

ZBORNİK PRISPEVKOV

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

14. maj 2021

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:	Pfizer Luxembourg SARL, Podružnica Ljubljana Merck Sharp & Dohme, inovativna zdravila d.o.o. Gorenje GTI trgovina, inženiring, d.o.o., Philips Healthcare Janssen, farmacevtski del Johnson & Johnson d.o.o. Eli Lilly farmacevtska družba d.o.o. Bonifar d.o.o. Mediline d.o.o. Merck d.o.o. GH Holding d.o.o., GE Healthcare VWR, International GmbH, Part of Avantor Roche farmacevtska družba d.o.o.
Donator:	Sanolabor, d.d.

ZBORNİK PRISPEVKOV

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 Strojjan
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, 200 izvodov

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

616-006-085(082)
615.849(082)



NOVOSTI na področju radioterapije in radiobiologije: od raziskav do klinike
simpozij (2021 ; online)

Novosti na področju radioterapije in radiobiologije: od raziskav do klinike:
zbornik prispevkov : E-znanstveni simpozij : 14. maj 2021 Ljubljana, Slovenija
/ organizator Onkološki inštitut Ljubljana (Ljubljana, Slovenija) in Združenje
za radioterapijo in onkologijo pri Slovenskem zdravniškem društvu (Ljubljana,
Slovenija) ; [urednice Tanja Marinko, Maja Čemažar, Simona Kranjc Brezar]. - 1.
izd. - Ljubljana : Onkološki inštitut: Združenje za radioterapijo in onkologijo pri
Slovenskem zdravniškem društvu, 2021

ISBN 978-961-7029-34-5 (Onkološki inštitut)
COBISS.SI-ID 62977027

ZBORNİK PRISPEVKOV

Novosti na področju radioterapije in radiobiologije: od raziskav do klinike

E-znanstveni simpozij

14. maj 2021

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
Prispevki	11
Indeks avtorjev	77
Sponsorji	78

PROGRAM

Petek, 14. maj 2021

8:00 - 8:30 **Prijava udeležencev**

8:30 - 8:35 **Pozdravni nagovor**

doc. dr. Tanja Marinko, dr. med. in prof. dr. Maja Čemažar, univ. dipl. biol.

8:35 - 9:00 **Zgodovina radiobiologije na Onkološkem inštitutu in razvojne usmeritve oddelka**

prof. dr. Gregor Serša, univ. dipl. biol.

Bazično aplikativne raziskave

Moderator: prof. dr. Maja Čemažar, univ. dipl. biol.

9:00 - 9:15 **Vaskularni učinki obsevanja**

znan. sod. dr. Boštjan Markelc, univ. dipl. biol.

9:15 - 9:30 **Aktivacija citosolnih senzorjev DNA po obsevanju**

znan. sod. dr. Tanja Jesenko, univ. dipl. biokem.

9:30 - 9:45 **Učinek HPV na senzorje DNA v celičnih linijah ploščatoceličnega karcinoma žrela**

asist. Kristina Levpušček, dr. med.

9:45 - 10:15 **Odmor**

Translacijski pristopi

Moderator: prof. dr. Gregor Serša, univ. dipl. biol.

10:15 - 10:40 **Translacijski pristopi kombinacije obsevanja z gensko terapijo ali elektrokemoterapijo**

prof. dr. Maja Čemažar, univ. dipl. biol.

PROGRAM

Petek, 14. maj 2021

- 10:40 - 10:55** **Obsevanje HPV pozitivnih tumorjev v kombinaciji s cisplatinom in elektrokemoterapija radiorezistentnih tumorjev**
viš. znan. sod. dr. Simona Kranjc Brezar, univ. dipl. biol.
- 10:55 - 11:10** **Kombinacija genske terapije s kemokini in obsevanja**
asist. Tim Božič, mag. biokem.
- 11:10 - 11:25** **Priprava in testiranje tumorske vakcine z obsevanjem**
asist. Tinkara Remic, mag. rad. biol.
- 11:25 - 12:00** **Odmor**

Klinične raziskave- 1.del

Moderator: doc. dr. Tanja Marinko, dr. med.

- 12:00 - 12:25** **Program ARRS P3-0307: rak glave in vratu – analiza bioloških značilnosti in poskus izboljšanja zdravljenja**
prof. dr. Primož Strojani, dr. med.
- 12:25 - 12:40** **Primerjava razlik med vrisovalci pri določanju tumorskega tarčnega volumna pri raku požiralnika na MR, CT in PET CT**
asist. mag. Ajra Šečerov Ermenc, dr. med.
- 12:40 - 12:55** **Minimalno invazivni diagnostični pristopi pri možganskih tumorjih z uporabo prosto cirkulirajočih nukleinskih kislin**
asist. dr. Marija Skoblar Vidmar, dr. med.
- 12:55 - 13:10** **Genetski markerji pri mezoteliomu**
asist. dr. Danijela Štrbac, dr. med.
- 13:10 - 13:30** **Odmor**

PROGRAM

Petek, 14. maj 2021

Klinične raziskave- 2.del

Moderator: prof. dr. Primož Strojan, dr. med.

- 13:30 - 13:45** **Molekularni označevalci odgovora na zdravljenje pri raku dojk**
doc. dr. Tanja Marinko, dr. med.
- 13:45 - 14:00** **Novosti v zdravljenju lokalno napredovalega raka danke v času
personalizirane medicine**
izr. prof. dr. Vaneja Velenik, dr. med.
- 14:00 - 14:15** **Pregled zdravljenja s hiperbarično oksigenacijo-dosedanje
izkušnje**
doc. dr. Helena Barbara Zobec Logar dr. med. in Ana Perpar, dr. med.
- 14:15 - 14:30** **Vloga radiomike v spremljanju učinkovitosti zdravljenja z
imunoterapijo pri bolnikih z rakom pljuč**
doc. dr. Martina Vrankar, dr. med.
- 14:30 - 14:45** **Zaključek srečanja**

