgodijo med obsevanjem, kar zahteva izvedbo ponovne priprave na obsevanje na CT simulatorju pri vsakem sedmem bolniku.

**Ključne besede:** radioterapija, verifikacija, rak glave in vratu, ponovna priprava, anatomske spremembe

---

## Uvod

Radioterapija je poleg kirurgije in sistemskega zdravljenja ena od temeljnih metod za zdravljenje raka (1). Z obsevanjem je zdravljenih več kot 80 % bolnikov z rakom glave in vratu (2). Raki glave in vratu so heterogena skupina malignih bolezni, med katere štejemo malignome ustne votline, žrela (nazofarinksa, orofarinksa in hipofarinksa), grla, nosne votline, obnosnih votlin in žlez slinavk (3).

Linearni pospeševalnik Halcyon 3.0 (Varian) je zelo primeren za obsevanje bolnikov z rakom glave in vratu, saj omogoča hitro izvedbo obsevanja. Omogoča obsevanje s fotonskim snopom energije 6 MV in brez izravnalnega filtra (FFF), kar občutno skrajšuje

čase obsevanja. Hitrejšo izvedbo obsevanja omogočajo tudi hitrost vrtenja obsevalne glave ( $24^\circ/\text{s}$ ), hitrost doze ( $600 \text{ MU}/\text{min}$ ) in hitrost premikanja lističev večlistnega kolimatorskega sistema (MLC,  $5 \text{ cm}/\text{s}$ ) (4).

Halcyon 3.0 (Varian) je za geometrično verifikacijo opremljen s kV računalniškim tomografskim sistemom s konusnim snopom (CBCT). CBCT slika je tridimenzionalna (3D) in omogoča slikovno verifikacijo tako mehkih tkiv kot tudi kostnih struktur. Postopek slikanja lahko traja do 30 sekund (sistem za geometrično verifikacijo je vgrajen v obroč obsevalnega aparata) in se pri bolnikih z rakom glave in vratu izvaja pred vsakim obsevanjem (5,6). Natančna nastavitve bolnika v izocenter je pri obsevanju bolnikov z rakom glave in vratu še posebej pomembna, saj se v neposredni bližini tarče (tumorja) nahaja veliko pomembnih anatomskih struktur (kritičnih organov) (7).

Priprava bolnika na obsevanje se izvede na računalniško tomografskem simulatorju (CT). Lega bolnika na mizi simulatorja oz. obsevalnega aparata mora biti stabilna, ponovljiva in ne sme dopuščati prevelikih odklikov iz izocentra (8,9). Za ponovno uvedbo postopka priprave na obsevanje se odločimo v primeru pretiranih ( $> 5 \text{ mm}$ ) odstopanj med planiranim tumorskim volumnom (PTV) in dnevnim položajem tkiv, ki morajo biti vključena v PTV-ju.

Bolnik je napoten na ponovno pripravo na obsevanje zaradi različnih vzrokov, kot so izguba telesne teže med obsevanjem, spremembe v legi glave oz. krivini vratu in spremembe v velikosti, legi ali obliki tumorja oz. priležnih zdravih struktur v obsevanem področju. Te spremembe lahko privedejo do sprememb v razporeditvi doze sevanja v obsevanem volumnu tkiv in večjih razlik med prejetjo in načrtovano dozo (10,11).

Namen naše raziskave je bil preveriti, koliko je bilo ponovnih priprav pri bolnikih z rakom glave in vratu na linearnem pospeševalniku Halcyon 3.0 (Varian), zakaj in kdaj (pri kateri frakciji) je do njih prišlo. Ta linearni pospeševalnik je bil izbran zaradi možnosti preverjanja natančnosti lege bolnika s kV CBCT.

## **Metode dela**

Raziskava je bila retrospektivna. Pregledali smo podatke bolnikov z rakom glave in vratu, ki so bili v obdobju od 9. novembra 2020 do 22. marca 2022 obsevani na linearnem pospeševalniku Halcyon 3.0 (Varian). Podatke smo pridobili iz računalniških informacijskih sistemov ARIA in Web Doctor. Vključili smo bolnike obeh spolov, ki so bili obsevani bodisi z namenom ozdravitve (radikalno, pooperativno) ali s paliativnim namenom in je bila pri njih izvedena ponovna priprava na obsevanje na CT simulatorju.

## **Rezultati**

V analiziranem časovnem obdobju je bilo na linearnem pospeševalniku zdravljenih 203 bolnikov: med njimi je bilo 30 bolnikov (15 %) napotenih na ponovno pripravo na obsevanje na CT simulator, od tega je bilo 11 % bolnikov (22) moškega spola, ženskega spola pa 4 % (8). Namen radioterapije pri bolnikih z rakom glave in vratu, pri katerih je prišlo do ponovne priprave je bil v 7.9 % (16) radikalen, v 6.5 % (13) pooperativen in v 0.5 % (1) paliativen. Največ bolnikov, ki je imelo ponovno pripravo je bilo obsevanih s 35 frakcijami (12, 6 %), njihov namen radioterapije pa je bil najpogosteje radikalen. Medtem ko je pri 5,5 % (11) bolnikih prišlo do ponovne priprave pri pooperativnem

namenu radioterapije. Najpogostejša diagnoza, pri kateri je prišlo do ponovne priprave je rak ustne votline (11,5 %), sledi ji rak orofarinksa (10,5 %). Najmanj ponovnih priprav pa je bilo v 0,5 % pri raku nosu in obnosnih votlin ter pri nazofarinksu.

Najpogostejši vzroki za napotitev na ponovno pripravo pri bolnikih z rakom glave in vratu, ki so bili obsevani na linearnem pospeševalniku Halcyon 3.0 (Varian) so prikazani v tabeli 1. Najpogostejši med vzroki je izguba telesne teže, pri devetih (30 %) bolnikih. Pri šestih bolnikih je bila izvedena ponovna priprava že na začetku obsevanja oz. po 1 frakciji; vzrok je bil nezmožnost pritrditve termoplastične maske na podlago, zaradi otekline in posledičnega težjega dihanja bolnika pod masko in neujemanja položaja hrbtenice.

Pri izgubi telesne teže se je kot pomemben dejavnik izkazalo sočasno zdravljenje s kemoterapijo: kar 24 % bolnikov, ki so imeli ponovno pripravo na obsevanje, je prejelo sočasno kemoterapijo.

**Tabela 1.** Akutna toksičnost, razdeljena na stopnje

	Vzrok ponovnih priprav	Število ponovnih priprav
Pred/po 1. frakciji	Bolnik ne zdrži pod masko – oteklina	5
	Neujemanje položaja hrbtenice	1
po 2.-5. frakciji	Bolnik ne zdrži pod masko – oteklina	2
	Neujemanje položaja hrbtenice	3
	Zmanjšanje tumorja	1
po 6.-10. frakciji	Odstopanje položaja brade, podjezičnice	1
	Izguba telesne teže - neoptimalno pokritje PTV-ja	1
	Povečanje tumorja	1
	Odstopanje položaja hrbtenice	1
po 11.-15. frakciji	Poddozirane bezgavke	1
	Odstopanje položaja jezika	1
po 16. -20. frakciji	Izguba telesne teže, neoptimalna pokritost PTV-ja	4
	Neujemanje položaja lobanjske baze	1
po 21. - 25. frakciji	Izguba telesne teže - neoptimalno pokritje PTV-ja	3
	Odstopanje položaja brade, podjezičnice	2
	Neujemanje položaja hrbtenice	1
po 26. frakciji	Izguba telesne teže, neoptimalno pokritje PTV-ja	1

## Razprava

Ponovna priprava na obsevanje pri bolnikih z rakom glave in vratu je bila najpogosteje posledica izgube telesne teže, ki nastopi zaradi motenj/izgube okusa in radiomukozitisa ter posledično inapetance in bolečin pri požiranju. Največ ponovnih priprav na obsevanje smo ugotovili pred/po 1. frakciji in po 2.-5. frakciji (40 %). Vzroki za to so bili pretesna termoplastična maska, ki je ni bilo več mogoče pravilno namestiti, kar je bilo posledica povečanja otekline v obdobju med pripravo na obsevanje in prvo frakcijo, težkega

dihanja, odstopanja kostnih struktur (ugotovljeno pri slikovni geometrični verifikaciji) in nezmožnosti bolnika, da bi zdržal pod pravilno nameščeno termoplastično masko.

## **Zaključek**

Za zagotavljanje natančnosti obsevanja v področju glave in vratu je geometrična verifikacija s kV CBCT ključnega pomena. Uporaba kV CBCT omogoča dober vpogled v anatomske spremembe, ki se zgodijo med obsevanjem, kar zahteva izvedbo ponovne priprave na obsevanje na CT simulatorju pri vsakem sedmem bolniku z rakom glave in vratu.

## **Literatura**

1. Oblak I, Anderluh F. Radioterapija v Sloveniji. *Onkologija* 2017;21(1):6-7.
2. Borrás JM, Barton M, Grau C, Corral J, Verhoeven R, et al. The impact of cancer incidence and stage on optimal utilization of radiotherapy: methodology of a population based analysis by the ESTRO-HERO project. *Radiother Oncol.* 2015;116:45-50.
3. Strojani P, Hočevar M (urednika). *Onkologija: učbenik za študente medicine*. Ljubljana: Onkološki inštitut Ljubljana. 2018.
4. Riley C, Cox C, Graham S, Havran H, Kramer B, Netherton T, et al. Varian Halcyon dosimetric comparison for multiarc VMAT prostate and head-and-neck cancers. *Med Dosim.* 2018;44(3):301.
5. Bissonnette JP, Moseley D, White E, Sharpe M, Purdie T, Jaffray DA. Quality assurance for the geometric accuracy of cone-beam CT guidance in radiation therapy. *Int J Radiat Oncol Biol Phys.* 2008;71(Suppl 1).
6. Guckenberger M. Image-guided radiotherapy based on kilovoltage cone-beam computed tomography: a review of technology and clinical outcome. *Eur Oncol Haematol.* 2011;7(2):121.
7. Kearney M, Coffey M, Leong A. A review of image guided radiation therapy in head and neck cancer from 2009–2019: Best practice recommendations for RTTs in the clinic. *Tech Innov Patient Support Radiat Oncol.* 2020;14:43-50.
8. Sharp L, Lewin F, Johansson H, Payne D, Gerhardsson A, Rutqvist LE. Randomized trial on two types of thermoplastic masks for patient immobilization during radiation therapy for head-and-neck cancer. *Int J Radiat Oncol Biol Phys.* 2005;61(1):250-6.
9. Fukao M, Okamura K, Sabu S, Akino Y, Arimura T, Inoue S, et al. Repositioning accuracy of a novel thermoplastic mask for head and neck cancer radiotherapy. *Phys Med.* 2020;74:92-9.
10. Den RB, Doemer A, Kubicek G, Bednarz G, Galvin JM, Keane WM, et al. Daily image guidance with cone-beam computed tomography for head-and-neck cancer intensity-modulated radiotherapy: A prospective study. *Int J Radiat Oncol Biol Phys.* 2010;76(5):1353-9.
11. Aird EGA, Conway J. CT simulation for radiotherapy treatment planning. *Br J Radiol.* 2002;75(900):937-49.