SEZNAM PRISPEVKOV

1	Zgodovina radiobiologije na Onkološkem inštitutu in razvojne usmeritve oddelka <i>prof. dr. Gregor Serša, univ. dipl. biol.</i>	11
2	Vaskularni učinki obsevanja <i>znan. sod. dr. Boštjan Markelc, univ. dipl. biol.</i>	16
3	Aktivacija citosolnih senzorjev DNA po obsevanju <i>znan. sod. dr. Tanja Jesenko, univ. dipl. biokem.</i>	19
4	Učinek HPV na senzorje DNA v celičnih linijah ploščatoceličnega karcinoma žrela <i>asist. Kristina Levpušček, dr. med.</i>	22
5	Translacijski pristopi kombinacije obsevanja z gensko terapijo ali elektrokemoterapijo <i>prof. dr. Maja Čemažar, univ. dipl. biol.</i>	25
6	Obsevanje HPV pozitivnih tumorjev v kombinaciji s cisplatinom in elektrokemoterapija radiorezistentnih tumorjev <i>viš. znan. sod. dr. Simona Kranjc Brezar, univ. dipl. biol.</i>	29
7	Kombinacija genske terapije s kemokini in obsevanja <i>asist. Tim Božič, mag. biokem.</i>	33
8	Priprava in testiranje tumorske vakcine z obsevanjem <i>asist. Tinkara Remic, mag. rad. biol.</i>	36
9	Program ARRS P3-0307: rak glave in vratu – analiza bioloških značilnosti in poskus izboljšanja zdravljenja <i>prof. dr. Primož Strojjan, dr. med.</i>	39
10	Primerjava razlik med vrisovalci pri določanju tumorskega tarčnega volumna pri raku požiralnika na MR, CT in PET CT <i>asist. mag. Ajra Šečerov Ermenc, dr. med.</i>	44
11	Minimalno invazivni diagnostični pristopi pri možganskih tumorjih z uporabo prosto cirkulirajočih nukleinskih kislin <i>asist. dr. Marija Skoblar Vidmar, dr. med.</i>	48
12	Genetski markerji pri mezoteliomu <i>asist. dr. Danijela Štrbac, dr. med.</i>	52

SEZNAM PRISPEVKOV

- | | | |
|----|---|----|
| 13 | Molekularni označevalci odgovora na zdravljenje pri raku dojk
<i>doc. dr. Tanja Marinko, dr. med.</i> | 55 |
| 14 | Novosti v zdravljenju lokalno napredovalega raka danke v času
personalizirane medicine
<i>izr. prof. dr. Vaneja Velenik, dr. med.</i> | 58 |
| 15 | Pregled zdravljenja s hiperbarično oksigenacijo-dosedanje izkušnje
<i>doc. dr. Helena Barbara Zobec Logar dr. med. in Ana Perpar, dr. med.</i> | 63 |
| 16 | Vloga radiomike v spremljanju učinkovitosti zdravljenja z imunoterapijo pri
bolnikih z rakom pljuč
<i>doc. dr. Martina Vrankar, dr. med.</i> | 69 |
| 17 | Karakterizacija imunskega odziva mišjih tumorjev pri radioterapiji in
elektroprenosu plazmidne dna z zapisom za kemokine
<i>Lucija Kozjek Mencinger, dipl. inž. rad. teh.</i> | 73 |

ZGODOVINA RADIOBIOLOGIJE NA ONKOLOŠKEM INŠTITUTU LJUBLJANA IN RAZVOJNE USMERITVE ODDELKA ZA EKSPERIMENTALNO ONKOLOGIJO

Gregor Serša¹, Maja Čemažar¹ in Primož Strojčan²

¹ Oddelek za eksperimentalno onkologijo, Onkološki inštitut Ljubljana, Zaloška cesta 2, 1000 Ljubljana, Slovenija

² Oddelek za teleradioterapijo, Sektor za radioterapijo, Onkološki inštitut Ljubljana, Zaloška cesta 2, 1000 Ljubljana, Slovenija

Elektronski naslov: gserša@onko-i.si

Inštitut in začetki raziskovanja

Začetki raziskovanja raka v Sloveniji segajo v leto 1920. Takrat je vodstvo bolnice v Brežicah prevzel 35 letni Poljak dr. Josip Cholewa, kirurg z odlikovanjem Meistrovega bojevnika za severno mejo in si tam uredil Laboratorij za eksperimentalno kancerologijo. Svoje strokovne znanke v heidelberškem Samaritanerhausu obvesti o ustanovitvi prvega jugoslovanskega onkološkega eksperimentalnega laboratorija.

Nadalje se leta 1937 z odlokom Dravske banovine ustanovi »Banovinski inštitut za raziskovanje in zdravljenje novotvorb«. Njegov prvi predstojnik zavoda je bil takrat že doc. dr. Josip Cholewa. Verjetno je njegova strast po raziskovanju botrovala imenu zavoda, da je v njem poudarjeno tudi raziskovanje. Zavod odpre vrata v letu 1938: kot zapiše doc. Cholewa »1. julija odprem, pa magari s samo eno kahlico«.

Začetki delovanja zavoda segajo predvsem na področje obsevalnega zdravljenja bolnikov. Čeprav ni zapisov, lahko upravičeno domnevamo, da je bilo verjetno raziskovalno delo omejeno predvsem na področje radiobiologije.

Zanimivi so prvi zapiski o raziskovanju, neke vrste laboratorijski dnevnik, kot ga uporabljamo danes (Slika 1).

*Sredi julije 38 : Cholewa : 1. VIII. odprem, pa magari
z eno samo kahlico!*

*Junij : dr. Novak vrže (oz. varči; da se vrže) prvi belo podganso (ki je niti ni
pregledal), s spontanim tumorjem golčice. — J. doc. ne krega,*

*31. VII. 38 : J. Skubic poslal ključ v odprti blagajni v kateri je re 50.000 Pa d.
J. doc. ne krega.*

*1. VIII. 38 : Otvoritev. Mikroskop Sprejme se 4 bolnike. Takoj se prične z aplikacija Ra.
Veliko močnejše. Opolje včasoma ne pozna tega pota. J. doc. prvi: danes pa
še ne smem kregati.*

Slika 1. Zapiski doc. Josipa Cholewa o laboratorijskih živalih in tumorjih.

Zametki Okološkega inštituta so bili vizionarski. Kot je kasneje zapisal prof. Stojan Plesničar, eden izmed njegovih direktorjev: »Prvo načelo je bilo multidisciplinarnost v zdravljenju rakavih bolezni. Ponovno spomnimo, da je pisalo leto 1938. Takrat je ta komaj ustanovljeni Onkološki zavod obsegal kirurgijo, ginekologijo, radioterapijo, patologijo in raziskave«. Prav dosledno upoštevanje in poudarjanje načela interdisciplinarnosti je skozi zgodovino Onkološkemu inštitutu zagotavljalo samostojnost in omogočalo njegovo rast in razvoj.