## POVZETKI

---

# IMUNOMODULATORNI UČINKI RADIOTERAPIJE IN GENSKEGA ELEKTROPRENOSA PLAZMIDNE DNA Z ZAPISOM ZA KEMOKINA CCL5 IN CCL17 NA MIŠJIH TUMORJIH

Tim Božič<sup>1</sup>, Lucija Kozjek Mencinger<sup>1</sup>, Simona Kranjc Brezar<sup>1,2</sup>, Maja Čemažar<sup>1,3</sup>,  
Boštjan Markelc<sup>1,4</sup>

<sup>1</sup>Oddelek za eksperimentalno onkologijo, Onkološki inštitut Ljubljana, Zaloška cesta 2, Ljubljana, 1000 Ljubljana, Slovenija

<sup>2</sup>Medicinska fakulteta, Univerza v Ljubljani, Vrazov trg 2, Ljubljana, 1000 Ljubljana, Slovenija;

<sup>3</sup>Fakulteta za zdravstvene vede, Univerza na Primorskem, Polje 42, Izola, 6310 Izola, Slovenija

<sup>4</sup>Zdravstvena fakulteta, Univerza v Ljubljani, Zdravstvena pot 5, Ljubljana, 1000 Ljubljana, Slovenija

Elektronski naslov: tbozic@onko-i.si

---

Kemokini so majhni signalni proteini iz družine citokinov, ki inducirajo migracijo imunskih celic. Vrsta in stopnja infiltracije imunskih celic v tumorskem mikrookolju lahko vpliva na potek bolezni in korelira z učinkovitostjo imunoterapij pri bolnikih z rakom. Poleg tega ima tudi obsevanje tumorjev lahko pozitivne imunomodulatorne učinke. Iz navedenih razlogov genski elektroprenos (GET) plazmidne DNA z zapisom za vnetna kemokina CCL5 in CCL17 v kombinaciji s klasično radioterapijo tako predstavlja enega izmed potencialnih pristopov pri zdravljenju raka. Na celičnih kulturah *in vitro*, smo določili kemotaktične lastnosti kemokinov CCL5 in CCL17. Protitumorsko učinkovitost kombinirane terapije GET kemokinov in dveh obsevalnih režimov (enkratna doza 10 Gy ali frakcionirana doza 3x 5 Gy) smo raziskali na mišjih tumorskih modelih raka debelega črevesja CT26 in raka dojke 4T1 *in vivo*. Sestavo tumorskega mikrookolja po kombinirani terapiji smo določevali z imunofluorescenčnim barvanjem antigenov CD4, CD8 in CD31. Testi kemotakse so pokazali, da kemokina CCL5 in CCL17 lahko inducirata migracijo mišjih makrofagov RAW264.7 *in vitro*. Zaostanek v rasti tumorjev CT26 je bil statistično značilno daljši po kombinirani terapiji tumorjev z GET kemokinov pri obeh obsevalnih režimih, pri čemer smo dosegli tudi popolne odgovore tumorjev na zdravljenje. Pri tumorskem modelu 4T1 pa je le GET kemokinov v kombinaciji s frakcioniranim obsevanjem povzročil zaostanek v rasti tumorjev, vendar brez popolnih odgovorov. Primerjava stopnje infiltracije posameznih imunskih celic v tumorsko mikrookolje je pokazala, da se število CD4+ in citotoksičnih CD8+ T limfocitov pri obeh tumorskih modelih poveča po GET kemokinov in zmanjša po samem obsevanju. Zmanjšanje števila imunskih celic je bilo opaženo tudi pri kombinirani terapiji in korelira z zmanjšanjem CD31+ celic, ki označujejo žilje. Rezultati kažejo na potencial kemokinov v imunoterapiji raka, vendar je za njihovo implementacijo potrebna nadaljnja optimizacija kombinirane terapije.

# LIMFEDEM IN OMEJENA GIBLJIVOST RAME PO ZDRAVLJENJU RAKA DOJK – PRELIMINARNI REZULTATI PROSPEKTIVNE RAZISKAVE O CELOSTNI REHABILITACIJI

Romi Cencelj-Arnež<sup>1</sup>, Zlatka Mavrič<sup>2</sup>, Nina Brekalo<sup>3</sup>, Nikola Bešič<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Oddelek za kirurško onkologijo, Onkološki inštitut Ljubljana, Zaloška cesta 2, Ljubljana, 1000, Slovenija

<sup>2</sup>Zdravstvena nega, Onkološki inštitut Ljubljana, Zaloška cesta 2, Ljubljana, 1000, Slovenija

<sup>3</sup>Fizioterapija, Onkološki inštitut Ljubljana, Zaloška cesta 2, Ljubljana, 1000, Slovenija

Elektronski naslov: nbasic@onko-i.si

---

Limfedem lahko nastane kadarkoli po operaciji pazdušnih bezgavk. Bolnico zelo ovira pri vsakodnevnih aktivnostih in poslabša kvaliteto življenja. V študiji Doreta (1) je imelo limfedem leto dni po aksilarni limfadenektomiji 15% bolnic.

Namen tega prispevka je ugotoviti, kako pogosto imajo bolnice po operativnem posegu limfedem in omejeno gibljivost rame in kdaj nastaneta. Poročamo o 454 bolnicah (starost 26-65 let, povprečje 52) z rakom dojk, ki so bile v letih 2019-2022 vključene v prospektivno raziskavo o celostni onkološki rehabilitaciji (2). Vse so imele kirurški poseg na dojki in bezgavkah in so pričele z zdravljenjem pred vsaj šestimi meseci. Neoadjuvantno kemoterapijo so imele v 23%, tumorektomijo v 59%, mastektomijo v 41%, rekonstrukcijo dojke v 28%, biopsijo varovalne bezgavke v 73%, limfadenektomijo v 27%, obsevanje v 78%, kemoterapijo v 46%, anti-HER-2 terapijo v 13% in hormonsko terapijo v 83%. Bolnice so bile deležne rutinske obravnave pri fizioterapevtih po kirurškem posegu. Fizioterapevtke so gibljivost ramenskega obroča in obseg nadlahti in podlahti izmerile pred pričetkom zdravljenja in po pol leta. Limfedem je bil prisoten, če je bil obseg okončine za 2 cm večji kot na drugi okončini. Gibljivost v ramenskem sklepu je bila omejena, če je zaostajala za vsaj 20 stopinj v primerjavi z drugo ramo.

Pol leta po pričetku zdravljenja je imelo limfedem 31% bolnic, omejeno gibljivost ramenskega sklepa pa kar 38% bolnic. Pred operativnim posegom in pol leta po pričetku zdravljenja ni bilo statistične povezave med pogostostjo limfedema ali omejene gibljivosti rame in načinom zdravljenja. Pol leta po pričetku zdravljenja je imelo limfedem po biopsiji varovalne bezgavke 30% bolnic, po limfadenektomiji pa 36% bolnic. Pol leta po pričetku zdravljenja je imelo limfedem po tumorektomiji 32% bolnic, po mastektomiji 31% in po takojšnji rekonstrukciji 26% bolnic. Pol leta po pričetku zdravljenja je imelo limfedem 33% bolnic, ki so bile obsevane in 27% bolnic, ki niso bile obsevane. Pol leta po biopsiji varovalne bezgavke je imelo omejeno gibljivost rame 33% bolnic, po limfadenektomiji pa kar 50% bolnic. Omejeno gibljivost rame po tumorektomiji je imelo 32% bolnic, po mastektomiji 37%, po takojšnji rekonstrukciji pa kar 50% bolnic. Omejeno gibljivost rame je imelo 38% bolnic, ki so bile obsevane in 37% bolnic, ki niso bile obsevane. Žal se pogostost limfedema kasneje še poveča in leto dni po pričetku zdravljenja je imelo limfedem skoraj 39% bolnic.

Preliminarni rezultati Pilotne raziskave o individualizirani celostni rehabilitaciji bolnic z rakom dojke - OREH kažejo, da se omejena gibljivost ramenskega sklepa in limfedem razvijeta že pred pričetkom obsevanja. Verjetno je sedaj limfedem bolj pogost kot v preteklosti na račun ukrepov zaradi pandemije COVID-19, ki so zmanjšali število pregledov pri zdravniku in fizioterapevtu. Po priporočilih ameriških smernic - National Comprehensive Cancer Network® je pred zdravljenjem izhodiščno meritev okončin potrebno opraviti na obeh okončinah (3). Po možnosti naj to naredi usposobljeni limfterapevt (3).

## Literatura

1. Besic N, Smrekar J, Strazisar B. Chronic adverse effects after an axillary lymphadenectomy in breast cancer patients after administering weaker and stronger postoperative analgesia: results of a prospective double-blind randomized study. *Breast Cancer Res Treat.* 2020;182(3):655-63.
2. Pilotna raziskava o individualizirani celostni rehabilitaciji bolnic z rakom dojke 2019-2022 - V3-1906. 2022; [citirano 16. aprila 2022]. Dostopno na: <https://www.onko-i.si/dejavnosti/raziskovalna-in-izobrazevalna-dejavnost/programi-projekti-in-studije/programi-in-projekti-arrs/projekt/pilotna-raziskava-o-individualizirani-celostni-rehabilitaciji-bolnic-z-rakom-dojke-2019-2022>
3. NCCN guidelines. Survivalship. Version 1.2022; [citirano 16. aprila 2022]. Dostopno na: <https://nccn.org/guidelines-detail?category=3&id=1466>





# ORGANOIDI GLIOBLASTOMA KOT MODEL ZA PREUČEVANJE ODPORNOSTI NA TERAPIJO

Anamarija Habič<sup>1,2</sup>, Bernarda Majc<sup>1,2</sup>, Andrej Porčnik<sup>3</sup>, Roman Bošnjak<sup>3</sup>, Boštjan Markelc<sup>4</sup>, Maja Čemažar<sup>4</sup>, Tamara Lah Turnšek<sup>1</sup>, Barbara Breznik<sup>1</sup>, Metka Novak<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Oddelek za genetsko toksikologijo in biologijo raka, Nacionalni inštitut za biologijo, Večna pot 111, 1000 Ljubljana, Slovenija

<sup>2</sup> Mednarodna podiplomska šola Jožefa Stefana, Jamova cesta 39, 1000 Ljubljana, Slovenija

<sup>3</sup> Klinični oddelek za nevrokirurgijo, Univerzitetni klinični center Ljubljana, Zaloška cesta 7, 1000 Ljubljana, Slovenija

<sup>4</sup> Oddelek za eksperimentalno onkologijo, Onkološki Inštitut Ljubljana, Zaloška cesta 2, 1000 Ljubljana, Slovenija

Elektronski naslov: anamarija.habic@nib.si

---

Glioblastom ostaja zelo agresivna in najsmrtonosnejša oblika možganskega tumorja s slabo prognozo. Standardno zdravljenje vključuje kirurško resekcijo, ki ji sledita radioterapija in kemoterapija s temozolomidom, vendar se tumor zaradi prisotnosti na terapijo odpornih rakavih celic in podpore tumorskega mikrookolja ponovi. Namen raziskave je bila analiza mehanizmov odpornosti glioblastoma na obsevanje in kemoterapijo. Raziskava je bila izvedena z uporabo *ex vivo* modela organoidov glioblastoma, pridobljenih iz tumorjev bolnikov (1). Organoidi glioblastoma posnemajo heterogenost tumorjev med posameznimi bolniki ter heterogenost tumorskega mikrookolja znotraj tumorja posameznega bolnika. Med organoidi glioblastoma in njihovimi primarnimi tumorji smo primerjali podtipe glioblastoma in izražanje tarčnih genov, ki so ključni pri epitelijsko-mezenhimskem prehodu, mehanizmih popravljanja poškodb DNA, ohranjanju matičnosti celic ter celičnem ciklu. Z metodo imunofluorescence smo potrdili, da organoidi glioblastoma vsebujejo tumorsko mikrookolje s pripadajočimi rakavimi celicami, rakavimi matičnimi celicami ter stromalnimi in imunskimi celicami kot so makrofagi, mikroglia, celice T, celice NK in endotelijske celice. Organoide glioblastoma smo izpostavili enkratnemu obsevanju z dozo 10 Gy, tedensko temozolomidu ali njuni kombinaciji. Obsevanje v kombinaciji s kemoterapijo ni povzročilo sprememb v viabilnosti ter invaziji organoidov, analize qPCR pa so pokazale spremembe v izražanju genov MDM2 in CDKN1A. Organoidi glioblastoma posnemajo ključne značilnosti ter dinamično sestavo tumorskega mikrookolja, kar omogoča raziskave odzivnosti in odpornosti glioblastoma na terapijo.



# UČINKI OBSEVANJA DELA TUMORJA NA IMUNSKO POPULACIJE NA TUMORSKEM MODELU MIŠJEGA KARCINOMA DOJKE 4T1

Tanja Jesenko<sup>1,2</sup>, Živa Modic<sup>1,2</sup>, Tim Božič<sup>1,2</sup>, Simona Kranjc Brezar<sup>1,2</sup>, Ilija Vojvodič<sup>3</sup>, Božidar Casar<sup>4,5</sup>, Ignacio Mendez Carot<sup>4</sup>, Maja Čemažar<sup>1,6</sup>, Gregor Serša<sup>1,7</sup>, Boštjan Markelc<sup>1,7</sup>

<sup>1</sup>*Oddelek za eksperimentalno onkologijo, Onkološki inštitut Ljubljana, Zaloška cesta 2, Ljubljana, 1000, Slovenija*

<sup>2</sup>*Medicinska fakulteta, Univerza v Ljubljani, Vrazov trg 2, Ljubljana, 1000, Slovenija*

<sup>3</sup>*Enota za vzdrževanje obsevalnih naprav, Onkološki inštitut Ljubljana, Zaloška cesta 2, Ljubljana, 1000, Slovenija*

<sup>4</sup>*Služba za dozimetrijo in kakovost radioloških posegov, Onkološki inštitut Ljubljana, Zaloška cesta 2, Ljubljana, 1000, Slovenija*

<sup>5</sup>*Fakulteta za naravoslovje in matematiko, Univerza v Mariboru, Koroška cesta 160, 2000 Maribor*

<sup>6</sup>*Fakulteta za vede o zdravju, Univerza na Primorskem, Polje 42, Izola, 6130, Slovenija*

<sup>7</sup>*Zdravstvena fakulteta, Univerza v Ljubljani, Zdravstvena pot 5, Ljubljana, 1000, Slovenija*

Elektronski naslov: [tjesenko@onko-i.si](mailto:tjesenko@onko-i.si)

---

Odgovori tumorjev različnih histoloških tipov na zdravljenje z zaviralci imunskih kontrolnih točk so večinoma zelo dobri, vendar vseeno obstaja delež bolnikov, ki ne odgovorijo na tovrstno zdravljenje. Zato se raziskujejo načini kako povečati delež bolnikov, ki odgovorijo na zdravljenje. Eden izmed novih potencialnih načinov je obsevanje, kjer obsevalno polje zajema le del tumorja. Tak način obsevanja bi lahko povzročil imunogeno celično smrt obsevanih tumorskih celic, poleg tega pa bi z njim lahko ohranili več limfocitnih populacij v tumorju, ki so drugače najbolj radioobčutljive. V kliniki poznamo tehnološke načine, s katerimi lahko obsevamo le del tkiva, v predkliničnih raziskavah pa je s trenutnimi tehnologijami to težko doseči. V ta namen smo na Onkološkem inštitutu Ljubljana vzpostavili nov tehnološki pristop za obsevanje dela tumorja na miših, ki je sestavljen iz svinčene mize, ki ščiti žival pred sevanjem ter kolimatorjem, ki omogoča definirano obsevalno polje velikosti 8 x 8 mm. Učinke obsevanja dela tumorja na imunske populacije v tumorju smo ovrednotili s pretočno citometrijo na mišjem tumorskem modelu karcinoma dojke 4T1 po obsevanju celotnega ali dela tumorja z dozo 10 Gy. Z merjenjem velikosti tumorjev smo spremljali tudi protitumorski učinek obeh načinov obsevanja. S pretočno citometrijo smo dokazali, da obsevanje dela tumorja povzroči manjšo izgubo CD4+ ter CD8+ limfocitov T napram obsevanju celotnega tumorja. Obsevanje dela tumorja je povzročilo manjši zaostanek v rasti kot obsevanje celotnega tumorja. Raziskava je doprinesla k razvoju novega raziskovalnega orodja v radiobioloških študijah ter daje vpogled v imunološke učinke obsevanja dela tumorja na predkliničnem tumorskem modelu.

# IZLOČANJE DEJAVNIKA IMUNOGENE CELIČNE SMRTI HMGB1 IZ CELIČNIH LINIJ SE POVEČUJE Z DOZO OBSEVANJA

Urša Kešar<sup>1,2</sup>, Tanja Jesenko<sup>1,2</sup>, Boštjan Markelc<sup>1,3</sup>, Katja Uršič Valentinuzzi<sup>1,4</sup>, Maja Čemažar<sup>1,5</sup>, Primož Strojjan<sup>2,6</sup>, Gregor Serša<sup>1,3</sup>

<sup>1</sup> Oddelek za eksperimentalno onkologijo, Onkološki inštitut Ljubljana, Zaloška cesta 2, 1000 Ljubljana, Slovenija

<sup>2</sup> Medicinska fakulteta, Univerza v Ljubljani, Vrazov trg 2, 1000 Ljubljana, Slovenija

<sup>3</sup> Zdravstvena fakulteta, Univerza v Ljubljani, Zdravstvena pot 5, 1000 Ljubljana, Slovenija

<sup>4</sup> Biotehniška fakulteta, Univerza v Ljubljani, Jamnikarjeva 101, 1000 Ljubljana, Slovenija

<sup>5</sup> Fakulteta za vede o zdravju, Univerza na Primorskem, Polje 42, 6310 Izola, Slovenija

<sup>6</sup> Sektor radioterapije, Onkološki inštitut Ljubljana, Zaloška cesta 2, 1000 Ljubljana, Slovenija