Razvoj radiobiologije na inštitutu

Radiobiološke raziskave so se kasneje institucionalizirale v Radiobiološkem laboratoriju, ki ga je vodil prof. Janez Škrk. Izobraževal se je v Birminghamu, v Angliji, kjer je pridobil tudi naziv M.Sc. Nekoliko kasneje je prof. Plesničar ustanovil Imunološki laboratorij, kjer se je izvajalo tudi nekaj radiobioloških raziskav.

Zgodovina se ponavlja. Imunoradioterapija je znana še iz 80. let preteklega stoletja. Takrat so bile zelo popularne raziskave kako z bakterijskimi pripravki potencirati odgovor tumorjev na ionizirajoče sevanje. Uporabljali so pripravke kot so Bacillus Calmette-Guerin (BCG) in *Cryptosporidium parvum* (1). Take raziskave sta izvajala prof. Stojan Plesničar in prof. Zvonimir Rudolf. Kmalu za tem je sledilo obdobje rekombinantnih proteinov. Tako je prof. Gregor Serša odšel v ZDA v M.D. Anderson Hospital in pri prof. Luki Milasu izvedel raziskavo kombiniranega zdravljenja mišjih tumorjev s TNF- α in obsevanjem (2). Po vrnitvi v Slovenijo je iz te teme tudi doktoriral. S podobnimi raziskavami, vendar na kliničnem nivoju, se je ukvarjala prof. Berta Jereb, ki je kombinirala IFN- γ in obsevanje (3). Kasneje smo s tovrstnimi raziskavami nadaljevali, seveda z naprednejšo tehnologijo, vključno z genskim zdravljenjem, kjer vnašamo v celico zapise za različne citokine (4).

Radioterapevt prof. Marjan Budihna je bil eden pionirjev, ki je opisal in na originalen način izračunal koliko je potrebno dodati k celokupni dozi med frakcioniranim obsevanjem zaradi pospešene repopulacije preživelih tumorskih celic (5). Njegovo delo predstavlja izjemno pomemben doprinos k razvoju klinične radiobiologije. Raziskave dejavnika časa v radioterapiji je nadaljeval doc. Hotimir Lešničar (6). Prof. Budihna in doc. Lesničar sta se intenzivno ukvarjala tudi s hipertermijo, ki je v 80. in 90. letih predstavljala eno od pomembnejših torišč radiobioloških raziskav (7- 11).

Naslednje pomembno področje, ki je zaznamovalo razvoj radiobiologije in radioterapije je bilo raziskovanje bioloških markerjev odgovora na obsevanje in preživetja bolnikov. V tem kontekstu so pomembno vlogo odigrale klinične študije pri rakah glave in vratu, ki so preučevale napovedno vlogo različnih proteaz in njihovih inhibitorjev. To področje je zaznamovalo delo prof. Primoža Strojana (12- 16). Pomemben prispevek k implementaciji radiobioloških spoznanj v kliniko predstavljajo tudi prospektivne klinične raziskave kombinirane radiokemoterapije pri rakah glave in vratu, ki so bile izvedene v krogu tima za zdravljenje raka glave in vratu Onkološkega inštituta in ORL klinike Univerzitetnega kliničnega centra Ljubljana (prof. M. Budihna, L. Furlan, doc. H. Lešničar, prof. P. Strojjan, prof. L. Šmid, E. Šoba, prof. B. Zakotnik) (17- 24). Pri navajanju raziskovalcev so omenjeni le vodilni, priznanje za razvoj stroke pa gre tudi vsem njihovim sodelavcem.

Leta 2005 je bil ustanovljen Oddelek za eksperimentalno onkologijo. Tu je bil lociran

tudi terapevtski RTG aparat, ki je še vedno namenjen radiobiološkim raziskavam, tj. obsevanju celic *in vitro* ter miši in tumorjev *in vivo*. Del tega oddelka je tudi Radiobiološki laboratorij, ki nadaljuje tradicijo in delo nekdanjega Radiobiološkega laboratorija prof. Škrka.

Kaj so sedaj naša področja delovanja/sodelovanja?

Radiobiološke raziskave so del raziskovalnega programa financiranega s strani ARRS, P3-0003, ki se pretežno izvaja na Oddelku za eksperimentalno onkologijo. Nehote se tudi v primeru tega oddelka zgodovina ponavlja, saj nosi enako ime kot nekoč laboratorij doc. Cholewe. V njem je specifično radiobiologiji posvečen eden izmed delovnih sklopov. Temeljna področja našega delovanja so:

- a) radiosenzibilizacija z elektrokemoterapijo,
- b) radiosenzibilizacija z imunogeno terapijo,
- c) senzorji DNA in obsevanje,
- d) HPV infekcija in odgovor na terapijo.

Vse raziskave, ki se odvijajo znotraj teh področij, so bile zasnovane kot translacijske – nekatere so že v fazi izvedbe – skupaj s sodelavci radioterapevti, prof. Primožem Strojanom, asist. dr. Blažem Grošljem in asist. Gabrom Plavcem. Verjamemo, da je to šele začetek obetajočega sodelovanja, in do bomo po predstavitvi Vašega in našega dela prišli do novih idej in načrtov za sodelovanje.

Kaj nas zanima v prihodnosti?

Za izhodišče k razpravi o sodelovanju naj naštejemo nekaj področij delovanja, ki so za nas še posebej zanimiva:

- Dejavniki ki vplivajo na odgovor na ionizirajoče sevanje
- Aktivacija DNA senzorjev
- Vpliv HPV okužbe
- Tumorsko žilje in pretok krvi
- Imunski sistem
- Modifikacija tumorske strome za izboljšanje učinkovitosti ionizirajočega sevanja
- Modifikacija imunskega odgovora
- Anti-angiogene in antivaskularne terapije
- Modifikacija ostalih značilnosti tumorjev

Naj na koncu poudarimo, da imamo v okviru obstoječe organizacijske strukture in strokovnega ustroja Onkološkega inštituta enkratne možnosti za razvoj kakovostne translacijske radiobiologije. Med nami imamo sodelavce, ki so nabirali izkušnje v najbolj prestižnih centrih na svetu, kot so MD Anderson Hospital, ZDA; Peter MacCallum Cancer Centre, Australia; Gray Laboratory in v zadnjem času v Oxford Institute for Radiation Oncology, Velika Britanija. Imamo primerno opremljene raziskovalne laboratorije in dobre možnosti za izvajanje kliničnih raziskav. Kot vsako sodelovanje

tudi to zahteva kreativnost, predanost in vztrajnost, tako pri razvoju idej kot pri njihovi implementaciji v kliniko.