Elektronski naslov: ukesar@onko-i.si

---

Ionizirajoče sevanje poškoduje genetski material celic (DNA) s čimer onemogoči njihovo nadaljnje deljenje. Poleg neposrednega citotoksičnega učinka pa obsevanje učinkuje tudi preko aktivacije imunskega sistema s povzročitvijo imunogene celične smrti (ICD). ICD predstavlja način umiranja celic, ki učinkovito spodbudi pridobljeni imunski odziv proti neo-antigenom, ki jih sproščajo umirajoče ali mrtve celice. Imunski odziv ojačajo molekule DAMP (ang. damage-associated molecular patterns, oz. s poškodbo povezani molekulski vzorci), ki se sproščajo iz celic in služijo kot signali nevarnosti. Ena izmed molekul DAMP je tudi jedrni protein HMGB1 (ang. high mobility group box 1, oz. protein visoko-mobilne skupine 1), ki se ob ICD sprosti izven celic. Namen naše raziskave je bil ugotoviti kako doza obsevanja, čas po obsevanju ter vrsta tumorskih celic vpliva na sproščanje HMGB1 iz celic. Obsevanju smo izpostavili tri različne mišje tumorske celične linije, ki tvorijo različno imunogene tumorske modele. Uporabili smo celično linijo melanoma B16F10, karcinoma dojke 4T1 ter karcinoma debelega črevesa CT26. Obsevali smo jih z dozami pri katerih umre 30, 50 ali 70 % celic ( $IC_{30}$ ,  $IC_{50}$ ,  $IC_{70}$ ), ki smo jih določili s testom klonogenosti, izločanje pa spremljali 4, 24 in 48 h po obsevanju. Pokazali smo, da v primerjavi z ostalima linijama, največ proteina HMGB1 (absolutna vrednost) izloča celična linija 4T1. Izločanje HMGB1 se povečuje z dozo obsevanja, ki pa je signifikantno le 48 ur po obsevanju celične linije CT26 v primerjavi z neobsevanimi kontrolnimi celicami. Naši rezultati kažejo, da je izločanje proteina HMGB1 odvisno od vrste tumorskih celic, doze obsevanja ter časa po obsevanju. Za nadaljnje ovrednotenje ICD pa so potrebne še dodatne raziskave izločanja DAMP.

# LIPOSOMI, FUNKCIONALIZIRANI S STEFINOM A, KOT SISTEM ZA CILJANJE KATEPSINOV S IN L

Andreja Kozak, Lovro Kramer, Georgy Mikhaylov, Olga Vasiljeva, Boris Turk

*Institut Jožef Stefan, Jamova cesta 39, 1000 Ljubljana, Slovenija*

Elektronski naslov: [andreja.kozak@ijs.si](mailto:andreja.kozak@ijs.si)

---

Tumorsko mikrookolje je zapleten sistem, sestavljen iz nerakavih celic in zunajceličnega matriksa (1). Tumorskim celicam omogoča rast in delitev, zato bi lahko ciljanje celic in drugih delov tumorskega mikrookolja uporabili kot alternativne terapije za zdravljenje raka samostojno ali v kombinaciji z že obstoječimi terapijami. Tarče v tumorskem mikrookolju vključujejo proteaze, ki s svojo aktivnostjo pospešujejo razvoj tumorjev in metastaz (2). V našem delu smo uporabili liposome za ciljanje cisteinskih proteaz - katepsinov S in L. Pripravili smo sistem za ciljanje na osnovi liposomov, konjugiranih s stefinom A - endogenim inhibitorjem cisteinskih proteaz ter ga preizkusili *in vitro*, kjer se je uspešno vezal na katepsina S in L ter inhibiral njuno aktivnost. Po aplikaciji liposomov s stefinom A v mišji model raka na dojki so se ti akumulirali na področju tumorja. Ti rezultati kažejo, da je sistem primeren za diagnostične in/ali terapevtske namene pri zdravljenju raka (3).

## Literatura

1. Quail DF, Joyce JA. Microenvironmental regulation of tumor progression and metastasis. *Nature Medicine*. 2013;19(11):1423-37.
2. Kramer L, Turk D, Turk B. The Future of Cysteine Cathepsins in Disease Management. *Trends Pharmacol Sci*. 2017;38(10):873-98.
3. Bratovs A, Kramer L, Mikhaylov G, Vasiljeva O, Turk B. Stefin A-functionalized liposomes as a system for cathepsins S and L-targeted drug delivery. *Biochimie*. 2019;166:94-102.



# VPLIV INDEKSA PUSTE TELESNE MASE NA PREŽIVETJE BOLNIKOV Z RAKOM GLAVE IN VRATU, OBRAVNAVANIH V ENOTI KLINIČNE PREHRANE ONKOLOŠKEGA INŠTITUTA MED LETOMA 2014 IN 2018

Nina Lapornik, Primož Strojjan, Brigita Avramović Brumen, Nada Rotovnik Kozjek

*Onkološki Inštitut Ljubljana, Zaloška cesta 2, 1000 Ljubljana, Slovenija*

Elektronski naslov: lapornik.nina@gmail.com

---

Bolniki z rakom glave in vratu (RGV) spadajo med bolnike z visoko prevalenco nizke mišične mase, ki je povezana z negativnimi zdravstvenimi izidi. Z raziskavo smo želeli ugotoviti povezavo meritve puste mase z bioimpedančno metodo, na osnovi katere se izračuna ocena mišične mase z indeksom puste telesne mase (FFMI), prikaže vpliv na preživetje teh bolnikov. Zanimalo nas je, ali obstaja statistično značilna povezava med vrednostjo FFMI in preživetjem obravnavanih bolnikov ter ali bi lahko FFMI upoštevali kot napovedni dejavnik njihovega slabšega preživetja.

V raziskavo smo vključili vse bolnike z RGV, ki so bili obravnavani na Oddelku za klinično prehrano onkološkega inštituta Ljubljana med letoma 2014 in 2018 ter so ustrezali vsem vključitvenim kriterijem. Retrospektivno smo pregledali dokumentacijo vključenih bolnikov, iz katere smo med drugim pridobili tudi FFMI vrednost. Podatke smo statistično obdelali, preživetje smo ocenili z metodo Kaplan-Meier, univariatnim in multivariatnim regresijskim modelom Cox.

Ugotovili smo, da je delež preživetja po treh letih v skupini s FFMI  $\geq 17$  kg/m<sup>2</sup> pri moških in  $\geq 15$  kg/m<sup>2</sup> pri ženskah 47,7% (IZ: 32,9 %-69,3 %), v skupini s FFMI  $< 17$  kg/m<sup>2</sup> pri moških oz.  $< 15$  kg/m<sup>2</sup> pri ženskah pa 29,4 % (IZ: 18,0 %-47,8 %). Pri analizi rezultatov multivariatnega Cox-ovega regresijskega modela smo ugotovili, da ima vrednost FFMI, tudi ob upoštevanju ostalih spremenljivk, statistično značilen pomen ( $p = 0,029$ ). Vsako povečanje vrednosti FFMI za 1 za 12% zmanjša tveganje za smrt (HR = 0,88; 95% IZ = 0,786-0,987).

# AKTIVACIJA cGAS-STING SIGNALNE POTI PO OBSEVANJU HUMANIH TUMORSKIH MODELOV KARCINOMOV ŽRELA

Kristina Levpušček<sup>1,2</sup>, Simona Kranjc Brezar<sup>1,2</sup>, Tanja Jesenko<sup>1,2</sup>, Gregor Serša<sup>1,3</sup>, Maja Čemažar<sup>1,4</sup>, Primož Strojan<sup>2,5</sup>

<sup>1</sup> Oddelek za eksperimentalno onkologijo, Onkološki inštitut Ljubljana, Zaloška cesta 2, 1000 Ljubljana, Slovenija

<sup>2</sup> Medicinska fakulteta, Univerza v Ljubljani, Vrazov trg 2, 1000 Ljubljana, Slovenija

<sup>3</sup> Zdravstvena fakulteta, Univerza v Ljubljani, Zdravstvena pot 5, 1000 Ljubljana, Slovenija

<sup>4</sup> Fakulteta za vede o zdravju, Univerza na Primorskem, Polje 42, 6310 Izola, Slovenija

<sup>5</sup> Sektor radioterapije, Onkološki inštitut Ljubljana, Zaloška cesta 2, 1000 Ljubljana, Slovenija

Elektronski naslov: skranjc@onko-i.si

---

Rak glave in vratu, kamor spadata tudi ploščatocelični karcinom orofarinksa (PKO) in hipofarinksa (PKH), je v Sloveniji sedmi najpogostejši rak odraslih. V zadnjem desetletju je bila ugotovljena močna povezava med okužbo s humanim papiloma virusom 16 (HPV16) in povečanim tveganjem za nastanek PKO. Pacienti s HPV16 povezanim PKO bolje odgovorijo na zdravljenje z radioterapijo (RT), vendar podobnega učinka pri s HPV16 povezanim PKH ni. Molekularni mehanizmi, ki so odgovorni za boljši odziv na RT pri s HPV16 povezanim PKO, niso popolnoma znani. Eden izmed možnih vzrokov bi bila tudi vpletenost citosolnih senzorjev DNA v odgovor na RT. Študije so pokazale, da se pri obsevanju aktivira signalna pot cGAS-STING, ki je vpletena tudi v protitumorski odziv preko sproščanja interferonov tipa I (IFN I). HPV16 se imunskemu sistemu izogne tako, da zavira signalno pot cGAS-STING. Namen naše študije je bil raziskati aktivacijo signalne poti cGAS-STING kot odziv na obsevanje v s HPV16 povezanimi in s HPV16 nepovezanimi tumorskimi modeli PKO ter PKH. Pri raziskavi smo uporabili tri humane tumorske modele, natančneje dva tumorska modela PKH (FaDu – HPV16 nepovezan, 2A3 – mHPV16 povezan) ter s HPV16 povezan tumorski model PKO (UPCI:SCC090). Protitumorski učinek obsevanja treh humanih tumorskih modelov z različnimi dozami (1x8 Gy in 3x8 Gy) smo določili s spremljanjem zaostanka v rasti tumorjev. Z metodo qRT-PCR smo določili raven izražanja citosolnih senzorjev cGAS in STING ter citokina TNF $\alpha$  na ravni mRNA v tumorjih 72 ur po obsevanju z različnimi dozami. Opazili smo značilno razliko v radiosenzitivnosti med s HPV16 povezanim tumorskim modelom PKO in s tumorskima modeloma PKH, ne glede na njihov HPV16 status, pri obsevanju z 1x8 Gy. Pri frakcioniranem obsevanju s 3x8 Gy pa te razlike nismo opazili. Prav tako ni bilo statistične razlike v odgovoru na obsevanje z različnimi dozami med obema tumorskima modeloma PKH. Povečano izražanje senzorjev DNA in citokina po obsevanju je bilo dozno odvisno. Pri s HPV16 povezanim PKO je kljub primarni zavori signalne poti cGAS-STING po obsevanju prišlo do aktivacije le-te. Povišanega izražanja citokina TNF $\alpha$  v s HPV16 povezanim

PKO nismo opazili, za razliko od ostalih dveh tumorskih modelov PKH. Z raziskavo smo pokazali, da je s HPV16 povezan PKO bolj radiosenzitiven od drugih preučevanih tumorskih modelov pri nižjih dozah. Na to najverjetneje vpliva aktivacija signalne poti cGAS-STING in izražanje citokina  $TNF\alpha$ .



# PROTITUMORSKA UČINKOVITOST GENskega ELEKTROPRENOSA PLAZMIDNE DNA Z ZAPISOM ZA REKOMBINATNO PROTITELO PROTI CTLA-4 V KOMBINACIJI Z OBSEVANJEM

Boštjan Markelc<sup>1,2</sup>, Simona Kranjc Brezar<sup>1,3</sup>, Tanja Jesenko<sup>1,3</sup>, Tim Božič<sup>1,3</sup>, Maja Čemažar<sup>1,4</sup>, Liesl Jacobs<sup>5</sup>, Kevin Hollevoet<sup>5</sup>, Gregor Serša<sup>1,2</sup>

<sup>1</sup> *Oddelek za eksperimentalno onkologijo, Onkološki inštitut Ljubljana, Zaloška cesta 2, 1000 Ljubljana, Slovenija*

<sup>2</sup> *Zdravstvena fakulteta, Univerza v Ljubljani, Zdravstvena pot 5, 1000 Ljubljana, Slovenija*

<sup>3</sup> *Medicinska fakulteta, Univerza v Ljubljani, Vrazov trg 2, 1000 Ljubljana, Slovenija*

<sup>4</sup> *Fakulteta za vede o zdravju, Univerza na Primorskem, Polje 42, 6310 Izola, Slovenija*

<sup>5</sup> *Laboratorij za terapevtska in diagnostična protitelesa, KU Leuven – Univerza v Leuvnu, Leuven, Belgija*

Elektronski naslov: bmarkelc@onko-i.si

---

Rekombinantna monoklonska protitelesa (mAbs), ki ciljajo imunske kontrolne točke (IKT) so med najbolj obetavnimi pristopi zdravljenja raka. Leta 2011 je bila odobrena uporaba sistemske infuzije protitelesa ipilimumab proti citotoksičnemu T-limfocitnemu antigenu-4 (CTLA-4) za zdravljenje melanoma, čemur je sledila odobritev več drugih mAbs, ki ciljajo tudi druge IKT. Pokazalo se je tudi, da se z intratumorskim injiciranjem imunomodulatornih mAbs lahko izognemo visokim koncentracijam le-teh v krvi in s tem povezano sistemsko toksičnostjo. Hkrati pa se lahko dosežejo višje intratumorske koncentracije v primerjavi s sistemsko infuzijo. Vendar so bile tudi pri tem pristopu potrebne večkratne aplikacije mAbs. Prenos genov, ki kodirajo za mAbs predstavlja stroškovno učinkovito alternativo konvencionalni proizvodnji, čiščenju in aplikaciji le-teh. Ta inovativni pristop uporablja DNA, ki kodira za mAbs, namesto aplikacije samih mAbs, kar omogoča, da se le ta proizvajajo v pacientovemu telesu tekom daljšega časovnega obdobja. Zato smo v naši raziskavi plazmidno DNA, ki kodira za rekombinantno protiteleso proti CTLA-4 (pDNA-aCTLA4), z genskim elektroprenosom (GET) vnesli v mišje tumorje debelega črevesja MC38 z namenom doseči dolgotrajno lokalno produkcijo protitelesa sočasno z njegovo nizko sistemsko koncentracijo. Ker je ciljanje IKT še posebej učinkovito v kombinaciji z ablativnimi metodami zdravljenja, ki povzročajo imunogeno celično smrt, kot je med drugim tudi radioterapija, smo raziskali tudi kombinacijo intratumorskega GET pDNA-aCTLA4 ter obsevanja. V raziskavi smo potrdili, da po GET pDNA-aCTLA4 pride do izražanja mAbs proti CTLA-4, pri čemer je bila njihova koncentracija v krvnem obtoku nizka. Pokazali smo tudi, da je intratumorski GET pDNA-aCTLA4 bolj učinkovit v kombinaciji s frakcioniranim obsevanjem (3x 5 Gy) kot v kombinaciji z enkratno dozo 10 Gy. Raziskava je pokazala potencial kombinacije intratumorskega GET pDNA-aCTLA4 ter radioterapije za zdravljenje raka debelega črevesja.



# VZPOSTAVITEV IN OVREDNOTENJE RADIOOBČUTLJIVOSTI HPV-POZITIVNEGA MIŠJEGA MODELA PLOŠČATOCELIČNEGA KARCINOMA USTNEGA PREDELA

Živa Modic<sup>1,2</sup>, Maja Čemažar<sup>1,3</sup>, Simona Kranjc Brezar<sup>1,2</sup>, Boštjan Markelc<sup>1,4</sup>, Gregor Serša<sup>1,4</sup>, Tanja Jesenko<sup>1,2</sup>

<sup>1</sup> Oddetek za eksperimentalno onkologijo, Onkološki inštitut Ljubljana, Zaloška cesta 2, 1000 Ljubljana, Slovenija

<sup>2</sup> Medicinska fakulteta, Univerza v Ljubljani, Vrazov trg 2, 1000 Ljubljana, Slovenija

<sup>3</sup> Fakulteta za vede o zdravju, Univerza na Primorskem, Polje 42, 6130 Izola, Slovenija

<sup>4</sup> Zdravstvena fakulteta, Univerza v Ljubljani, Zdravstvena pot 5, 1000 Ljubljana, Slovenija

Elektronski naslov: zmodic@onko-i.si

Ploščatocelični karcinom ustnega predela (PK) zaobjema raka ustne votline, ustnice ter ustnega dela žrela. Okužba z visoko rizičnimi podtipi humanega papilomavirusa (HPV) je eden od dejavnikov tveganja za razvoj PK, vpliva pa tudi na boljši odziv nekaterih tipov PK na zdravljenje (1,2). Zaradi vrstne specifičnosti HPV so mišji tumorski modeli redki, zato je preučevanje teh vrst tumorjev oteženo. Namen naše raziskave je bil vzpostavitev in ovrednotenje radioobčutljivosti HPV-pozitivnega mišjega modela PK s stabilnim izražanjem onkogenov E6 in E7 virusa HPV-16. Z retrovirusno transdukcijo smo iz mišje celične linije PK MOC1 vzpostavili monoklonski HPV-pozitivni celični liniji (MOC1-HPV K1 in MOC1-HPV K3), v katerih smo potrdili stabilno izražanje E6 in E7 na RNA in proteinskem nivoju. Določili smo radioobčutljivost na *in vitro* ter *in vivo* nivoju. Z imunofluorescenčnim barvanjem zmrzlih rezin tumorjev smo določili prisotnost hipoksije (EF5), ožiljenosti (CD31) in proliferacije (EdU). Na *in vitro* nivoju po obsevanju z naraščajočimi dozami s testom klonogenosti nismo zaznali statistično značilnih razlik v radioobčutljivosti HPV celičnih linij glede na starševsko linijo. Obsevanje tumorskega modela MOC1-HPV K1 z dozo 15 Gy pa je vodilo v daljši zaostanek v rasti tumorjev napram modeloma MOC1 in MOC1-HPV K3. Z imunofluorescenčnim barvanjem smo v tumorjih MOC1-HPV K1 zaznali nižjo raven hipoksije ter večji delež proliferajočih se celic, kar nakazuje na možen mehanizem povečane radioobčutljivosti tumorskega modela MOC1-HPV K1. Za natančno opredelitev in potrditev primernosti modela so potrebne še nadaljnje raziskave.

## Literatura

1. Sathish N, Wang X, Yuan Y. Human papillomavirus (HPV)-associated oral cancers and treatment strategies. *J Dent Res.* 2014;93(7):29S-36S.
2. Chaturvedi AK, Engels EA, Anderson WF, Gillison ML. Incidence trends for human papillomavirus-related and unrelated oral squamous cell carcinomas in the United States. *J Clin Oncol.* 2008;26(4):612-9.

# RAZVOJ AVTOLOGNE TUMORSKE VAKCINE PRIPRAVLJENE Z OBSEVANJEM

Tinkara Remic<sup>1,2</sup>, Gregor Serša<sup>1,3</sup>, Katja Uršič Valentinuzzi<sup>1,4</sup>, Kristina Levpušček<sup>1,2</sup>,  
Urša Lampreht Tratar<sup>1</sup>, Maja Čemažar<sup>1,5</sup>, Urška Kamensek<sup>1,4</sup>

<sup>1</sup> Oddelek za eksperimentalno onkologijo, Onkološki Inštitut Ljubljana, Zaloška cesta 2, 1000 Ljubljana, Slovenija

<sup>2</sup> Medicinska fakulteta, Univerza v Ljubljani, Vrazov trg 2, 1000 Ljubljana, Slovenija; <sup>3</sup> Zdravstvena fakulteta, Univerza v Ljubljani, Zdravstvena pot 5, 1000 Ljubljana, Slovenija

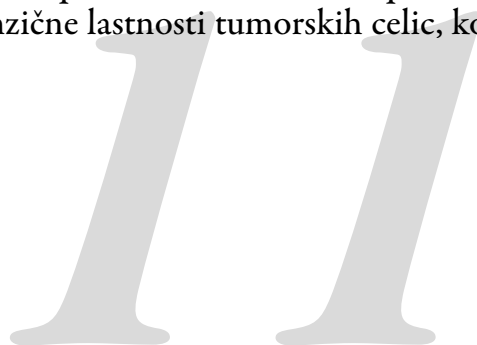
<sup>4</sup> Biotehniška fakulteta, Univerza v Ljubljani, Jamnikarjeva ulica 101, 1000 Ljubljana, Slovenija