Literatura:

1. Plesničar S, Rudolf Z. Combined BCG and irradiation treatment of skin metastases originating from malignant melanoma. *Cancer* 1982; 50: 1100-06.
2. Sersa G, Willingham V, Milas L. Antitumor effects of tumor necrosis factor alone or combined with radiotherapy. *Int J Cancer* 1988; 42: 129-34.
3. Jereb B, Petrič J, Lamovec J, Škrbec M, Šoš E. Intratumor Application of Human Leukocyte Interferon- α in Patients with Malignant Brain Tumors 1989; 12(1): 1-7.
4. Čemažar M, Golzio M, Serša G, et al. Electrically-assisted nucleic acids delivery to tissues *in vivo*: Where do we stand? *Curr Pharm Design* 2006; 12: 3817-25.
5. Budihna M, Skrk J, Smid L, et al. Tumor cell repopulation in the rest interval of split-course radiation treatment. *Strahlentherapie* 1980;156(6): 402-8.
6. Lesnicar H, Smid L, Zakotnik B. Early glottic cancer: the influence of primary treatment on voice preservation. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 1996;36(5): 1025-32.
7. Lesnicar H. Clinical thermoradiotherapy: the influence of some prognostic parameters on recurrence-free survival. *Neoplasma* 1997; 44(1):19-24.
8. Budihna M, Lesnicar H, Handl-Zeller L, et al. Animal experiments with interstitial water hyperthermia. In: Handl-Zeller L (ed). *Interstitial Hyperthermia*. Springer: Wien New York, 1992; 711-4.
9. Lesnicar H, Budihna M, Handl-Zeller L, et al. Clinical experience with water-heated interstitial hyperthermia system. *Acta Chir Austriaca* 1992; 24: 214-6.
10. Schreier K, Budihna M, Lesnicar H, et al. Preliminary studies of interstitial hyperthermia using hot water. *Int J Hyperthermia* 1990; 6(2): 431-44.
11. Karner KB, Lesnicar H, Cemazar M, et al. Antitumour effectiveness of hyperthermia is potentiated by local application of electric pulses to LPB tumours in mice. *Anticancer Res* 2004; 24(4): 2343-8.
12. Strojjan P, Budihna M, Smid L, et al. Cathepsin D in tissue and serum of patients with squamous cell carcinoma of the head and neck. *Cancer Lett* 1998; 130(1-2): 49-56.
13. Strojjan P, Budihna M, Smid L, et al. Urokinase-type plasminogen activator (uPA) and plasminogen activator inhibitor type 1 (PAI-1) in tissue and serum of head and neck squamous cell carcinoma patients. *Eur J Cancer* 1998; 34(8): 1193-7.
14. Strojjan P, Budihna M, Smid L, et al. Prognostic significance of cysteine proteinases cathepsins B and L and their endogenous inhibitors stefins A and B in patients with squamous cell carcinoma of the head and neck. *Clin Cancer Res* 2000; 6(3): 1052-62.
15. Strojjan P, Oblak I, Svetic B, et al. *Br J Cancer*. 2004 ;90(10):1961-8. Cysteine proteinase inhibitor cystatin C in squamous cell carcinoma of the head and neck: relation to prognosis. *Br J Cancer* 2004; 90(10): 1961-8.

16. Strojan P, Anicin A, Svetic B, et al. Stefin a and stefin B: markers for prognosis in operable squamous cell carcinoma of the head and neck. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 2007; 68(5): 1335-41.
17. Smid L, Lesnicar H, Zakotnik B, et al. Radiotherapy, combined with simultaneous chemotherapy with mitomycin C and bleomycin for inoperable head and neck cancer-preliminary report. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 1995; 32(3): 769-75.
18. Zakotnik B, Smid L, Budihna M, et al. Concomitant radiotherapy with mitomycin C and bleomycin compared with radiotherapy alone in inoperable head and neck cancer: final report. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 1998; 41(5): 1121-7.
19. Smid L, Budihna M, Zakotnik B, et al. Postoperative concomitant irradiation and chemotherapy with mitomycin C and bleomycin for advanced head-and-neck carcinoma. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 2003; 56(4): 1055-62.
20. Budihna M, Soba E, Smid L, et al. Inoperable oropharyngeal carcinoma treated with concomitant irradiation, mitomycin C and bleomycin - long term results. *Neoplasma* 2005; 52(2): 165-74.
21. Zakotnik B, Budihna M, Smid L, et al. Patterns of failure in patients with locally advanced head and neck cancer treated postoperatively with irradiation or concomitant irradiation with mitomycin C and bleomycin. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 2007; 67(3): 685-90.
22. Strojan P, Karner K, Smid L, et al. Concomitant chemoradiotherapy with mitomycin C and cisplatin in advanced unresectable carcinoma of the head and neck: phase I-II clinical study. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 2008; 72(2): 365-72.
23. Strojan P, Grašič Kuhar C, Žumer B, et al. TPF induction chemotherapy and concomitant irradiation with cisplatin and cetuximab in unresectable squamous cell carcinoma of the head and neck. *Head Neck* 2014; 36(11): 1555-61.
24. Strojan P, Zakotnik B, Žumer B, et al. Skin reaction to cetuximab as a criterion for treatment selection in head and neck cancer. *Anticancer Res* 2018; 38(7): 4213-20.

VASKULARNI UČINKI OBSEVANJA

Boštjan Markelc

Oddelek za eksperimentalno onkologijo, Onkološki inštitut Ljubljana, Zaloška cesta 2, 1000 Ljubljana, Slovenija

Zdravstvena fakulteta, Univerza v Ljubljani, Zdravstvena pot 5, 1000 Ljubljana, Slovenija

Elektronski naslov: bmarkelc@onko-i.si

Izvleček

Pri radioterapiji je poleg tumorskih celic obsevano tudi tumorsko žilje. Spremembe v tumorskem žilju po obsevanju lahko delujejo tako tako pro- kot tudi proti-tumorsko. Oksigenacija tumorjev pa korelira z odzivom tumorja na radioterapijo.

Ključne besede: tumorsko žilje, endotelijske celice, oksigenacija tumorjev, angiogeneza

Pri radioterapiji so poleg tumorskih celic obsevane tudi tumorske stromalne celice, vključno z endotelijskimi celicami. Učinki sevanja na tumorske celice so dobro znani, kakšni pa so učinki sevanja na tumorsko žilje pa trenutno še vedno ni popolnoma raziskano. Pri dozah sevanja, ki so višje od posameznih doz uporabljenih pri rutinskem frakcioniranem zdravljenju raka z radioterapijo, tumorske endotelijske celice umrejo preko različnih poti celične smrti (1). Dandanes pa se višje doze sevanja čedalje pogosteje uporabljajo pri stereotaktičnem obsevanju telesa (SBRT). Kakšen pa je nato dejanski vpliv smrti tumorskih endotelijskih celic na strukturo in funkcijo tumorskega žilja pa še ni znano. Ravno tako ni znano, če te spremembe, ter koliko, vplivajo na odziv tumorja na radioterapijo.