<sup>5</sup> Fakulteta za zdravstvene vede, Univerza na Primorskem, Polje 42, Izola, 6310 Izola, Slovenija

Elektronski naslov: ukamensek@onko-i.si

---

Tumorske celice predstavljajo odličen vir tumorskih antigenov, ki ga lahko izkoristimo za pripravo tumorskih vakcin. V naši raziskavi smo vakcino pripravili iz tumorskih celic ubitih z obsevanjem. K vakcini smo kot imunološki adjuvant dodali *in vivo* genski elektroprenos (GEP) gena za imunostimulatorni citokin interlevkin 12 (IL-12). GEP je varna nevirusna oblika genske terapije, ki omogoča lokalno transfekcijo tkiva *in vivo*. Najbolj raziskan je ravno GEP IL-12, ki ga, poleg monoterapije, preskušamo tudi kot adjuvant k vakcinaciji sproženi *in situ* z lokalno ablacijo tumorja. V tej raziskavi pa smo se lotili priprave vakcine *ex vivo*. Učinkovitost vakcine smo testirali na dveh tumorskih modelih (mišjem melanomu B16-F10 in kolorektalnem karcinomu CT26) v kombinaciji z radioterapijo, s katero smo želeli izpostaviti tumorske antigene. Vakcinacijo smo izvedli v kožo miši in testirali njeno protitumorsko učinkovitost, vpliv na izrast tumorjev in na koncu tudi aktivacijo imunskega odziva z imunohistološko analizo vzorcev mesta vakcinacije in tumorjev ter ovrednotenjem tumorsko specifičnih imunskih celic v bližnjih bezgavkah z analizo FluoroSpot. Pokazali smo, da vakcinacija značilno doprinese k protitumorskemu učinku obsevanja pri obeh tumorskih modelih ter prepreči izrast do 56 % tumorjev CT26. Z izbranim obsevalnim ( $5 \times 5$  Gy) in vakcinacijskim režimom ( $1 \times$  za B16-F10 in  $3 \times$  za CT26) smo potrdili tudi lokalni in sistemski imunski odziv na vakcinacijo, ki se je razlikoval glede na imunogenosti uporabljenega tumorskega modela. Raziskava predstavlja prve korake k potrditvi pristopa, ki bi lahko bil primeren za zdravljenje globoko ležečih tumorjev pri pacientih zdravljenih z radioterapijo, pri katerih bi biopsija tumorja predstavljala vir za pripravo avtologne tumorske vakcine. Raziskava pa je tudi nakazala, da bo za uporabo takšnih vakcin potreben individualiziran pristop, ki bo upošteval tako intrinzične lastnosti tumorskih celic, kot tudi lastnosti tumorskega mikrookolja.





# INDEKS AVTORJEV

## A

Avramović Brumen Brigita 66

## B

Bešić Nikola 60

Bošnjak Roman 12, 62

Božič Tim 59, 63, 69

Brekalo Nina 60

Breznik Barbara 12, 62

## C

Casar Božidar 63

Cencelj-Arnež Romi 60

## Č

Čemažar Maja 12, 16, 37, 59, 62, 63, 64, 67, 69, 70,  
71

## D

Dolžan Vita 21

Doma Andrej 42

## G

Goričar Katja 21

## H

Habič Anamarija 12, 62

Hollevoet Kevin 69

## J

Jacobs Liesl 69

Jesenko Tanja 12, 63, 64, 67, 69, 70

## K

Kamenšek Urška 71

Kešar Urša 64

Kozak Andreja 65

Kozjek Mencinger Lucija 59

Kramer Lovro 65

Kranjc Brezar Simona 59, 63, 67, 69, 70

## L

Lah Turnšek Tamara 12, 62

Lamprecht Tratar Urša 71

Lapornik Nina 66

Levpušček Kristina 67, 71

Ležaić Luka 25

## M

Majc Bernarda 12, 62

Majger Martina 54

Marinko Tanja 21, 31

Markelc Boštjan 59, 62, 63, 64, 69, 70

Mavrič Zlatka 60

Mendez Carot Ignacio 63

Meznarič Metka 47

Mikhaylov Georgy 65

Mlakar Jernej 12

Modic Živa 63, 70

## N

Novak Metka 12, 62

## O

Oblak Irena 47

## P

Pogorevčnik Lea 54

Porčnik Andrej 12, 62

## R

Remic Tinkara 71

Robida Anja 54

Rotovnik Kozjek Nada 66

## S

Savarin Monika 37

Serša Gregor 16, 37, 63, 64, 67, 69, 70, 71

Skoblar Vidmar Marija 12, 42

Smrdel Uroš 42

Strojan Primož 64, 66, 67

Studen Andrej 42

## T

Turk Boris 65

## U

Uršič Valentinuzzi Katja 64, 71

Ušeničnik Urška 12

## V

Vasiljeva Olga 65

Vojvodič Ilija 63

## Z

Zevnik Katarina 42

## Ž

Žager Marcius Valerija 47, 54

# SPONZORJI



**KLJUČ ZA  
VEČ PRILOŽNOSTI PRI ZDRAVLJENJU  
VAŠIH BOLNIKOV**

**KEYTRUDA®**  
(pembrolizumab, MSD)

## KEYTRUDA je odobrena za zdravljenje 20 indikacij rakavih obolenj<sup>1</sup>

Referenca: 1. Keytruda EU SmPC

### SKRAJŠAN POVZETEK GLAVNIH ZNAČILNOSTI ZDRAVILA • Pred predpisovanjem, prosimo, preberite celoten Povzetek glavnih značilnosti zdravila!

**Ime zdravila:** KEYTRUDA 25 mg/ml koncentrat za raztopino za infundiranje vsebuje pembrolizumab. **Terapevtske indikacije:** Zdravilo KEYTRUDA je kot samostojno zdravljenje indicirano za zdravljenje: napredovalnega (neoperabilnega ali metastatskega) melanoma pri odraslih; za adjuvantno zdravljenje odraslih z melanomom v stadiju III, ki se je razširil na bezgavke, po popolni kirurški odstranitvi; metastatskega nedrobnoceličnega pljučnega raka (NSCLC) v prvi liniji zdravljenja pri odraslih, ki imajo tumorje z  $\geq 50\%$  izraženošjo PD-L1 (TPS) in brez pozitivnih tumorskih mutacij EGFR ali ALK; lokalno napredovalnega ali metastatskega NSCLC pri odraslih, ki imajo tumorje z  $\geq 1\%$  izraženošjo PD-L1 (TPS) in so bili predhodno zdravljeni z vsaj eno shemo kemoterapije, bolniki s pozitivnimi tumorskimi mutacijami EGFR ali ALK so pred prejemom kemoterapije morali prejeti tudi tarčno zdravljenje; odraslih in pediatričnih bolnikov, starih 3 leta ali več, s ponovljenim ali neodzivnim klasičnim Hodgkinovim limfomom (CHL), pri katerih avtologna presaditev matičnih celic (ASCT) ni bila uspešna, ali po najmanj dveh predhodnih zdravljenjih kadar ASCT ne pride v poštev kot možnost zdravljenja; lokalno napredovalnega ali metastatskega urotelijskega raka pri odraslih, predhodno zdravljenih s kemoterapijo, ki je vključevala platinu; lokalno napredovalnega ali metastatskega urotelijskega raka pri odraslih, ki niso primerni za zdravljenje s kemoterapijo, ki vsebuje cisplatin in imajo tumorje z izraženošjo PD-L1  $\geq 10$ , ocenjeno s kombinirano pozitivno oceno (CPS); ponovljenega ali metastatskega ploščatoceličnega raka glave in vratu (HNSCC) pri odraslih, ki imajo tumorje z  $\geq 50\%$  izraženošjo PD-L1 (TPS), in pri katerih je bolezen napredovala med zdravljenjem ali po zdravljenju s kemoterapijo, ki je vključevala platinu; za adjuvantno zdravljenje odraslih z rakom ledvičnih celic s povišanim tveganjem za ponovitev bolezni po nefrektomiji, ali po nefrektomiji in kirurški odstranitvi metastatskih lezij, za prvo linijo zdravljenja metastatskega kolorektalnega raka z visoko mikrosatelitsko nestabilnostjo (MSI-H – microsatellite instability-high) ali s pomanjkljivim popraviljem neujemanja pri podvojevanju DNA (dMMR – mismatch repair deficient) pri odraslih in za zdravljenje MSI-H ali dMMR tumorjev pri odraslih z; neoperabilnim ali metastatskim kolorektalnim rakom po predhodnem kombiniranem zdravljenju, ki je temeljilo na fluoropirimidinu; napredovalni ali ponovljeni rakom endometrija, pri katerih je bolezen napredovala med ali po predhodnem zdravljenju, ki je vključevalo platinu, v katerih koli terapevtskih okoliščinah, in ki niso kandidati za kurativno operacijo ali obsevanje; neoperabilnim ali metastatskim rakom želodca, tankega črevesa ali žolčnika in žolčnih vodov, pri katerih je bolezen napredovala med ali po vsaj enem predhodnem zdravljenju. Zdravilo KEYTRUDA je kot samostojno zdravljenje ali v kombinaciji s kemoterapijo s platinu in 5-fluorouracilom (5-FU) indicirano za prvo linijo zdravljenja metastatskega ali neoperabilnega ponovljenega ploščatoceličnega raka glave in vratu pri odraslih, ki imajo tumorje z izraženošjo PD-L1 s CPS  $\geq 1$ . Zdravilo KEYTRUDA je v kombinaciji s pemetreksedom in kemoterapijo na osnovi platine indicirano za prvo linijo zdravljenja metastatskega neploščatoceličnega NSCLC pri odraslih, pri katerih tumorji nimajo pozitivnih mutacij EGFR ali ALK; v kombinaciji s karboplatinom in bodisi paklitakselom bodisi nab-paklitakselom je indicirano za prvo linijo zdravljenja metastatskega ploščatoceličnega NSCLC pri odraslih; v kombinaciji z akitinibom ali v kombinaciji z lenvatinitom je indicirano za prvo linijo zdravljenja napredovalnega raka ledvičnih celic (RCC) pri odraslih; v kombinaciji s kemoterapijo s platinu in fluoropirimidinom je indicirano za prvo linijo zdravljenja lokalno napredovalnega neoperabilnega ali metastatskega raka požiralnika ali HER-2 negativnega adenokarcinoma gastroezofagealnega prehoda pri odraslih, ki imajo tumorje z izraženošjo PD-L1 s CPS  $\geq 10$ ; v kombinaciji s kemoterapijo je indicirano za zdravljenje lokalno ponovljenega neoperabilnega ali metastatskega trojno negativnega raka dojke pri odraslih, ki imajo tumorje z izraženošjo PD-L1 s CPS  $\geq 10$  in predhodno niso prejeli kemoterapije za metastatsko bolezen; v kombinaciji z lenvatinitom je indicirano za zdravljenje napredovalnega ali ponovljenega raka endometrija (EC) pri odraslih z napredovalno boleznijo med ali po predhodnem zdravljenju s kemoterapijo, ki je vključevala platinu, v katerih koli terapevtskih okoliščinah, in ki niso kandidati za kurativno operacijo ali obsevanje; v kombinaciji s kemoterapijo, z bevacizumabom ali brez njega, je indicirano za zdravljenje persistentnega, ponovljenega ali metastatskega raka materničnega vratu pri odraslih bolnikih, ki imajo tumorje z izraženošjo PD-L1 s CPS  $\geq 1$ . **Odmernjevanje in način uporabe:** Testiranje PD-L1: Če je navedeno v indikaciji, je treba izbrati bolnika za zdravljenje z zdravilom KEYTRUDA na podlagi MSI-H/dMMR statusa tumorja potrditi z validirano preiskavo. **Odmernjevanje:** Priporočeni odmerek zdravila KEYTRUDA pri odraslih je bodisi 200 mg na 3 tedne ali 400 mg na 6 tednov, apliciran z intravenozno infuzijo v 30 minutah. Priporočeni odmerek zdravila KEYTRUDA za samostojno zdravljenje pri pediatričnih bolnikih s CHL, starih 3 leta ali več, je 2 mg/kg telesne mase (do največ 200 mg) na 3 tedne, apliciran z intravenozno infuzijo v 30 minutah. Za uporabo v kombinaciji glejte povzetke glavnih značilnosti zdravil sočasno uporabljenih zdravil. Če se uporablja kot del kombiniranega zdravljenja skupaj z intravenozno kemoterapijo, je treba zdravilo KEYTRUDA aplicirati prvo. Bolnike je treba zdraviti do napredovanja bolezni ali nesprejemljivih toksičnih učinkov (in do maksimalnega trajanja zdravljenja, če je le to določeno za indikacijo). Pri adjuvantnem zdravljenju melanoma ali RCC je treba zdravilo uporabljati do ponovitve bolezni, pojava nesprejemljivih toksičnih učinkov oziroma mora zdravljenje trajati do enega leta. Če je akitinib uporabljen v kombinaciji s pembrolizumabom, se lahko razmislilo o povečanju odmerka akitiniba nad začetnih 5 mg v presledkih šest tednov ali več. V primeru uporabe v kombinaciji z lenvatinitom je treba zdravljenje z enim ali obema zdraviloma prekiniti, kot je primerno. Uporaba lenvatinita je treba zadržati, odmerke zmanjšati ali prenehati z uporabo, v skladu z navodili v povzetku glavnih značilnosti zdravila za lenvatinitin, in sicer za kombinacijo s pembrolizumabom. Pri bolnikih starih  $\geq 65$  let, bolnikih z blago do zmerno okvaro ledvic, bolnikih z blago okvaro jeter prilagoditev odmerka ni potrebna. **Odklopitev odmerka ali ukinitve zdravljenja:** Zmanjšanje odmerka zdravila KEYTRUDA ni priporočljivo. Za obvladovanje neželenih učinkov je treba uporabo zdravila KEYTRUDA zadržati ali ukiniti, prosimo, glejte celoten Povzetek glavnih značilnosti zdravila. **Kontraindikacije:** Preobčutljivost na učinkovino ali katero koli pomožno snov. **Povzetek**

**posebnih opozoril, previdnostnih ukrepov, interakcij in neželenih učinkov: Imunsko pogojeni neželeni učinki** (pnevmonitis, kolitis, hepatitis, nefritis, endokrinopatie, neželeni učinki na kožo in drugi): Pri bolnikih, ki so prejeli pembrolizumab, so se pojavili imunsko pogojeni neželeni učinki, vključno s hudimi in smrtnimi primeri. Večina imunsko pogojenih neželenih učinkov, ki so se pojavili med zdravljenjem s pembrolizumabom, je bila reverzibilnih in so jih obvladali s prekinjivimi uporabe pembrolizumaba, uporabo kortikosteroidov in/ali podporno oskrbo. Pojavijo se lahko tudi po zadnjem odmerku pembrolizumaba in hkrati prizadanejo več organskih sistemov. V primeru suma na imunsko pogojene neželene učinke je treba poskrbeti za ustrezno oceno za potrditev etiologije oziroma izključitev drugih vzrokov. Glede na izrazitost neželenega učinka je treba zadržati uporabo pembrolizumaba in uporabiti kortikosteroide – za natančna navodila, prosimo, glejte Povzetek glavnih značilnosti zdravila Keytruda. Zdravljenje s pembrolizumabom lahko poveča tveganje za zavrnitev pri prejemnikih presadkov čvrstih organov. Pri bolnikih, ki so prejeli pembrolizumab, so poročali o hudih z infuzijo povezanih reakcijah, vključno s preobčutljivostjo in anafilaksijo. Pembrolizumab se iz obtoka odstrani s katabolizmom, zato presnovnih medsebojnih delovanj zdravil ni pričakovati. Uporabi sistemskih kortikosteroidov ali imunosupresivov pred uvedbo pembrolizumaba se je treba izogibati, ker lahko vplivajo na farmakodinamično aktivnost in učinkovitost pembrolizumaba. Vendar pa je kortikosteroide ali druge imunosupresive mogoče uporabiti za zdravljenje imunsko pogojenih neželenih učinkov. Kortikosteroide je mogoče uporabiti tudi kot premedikacijo, če je pembrolizumab uporabljen v kombinaciji s kemoterapijo, kot antiemetično profilakso in/ali za ublažitev neželenih učinkov, povezanih s kemoterapijo. Ženske v rodni dobi morajo med zdravljenjem s pembrolizumabom in vsaj še 4 mesece po zadnjem odmerku pembrolizumaba uporabljati učinkovito kontracepcijo, med nosečnostjo in dojenjem se ga ne sme uporabljati. Varnost pembrolizumaba pri samostojnem zdravljenju so v kliničnih študijah ocenili pri 7.148 bolnikih z napredovalnim melanomom, kirurško odstranjenim melanomom v stadiju III (adjuvantno zdravljenje), NSCLC, cHL, urotelijskim rakom, HNSCC, CRC, rakom endometrija, želodca, tankega črevesa, žolčnika, trebušne slinavke ali adjuvantnim zdravljenjem RCC s štirimi odmerki (2 mg/kg telesne mase na 3 tedne, 200 mg na 3 tedne in 10 mg/kg telesne mase na 2 ali 3 tedne). V tej populaciji bolnikov je mediani čas opazovanja znašal 79 meseca (v razponu od 1 dneva do 39 mesecev), najpogostejši neželeni učinki zdravljenja s pembrolizumabom pa so bili utrujenost (31 %), diareja (22 %) in navzea (21 %). Večina poročanih neželenih učinkov pri samostojnem zdravljenju je bila po izrazitosti 1. ali 2. stopnje. Najresnejši neželeni učinki so bili imunsko pogojeni neželeni učinki in hude z infuzijo povezane reakcije. Pojavnost imunsko pogojenih neželenih učinkov pri uporabi pembrolizumaba samega za adjuvantno zdravljenje (n = 1.480) je znašala 36,1 % za vse stopnje in 8,9 % od 3. do 5. stopnje, pri metastatski bolezni (n = 5.375) pa 24,2 % za vse stopnje in 6,4 % od 3. do 5. stopnje. Pri adjuvantnem zdravljenju niso zaznali nobenih novih imunsko pogojenih neželenih učinkov. Varnost pembrolizumaba pri kombiniranem zdravljenju s kemoterapijo so ocenili pri 3.123 bolnikih z NSCLC, HNSCC, rakom požiralnika, TNBC ali rakom materničnega vratu, ki so v kliničnih študijah prejeli pembrolizumab v odmerkih 200 mg, 2 mg/kg telesne mase ali 10 mg/kg telesne mase na vsake 3 tedne. V tej populaciji bolnikov so bili najpogostejši neželeni učinki naslednji: anemija (55 %), navzea (54 %), utrujenost (38 %), neutropenija (36 %), zaprtost (35 %), alopecija (35 %), diareja (34 %), bruhanje (28 %) in zmanjšanje apetita (27 %). Pojavnost neželenih učinkov 3. do 5. stopnje je pri bolnikih z NSCLC pri kombiniranem zdravljenju s pembrolizumabom znašala 67 % in pri zdravljenju samo s kemoterapijo 66 %, pri bolnikih s HNSCC pri kombiniranem zdravljenju s pembrolizumabom 85 % in pri zdravljenju s kemoterapijo v kombinaciji s cetuksinabom 84 %, pri bolnikih z rakom požiralnika pri kombiniranem zdravljenju s pembrolizumabom 86 % in pri zdravljenju samo s kemoterapijo 83 %, pri bolnikih s TNBC pri kombiniranem zdravljenju s pembrolizumabom 78 % in pri zdravljenju samo s kemoterapijo 74 % in pri bolnikih z rakom materničnega vratu pri kombiniranem zdravljenju s pembrolizumabom 82 % in pri zdravljenju samo s kemoterapijo 75 %. Varnost pembrolizumaba v kombinaciji z akitinibom ali lenvatinitom pri napredovalnem RCC in v kombinaciji z lenvatinitom pri napredovalnem EC so ocenili pri skupno 1.456 bolnikih z napredovalnim RCC ali napredovalim EC, ki so v kliničnih študijah prejeli 200 mg pembrolizumaba na 3 tedne skupaj s 5 mg akitiniba dvakrat na dan ali z 20 mg lenvatinita enkrat na dan, kot je bilo ustrezno. V tej populaciji bolnikov so bili najpogostejši neželeni učinki diareja (58 %), hipertenzija (54 %), hipotiroidizem (46 %), utrujenost (41 %), zmanjšani apetit (40 %), navzea (40 %), artralgija (30 %), bruhanje (28 %), zmanjšanje telesne mase (28 %), disfonija (28 %), bolečine v trebuhu (28 %), proteinurija (27 %), sindrom palmarno-planarne eritrodizestezije (26 %), izpuščaji (26 %), stomatitis (25 %), zaprtost (25 %), mišično-skeletna bolečina (23 %), glavobol (23 %) in kašelj (21 %). Neželenih učinkov od 3. do 5. stopnje je bilo pri bolnikih z RCC med uporabo pembrolizumaba v kombinaciji z akitinibom ali lenvatinitom 80 % in med uporabo sunitiniba samega 71 %. Pri bolnikih z EC je bilo neželenih učinkov od 3. do 5. stopnje med uporabo pembrolizumaba v kombinaciji z lenvatinitom 89 % in med uporabo kemoterapije same 73 %. Za celoten seznam neželenih učinkov, prosimo, glejte celoten Povzetek glavnih značilnosti zdravila. Za dodatne informacije o varnosti v primeru uporabe pembrolizumaba v kombinaciji glejte povzetke glavnih značilnosti zdravila za posamezne komponente kombiniranega zdravljenja. **Način in režim izdaje zdravila:** H – Predpisovanje in izdaja zdravila je le na recept, zdravilo se uporablja samo v bolnišnicah. **Imetnik dovoljenja za promet z zdravilom:** Merck Sharp & Dohme B.V., Waarderweg 39, 2031 BN Haarlem, Nizozemska.