Na splošno ima tumorsko žilje dvojno vlogo pri radioterapiji. Za vzdrževanje krvnega pretoka je nujno stabilno tumorsko žilje, ki skrbi za (re) oksigenacijo tumorskih celic in s tem njihovo radiosenzibilizacijo med celotnim potekom zdravljenja. Po drugi strani pa funkcionalno tumorsko žilje ter preživele endotelijske celice niso zaželeni po obsevanju. Njihova prisotnost bi namreč lahko podprla preživetje in rast preostalih tumorskih celic, ki so preživele obsevanje, ter s tem recidiv tumorja po radioterapiji (2). Kljub intenzivnim raziskavam oksigenacije tumorjev med obsevanjem je le malo znanega o dinamiki žilnih sprememb in tudi mehanizmih neovaskularizacije. Boljše razumevanje, kako obsevanje spreminja tumorsko žilje, bi lahko pomembno doprineslo k oblikovanju terapevtskega režima radioterapije. Odziv tumorjev in tumorskih žil na obsevanje je zelo časovno in dozno odvisno. Tudi znotraj iste vrste tumorja in na različnih predelih istega tumorja je odziv lahko raznolik glede na obseg odziva in njegov časovni potek (3). Pri mišjih tumorjih posamezni odmerki obsevanja povzročijo precejšen, a prehodni vazodilacijski vrh ter izboljšanje krvnega pretoka, ki doseže vrh približno 24 ur po obsevanju, vendar se ta časovni potek lahko razlikuje glede na vrsto tumorja. Ali je tak potek tudi po vsakem odmerku frakcioniranega obsevanja še ni jasno. V nasprotju s tem pa klinične raziskave poudarjajo pomembnost dolgotrajne reoksidacije in povečanja krvnega pretoka po obsevanju. Medtem ko je bila ponovna oksigenacija na mišjih modelih opažena v nekaj urah in do 48 ur po obsevanju, so klinične raziskave potekale v znatno kasnejših časovnih točkah po obsevanju (4, 5). Ugotovljeno je bilo, da ima lahko del tumorjev v času radioterapije prehodno izboljšanje krvnega pretoka. Po drugi strani pa pri

nekaterih tumorjih ni bilo opažene nobene spremembe v krvnem pretoku tudi po več tednov tekom radioterapije, tako pri raku materničnega vratu kot pri raku glave in vratu (6, 7). Znano pa je, da izboljššan krvni pretok, ter s tem izboljššana oksigenacija tumorja, korelira z boljšim odzivom tumorja na radioterapijo.

Na nivoju tumorskih endotelijskih celic ter tumorskih žil ravno tako trenutno še ni popolnoma jasen obseg umiranja endotelijskih po obsevanju. Večina raziskav je sicer potrdila umiranje endotelijskih celic po obsevanju, ki pa rezultira le v manjših spremembah v strukturi ter funkciji tumorskega žilja (2). Poleg tega je po obsevanju verjetno tudi zmanjšana proliferacija endotelijskih celic ter s tem tudi angiogeneza. Torej bi bile lahko opažene spremembe v zmanjšanju gostote tumorskih žil v prvih dneh po obsevanju le rezultat upočasnjene nastajanja novih tumorskih žil in ne dejanskega uničenja že obstoječih (2). Ne glede na smrt tumorskih endotelijskih celic večina tumorskih žil ostane funkcionalnih ter pretočnih, s tem pa omogočajo tudi rekrutacijo ter vstop različnih celic imunskega sistema, ki imajo lahko tako pro- kot proti-tumorski učinek. Rekrutirani makrofagi lahko na primer postanejo vir pro-angiogenih faktorjev, ter s tem pospešijo ponovno rast tumorskega žilja, kar lahko vodi v recidiv tumorja po terapiji (8). Po drugi strani, pa lahko preko funkcionalnega tumorskega žilja v tumor dostopajo tudi celice pridobljenega imunskega sistema, kar je še posebej pomembno pri kombinaciji radioterapije z zaviralci kontrolnih točk imunskega sistema. V nekaterih raziskavah pa so tudi pokazali, da popolnega odgovor tumorja po radioterapiji ni možno doseči le z indirektnim umiranjem tumorskih celic zaradi uničenja tumorskega žilja (1).

Vloga tumorskega žilja pri odgovoru na tumorja na radioterapijo je torej pomembna, vendar lahko spremembe v tumorskem žilju po obsevanju delujejo tako tako pro- kot tudi proti-tumorsko. Jasno je, da uničenje tumorskega žilja ni zadostno za doseg popolnega odgovora tumorja na radioterapijo, vendar pa lahko preko različnih mehanizmov tumorsko žilje doprinese pomemben delež k samemu odgovoru tumorja na radioterapijo.

Zahvala

Vse raziskave so potekale v okviru raziskovalnega programa P3-003 in projektov J3-2529, J3-8202, ki jih financira Agencija za raziskovalno dejavnost Republike Slovenije (ARRS), v okviru projekta FP7, 625631 (Marie Curie IEF) ter projektov C5255/A18085 in C5255/A15935 (Cancer Research UK).

Literatura

1. Castle KD, Kirsch DG. Establishing the Impact of Vascular Damage on Tumor Response to High-Dose Radiation Therapy. *Cancer Res* 2019; 79(22): 5685-92.
2. Kozin S V, Duda DG, Munn LL, et al. Neovascularization after irradiation: what is the source of newly formed vessels in recurring tumors? *J Natl Cancer Inst* 2012; 104(12): 899-905.
3. Hu F, Vishwanath K, Salama JK, et al. Oxygen and Perfusion kinetics in response to fractionated radiation therapy in fadu head and neck cancer xenografts are related to treatment outcome. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 2016; 96(2):462-9.
4. Moeller BJ, Cao Y, Li CY, et al. Radiation activates HIF-1 to regulate vascular radiosensitivity in tumors: role of reoxygenation, free radicals, and stress granules.

Cancer Cell 2004; 5(5): 429-41.

5. Song C, Hong BJ, Bok S, et al. Real-time tumor oxygenation changes after single high-dose radiation therapy in orthotopic and subcutaneous lung cancer in mice: clinical implication for stereotactic ablative radiation therapy schedule optimization. *Int J Radiat Oncol Biol Phys.* 2016;95(3):1022-31.
6. Shibuya K, Tsushima Y, Horisoko E, et al. Blood flow change quantification in cervical cancer before and during radiation therapy using perfusion CT. *J Radiat Res* 2011; 52(6): 804-11.
7. Lock S, Perrin R, Seidlitz A, et al. Residual tumour hypoxia in head-and-neck cancer patients undergoing primary radiochemotherapy, final results of a prospective trial on repeat FMISO-PET imaging. *Radiother Oncol* 2017; 124(3): 533-40.
8. Brown JM. Radiation damage to tumor vasculature initiates a program that promotes tumor recurrences. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 2020; 108(3): 734-44.



AKTIVACIJA CITOSOLNIH SENZORJEV DNA PO OBSEVANJU

Tanja Jesenko^{1,2}, Maša Bošnjak¹, Boštjan Markelc^{1,3}, Gregor Serša^{1,3}, Katarina Žnidar¹, Loree C. Heller⁴, Maja Čemažar^{1,5}

¹ Oddelek za eksperimentalno onkologijo, Onkološki inštitut Ljubljana, Zaloška cesta 2, 1000 Ljubljana, Slovenija

² Medicinska fakulteta, Univerza v Ljubljani, Vrazov trg 2, 1000 Ljubljana, Slovenija

³ Zdravstvena fakulteta, Univerza v Ljubljani, Zdravstvena pot 5, 1000 Ljubljana, Slovenija

⁴ Department of Medical Engineering, University of South Florida, Tampa, 33620 Florida, ZDA

⁵ Fakulteta za vede o zdravju, Univerza na Primorskem, Polje 42, 6310 Izola, Slovenija

Elektronski naslov: tjesenko@onko-i.si

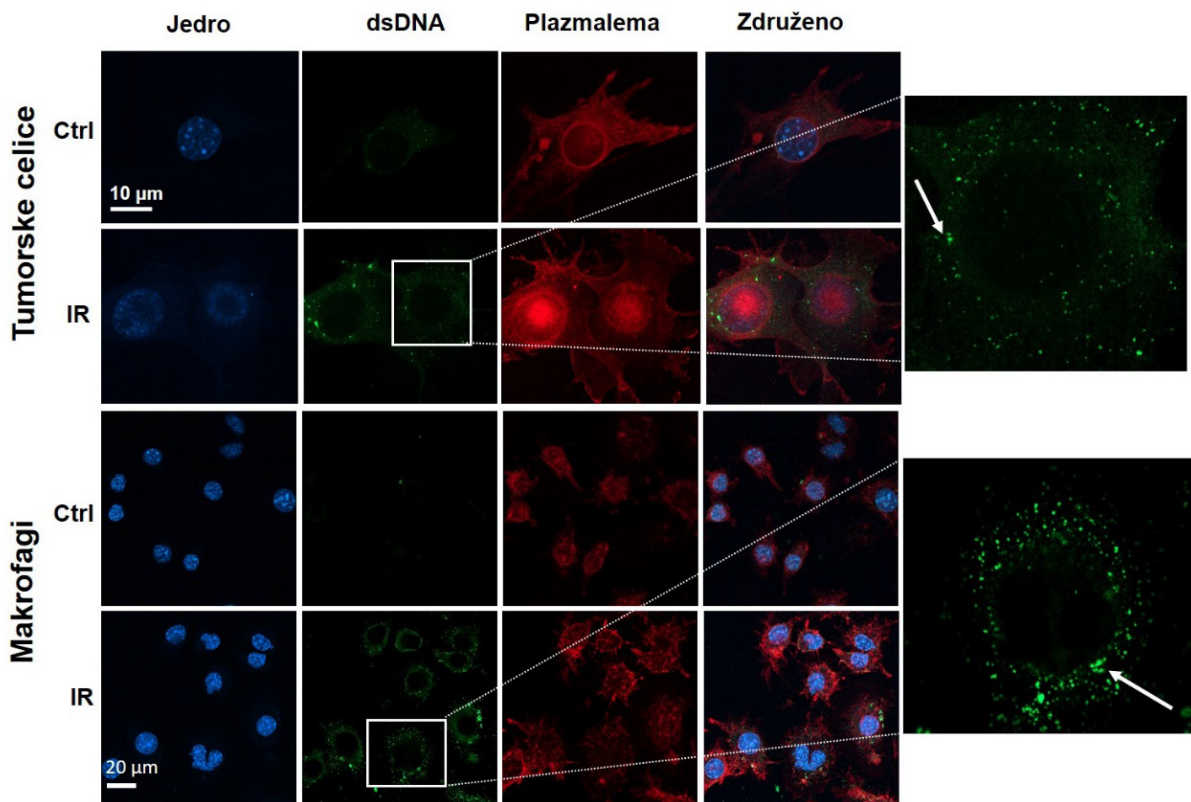
Izvleček

Obsevanje tumorjev ima poleg neposrednega citotoksičnega učinka na celice tudi posredne imunološke učinke. Eden izmed mehanizmov spodbujanja imunskega odziva z ionizirajočim sevanjem pa je aktivacija molekularnih poti zaznavanja DNA, ki v osnovi predstavlja mehanizem obrambe celic proti patogenom. V naši predklinični študiji na celičnih kulturah tumorskih celic in makrofagov smo dokazali, da obe vrsti celic v svojem citosolu nakopičijo DNA v obliki dvoverižne DNA in mikro jeder. Kopičenje DNA je aktiviralo več različnih poti zaznavanja DNA, pri čemer so bili najbolj vidno aktivirani senzori DNA DDX60, DAI in P204 v tumorskih celicah ter DDX60, DAI, P204 in RIG-I v makrofagih. Povišanje izražanje senzorjev DNA je spremljalo povečano izražanje citokinov, TNF α in IFN β v tumorskih celicah in IL1 β in IFN β v makrofagih. Ti rezultati dajejo vpogled v mehanizme, ki sodelujejo pri aktivaciji imunskega odziva na ionizirajoče sevanje v tumorju.