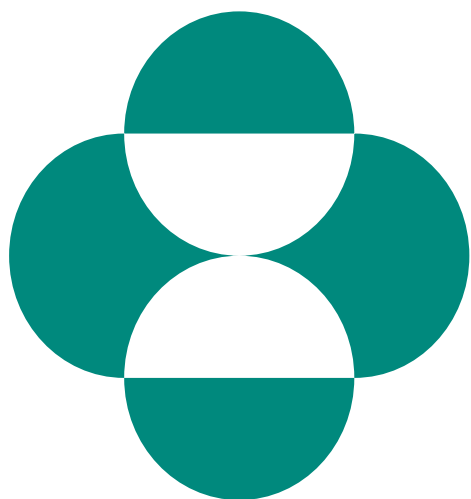
Merck Sharp & Dohme inovativna zdravila d.o.o.,  
Ameriška ulica 2, 1000 Ljubljana,

tel: +386 1/ 520 42 01, fax: +386 1/ 520 43 50;  
Pripravljen v Sloveniji, 05/2022; SI-KEY-00441 EXP: 2024/05

Samo za strokovno javnost.

Predpisovanje in izdaja zdravila je le na recept, zdravilo pa se uporablja samo v bolnišnicah. Pred predpisovanjem, prosimo, preberite celoten Povzetek glavnih značilnosti zdravila Keytruda, ki je na voljo pri naših strokovnih sodelavcih ali na lokalnem sedežu družbe.

SPONZORJI



**MSD**

**MERCK**

 **VWR**<sup>TM</sup>  
part of avantor

# SPONZORJI

## TANTUM VERDE®

benzidaminijev klorid

**Za lajšanje bolečine in oteklin v ustni votlini in žrelu, ki so posledica radiomukozitisa**



Bistvene informacije iz Povzetka glavnih značilnosti zdravila

**Tantum Verde 1,5 mg/ml oralno pršilo, raztopina**

**Tantum Verde 3 mg/ml oralno pršilo, raztopina**

**Sestava 1,5 mg/ml:** 1 ml raztopine vsebuje 1,5 mg benzidaminijevga klorida, kar ustreza 1,34 mg benzidamina. V enem razpršku je 0,17 ml raztopine. En razpršek vsebuje 0,255 mg benzidaminijevga klorida, kar ustreza 0,2278 mg benzidamina. **Sestava 3 mg/ml:** 1 ml raztopine vsebuje 3 mg benzidaminijevga klorida, kar ustreza 2,68 mg benzidamina. V enem razpršku je 0,17 ml raztopine. En razpršek vsebuje 0,51 mg benzidaminijevga klorida, kar ustreza 0,4556 mg benzidamina. **Terapevtske indikacije:** **Samozdravljenje:** Lajšanje bolečine in oteklin pri vnetju v ustni votlini in žrelu, ki so lahko posledica okužb in stanj po operaciji. **Po nasvetu in navodilu zdravnika:** Lajšanje bolečine in oteklin v ustni votlini in žrelu, ki so posledica radiomukozitisa. **Odmerjanje in način uporabe:** **Odmerjanje 1,5 mg/ml:** Odrasli: 4 do 8 razprškov 2- do 6-krat na dan (vsake 1,5 do 3 ure). **Pediatrična populacija:** Mladostniki, stari od 12 do 18 let: 4-8 razprškov 2- do 6-krat na dan. Otroci od 6 do 12 let: 4 razprški 2- do 6-krat na dan. Otroci, mlajši od 6 let: 1 razpršek na 4 kg telesne mase; do največ 4 razprške 2- do 6-krat na dan. **Odmerjanje 3 mg/ml:** Uporaba 2- do 6-krat na dan (vsake 1,5 do 3 ure). Odrasli: 2 do 4 razprški 2- do 6-krat na dan. **Pediatrična populacija:** Mladostniki, stari od 12 do 18 let: 2 do 4 razprški 2- do 6-krat na dan. Otroci od 6 do 12 let: 2 razprška 2- do 6-krat na dan. Otroci, mlajši od 6 let: 1 razpršek na 8 kg telesne mase; do največ 2 razprška 2- do 6-krat na dan. **Starejši bolniki, bolniki z jetrno okvaro in bolniki z ledvično okvaro:** Uporabo oralnega pršila z benzidaminijevim kloridom se svetuje pod nadzorom zdravnika. **Način uporabe:** Za orofaringealno uporabo. Zdravilo se razprši v usta in žrelo. **Kontraindikacije:** Preobčutljivost na učinkovino ali katero koli pomožno snov. **Posebna opozorila in previdnostni ukrepi:** Če se simptomi v treh dneh ne izboljšajo, se mora bolnik posvetovati z zdravnikom ali zobozdravnikom, kot je primerno. Benzidamin ni priporočljiv za bolnike s preobčutljivostjo na salicilno kislino ali druga nesteroidna protivnetna zdravila. Pri bolnikih, ki imajo ali so imeli bronhialno astmo, lahko pride do bronhospazma, zato je potrebna previdnost. To zdravilo vsebuje majhne količine etanola (alkohola), in sicer manj kot 100 mg na odmerek. To zdravilo vsebuje metilparahidroksibenzoat (E218). Lahko povzroči alergijske reakcije (lahko zapoznele). Zdravilo z jakostjo 3 mg/ml vsebuje makrogolglicerol hidroksistearat 40. Lahko povzroči želodčne težave in drisko. **Medsebojno delovanje z drugimi zdravili in druge oblike interakcij:** Študij medsebojnega delovanja niso izvedli. **Nosečnost in dojenje:** O uporabi benzidamina pri nosečnicah in doječih ženskah ni zadostnih podatkov. Uporaba zdravila med nosečnostjo in dojenjem ni priporočljiva. **Vpliv na sposobnost vožnje in upravljanja strojev:** Zdravilo v priporočenem odmerku nima vpliva na sposobnost vožnje in upravljanja strojev. **Neželeni učinki:** Neznana pogostnost (ni mogoče oceniti iz razpoložljivih podatkov): anafilaktične reakcije, preobčutljivostne reakcije, odrevenelost, laringospazem, suha usta, navzea in bruhanje, angioedem, fotosenzitivnost, pekoč občutek v ustih. Neposredno po uporabi se lahko pojavi občutek odrevenelosti v ustih in v žrelu. Ta učinek se pojavi zaradi načina delovanja zdravila in po kratkem času izgine. **Način in režim izdaje zdravila:** BRP-Izdaja zdravila je brez recepta v lekarnah in specializiranih prodajalnah.

**Imetnik dovoljenja za promet:** Aziende Chimiche Riunite Angelini Francesco – A.C.R.A.F. S.p.A., Viale Amelia 70, 00181 Rim, Italija **Datum zadnje revizije besedila:** 14. 10. 2019

Pred svetovanjem ali izdajo preberite celoten Povzetek glavnih značilnosti zdravila.

Samo za strokovno javnost.

Datum priprave informacije: november 2019

Odgovoren za trženje: Bonifar d.o.o.

PR/BS/IB/EN/2021/007

  
ANGELINI

## SPONZORJI



### LILLY – ŽIVETI BOLJE

Ljudje smo od nekdaj vedoželjni, polni upanja in vztrajnosti. Odkritja so naš namen na tem planetu. Od same ustanovitve družbe Lilly je jasno naše poslanstvo in cilj. Po več kot stoletju, skoraj 100 zdravljenih in nešteti novostih, nadaljujemo z iskanjem naslednjega velikega odkritja, ki bo izboljšalo življenje ljudem po svetu.

Eli Lilly farmacevtska družba, d.o.o., Dunajska cesta 167, 1000 Ljubljana  
telefon 01 / 580 00 10, faks 01 / 569 17 05

PP-LILLY-SI-0092, 9.6.2021

The Lilly logo, featuring the word 'Lilly' in a white, cursive script font.