Ključne besede: senzori DNA, ionizirajoče sevanje, imunski odziv, tumorske celice, makrofagi

Obsevanje tumorjev ima poleg neposrednega citotoksičnega učinka na celice tudi posredne imunološke učinke. Poškodbe v celicah povzročijo sprostitve signalov nevarnosti in izražanje vnetnih citokinov, kar lahko spodbudi imunski sistem in vodi v boljšo protitumorsko učinkovitost. V nekaterih primerih lahko to ob kombinaciji z zaviralci imunskih kontrolnih točk vodi tudi v izventarčni učinek na oddaljene lezije (abskopalni učinek). Imunski mehanizmi ionizirajočega sevanja niso popolnoma znani. Ena izmed signalnih poti, ki so jo prvo povezali s spodbujanjem abskopalnega učinka je signalna pot ciklični GMP-AMP sintaza–stimulator genov za interferone (cGAS–STING), ki predstavlja signalno pot odziva na prisotnost nukleinskih kislin v citosolu (1). Nukleinske kisline v citosolu naravno niso prisotne, zato njihova prisotnost običajno za celico pomeni okužbo s patogeni. Z namenom obrambe celic pred okužbo, prisotnost nukleinskih kislin v citosolu prepoznajo različni proteini, senzori DNA. Med senzorje DNA štejemo različne vrste proteinov med njimi nukleaze, helikaze, encime in različne DNA-vezavne proteine (2). Vezava nukleinskih kislin na senzore DNA sproži različne signalne poti, ki vodijo v nastajanje različnih citokinov. V naši študiji smo raziskovali aktivacijo različnih poti senzorjev DNA in citokinov v melanomskih celicah B16F10 in makrofagih RAW 264.7. Oba celična tipa se v velikem deležu nahajata v tumorskem mikrookolju in zato lahko znatno doprineseta k samemu imunskemu odzivu v tumorju. V naši študiji smo dokazali, da tumorske celice in makrofagi po obsevanju

nakopičijo DNA v svojem citosolu 24 in 48 h po obsevanju s 6 Gy. Nakopičena DNA je v obliki dvovertižne DNA in v obliki mikrojedder (slika 1). Večji učinek smo opazili v primeru makrofagov.



Slika 1. Kopičenje dvovertižne DNA (dsDNA) v citosolu celic po obsevanju s 6 Gy. Dvovertižno DNA smo določili z imunofluorescenčnim barvanjem s protitelesi proti dsDNA. Pozitiven pikčasti signal prikazuje bela puščica.

Kopičenje DNA v citosolu je aktiviralo več različnih poti zaznavanja DNA, pri čemer so bili najbolj vidno aktivirani sensorji DNA DExD/H-Box helikaza 60 (DDX60), od DNA odvisen aktivator regulacijskih faktorjev za interferone (DAI) in proteinski aktivator interferona 204 (p204) v tumorskih celicah ter DDX60, DAI, p204 in z retinojsko kislino inducirani gen I (RIG-I) v makrofagih. Višje izražanje sensorjev DNA smo zaznali v makrofagih. Z imunofluorescenčnim barvanjem in spremljanjem translokacije v celicah smo dokazali, da se aktivira tudi pot cGAS-STING. S spremljanjem translokacij različnih transkripcijskih faktorjev smo določili tudi prenos signala iz citoplazme v jedro, kar vodi v prepisovanje genov in posledičnega nastajanja različnih citokinov. Aktivirane signalne poti zaznavanja DNA so vodile v nastajanje različnih citokinov, tumorskega nekrotizirajočega faktorja alfa ($TNF\alpha$) in interferona beta ($IFN\beta$) v tumorskih celicah in interleukina 1 beta ($IL1\beta$) in $IFN\beta$ v makrofagih. Stopnja izražanja sensorjev DNA in citokinov je naraščala z dozo obsevanja in časom po obsevanju ter je bila višja v primeru makrofagov.

Ti rezultati dajejo vpogled v mehanizme, ki sodelujejo pri stimulaciji protitumorske imunosti z ionizirajočim sevanjem. V *in vitro* pogojih smo razjasnili mehanizme in določili signalne poti, ki so vpletene v spodbujanje imunskega sistema z ionizirajočim

sevanjem. Ugotovili smo, da je nabor aktiviranih poti zaznavanja DNA odvisen od vrste celic, stopnja izražanja pa je odvisna od doze obsevanja in časa po obsevanju. Z našo *in vitro* bazično radiobiološko študijo smo tako dokazali, da imajo lahko različne vrste celic v tumorju različen nabor imunološko pomembnih sprememb kot odziv na obsevanje, ki je odvisen od kombinacije aktiviranih senzorjev DNA. Za bolj natančno razumevanje pa so v prihodnosti potrebne nadaljnje *in vivo* študije, s katerimi bi lahko še bolj natančno opredelili doprinos različnih vrst celic na celokupen imunski odziv v tumorju.

Zahvala

Vse raziskave so potekale v okviru raziskovalnega programa P3-003 in projekta Z3-8204, ki ju financira Agencija za raziskovalno dejavnost Republike Slovenije (ARRS).

Literatura

1. Vanpouille-Box C, Alard A, Aryankalayil MJ, et al. DNA exonuclease Trex1 regulates radiotherapy-induced tumour immunogenicity. *Nat Commun* 2017; 8: 15618.
2. Vanpouille-Box C, Demaria S, Formenti SC, et al. Cytosolic DNA sensing in organismal tumor control. *Cancer Cell. Cell Press* 2018; 34: 361-78.

UČINEK HPV NA SENZORJE DNA V CELIČNIH LINIJAH PLOŠČATOCELIČNEGA KARCINOMA ŽRELA

Kristina Levpušček^{1,2}, Tanja Jesenko^{1,2}, Gregor Serša^{1,3}, Maja Čemažar^{1,4}, Primož Strojani^{2,5}

¹ Oddelek za eksperimentalno onkologijo, Onkološki inštitut Ljubljana, Zaloška cesta 2, 1000 Ljubljana, Slovenija

² Medicinska fakulteta, Univerza v Ljubljani, Vrazov trg 2, 1000 Ljubljana, Slovenija

³ Zdravstvena fakulteta, Univerza v Ljubljani, Zdravstvena pot 5, 1000 Ljubljana, Slovenija

⁴ Fakulteta za vede o zdravju, Univerza na Primorskem, Polje 42, 6310 Izola, Slovenija

⁵ Oddelek za teleradioterapijo, Sektor radioterapije, Onkološki inštitut Ljubljana, Zaloška cesta 2, 1000 Ljubljana, Slovenija

Elektronski naslov: klevpuscek@onko-i.si

Izvleček

Ploščatocelični karcinom orofarinksa (PKO), povzročen s humanim virusom papiloma 16 (HPV16), se bolje odziva na ionizirajoče sevanje kot s HPV16 nepovezani ploščatocelični karcinomi drugih delov žrela (PKŽ). Onkoproteina HPV16 E6 in E7 zavirata delovanje nekaterih citosolnih senzorjev DNA, katerih aktivacija vodi v prepisovanje citokinov in posledično aktivacijo imunskega sistema. Namen študije je bil raziskati vpliv ionizirajočega sevanja na aktivacijo molekularnih poti zaznavanja DNA pri PKŽ z različnim statusom HPV16. Z metodo qRT-PCR smo določili izražanje senzorjev DNA in citokinov štirih humanih celičnih linij PKŽ po obsevanju. Preliminarni rezultati so pokazali, da je izražanje citosolnih senzorjev DNA in citokinov časovno ter dozno odvisno. Opazili smo tudi razlike v izražanju glede na status HPV16. Nadaljnje *in vivo* študije so potrebne za ovrednotenje povezave med aktivacijo molekularnih poti zaznavanja in imunskim odzivom s HPV16 povezanim PKO po obsevanju.

Ključne besede: Humani virus papiloma, ploščatocelični karcinom žrela, senzorji DNA, obsevanje.

Uvod

Raki glave in vratu so heterogena skupina malignih bolezni, kamor spada tudi ploščatocelični karcinom žrela. Slednje razvrščamo po mestu vznika na tumorje nazofarinksa, orofarinksa (PKO) in hipofarinksa (PKH). Eden izmed dejavnikov tveganja za nastanek PKO je okužba s humanim virusom papiloma (HPV16), ki z onkoproteinoma E6 in E7 vpliva na regulacijo celičnega cikla, kar lahko privede do maligne transformacije okuženih celic (1, 2). Raziskave so pokazale, da je s HPV16 povezan PKO biološka in klinična entiteta, ki se od preostalih tumorjev žrela razlikuje predvsem v občutljivosti na ionizirajoče sevanje (3). Slednje namreč povzroča sproščanje DNA v citosol tumorskih celic, kar privede do aktivacije citosolnih senzorjev DNA, receptorjev za prepoznavo molekularnih vzorcev (4). Aktivirana molekularna pot sproži prepisovanje vnetnih citokinov, predvsem interferonov tipa I (IFN I), ki v nadaljevanju sprožijo imunski odziv. Predklinične študije so pokazale, da se HPV16 izogne imunskemu sistemu tudi preko zaviranja nekaterih citosolnih senzorjev DNA, predvsem z retinojsko kislino inducirane gena I (RIG-I) in ciklično gvanozin monofosfat-adenozin monofosfat sintazo (cGAS) (5, 6). V nasprotju s pričakovanji ima s HPV16

povezan PKO burnejši imunski odziv na ionizirajoče sevanje kot s HPV nepovezani PKŽ, navkljub zavrtju molekularnih poti zaznavanja DNA (7). Namen študije je bil raziskati aktivacijo poti zaznavanja DNA kot odziv na obsevanje v s HPV16 povezanimi in s HPV16 nepovezanimi celičnimi linijami PKŽ.

Materiali in metode

Pri raziskavi smo uporabili štiri humane celične linije PKŽ, natančneje dve celični liniji PKO (UM-SCC-6 in UPCI: SCC090) in dve celični liniji PKH (FaDu in 2A3). Status HPV16 smo določili na *in vitro* ravni z izražanjem onkoproteinov HPV16 E6 in E7. Radiosenzitivnost celic smo določili s testom viabilnosti PrestoBlue po štirih celičnih delitvah, saj nekatere izbrane celične linije ne tvorijo kolonij. Za določanje izražanja senzorjev DNA in citokinov smo celične linije obsevali z različnimi enkratnimi odmerki (0, 4 in 8 Gy). Po 24 in 48 urah smo izolirali mRNA in jo kasneje prepisali v cDNA. Z metodo qRT-PCR smo določili časovni potek izražanja senzorjev DNA (cGAS, STING, RIG-I, DAI, IFI16, DDX60) ter citokinov (IFN γ , TNF α , IL1 β).

Rezultati

Opazili smo značilno razliko v radiosenzitivnosti med s HPV16 povezano in s HPV16 nepovezano celično linijo PKO. Povečano izražanje senzorjev DNA in citokinov po obsevanju je bilo časovno in dozno odvisno. Izražanje senzorjev DNA DAI in RIG-I po obsevanju je bilo statistično povečano samo v s HPV16 nepovezanimi celičnimi linijami PKŽ. Izražanje citokinov IFN γ in IL1 β je bilo prav tako statistično povečano le v s HPV16 nepovezanimi celičnimi linijami PKŽ. Izražanje senzorjev DNA in citokinov je bilo večje pri s HPV16 povezano celično linijo 2A3 v primerjavi s HPV16 povezano celično linijo UPCI: SCC090. Pri slednji smo zaznali višjo raven izražanja mRNA onkoproteinov E6 in E7.

Razprava

Klinične smernice priporočajo zdravljenje bolnikov s PKŽ s frakcioniranim obsevanjem z nizkimi dnevnimi dozami (1,8-2 Gy) do skupne doze 66-70 Gy, z ali brez sočasne kemoterapije, ne glede na status HPV16. Namen naše študije je bil raziskati aktivacijo poti zaznavanja DNA kot odziv na obsevanje v povezavi s HPV16 okužbo. Rezultati na celičnih kulturah so pokazali, da se senzorji DNA in citokini po obsevanju povišano izražajo le v s HPV16 nepovezanimi celičnimi linijami PKŽ, medtem ko v s HPV16 povezanima celičnima linijama PKŽ ostajajo zavrti. Na izražanje pomembno vpliva tudi doza in čas, ki preteče po obsevanju. Razumevanje časa aktivacije teh poti, bi lahko izboljšalo sheme zdravljenja z radioterapijo. Potrebne so nadaljnje *in vivo* študije za ovrednotenje povezave med signalnimi potmi zaznavanja DNA in imunskim odzivom PKŽ z različnim statusom HPV16 po obsevanju.

Zahvala

Zahvaljujem se svojim sodelavcem Oddelka za eksperimentalno onkologijo za njihovo pomoč, ter finančni podpori Javne agencije za raziskovalno dejavnost Republike Slovenije (P3-0003, P3-0307 ter Program usposabljanja mladih raziskovalcev).

Literatura

1. Kobayashi K, Hisamatsu K, Suzui N, et al. A Review of HPV-Related Head and Neck Cancer. *J Clin Med* 2018; 7(9): 241.
2. Faraji F, Zaidi M, Fakhry C, et al. Molecular mechanisms of human papillomavirus-related carcinogenesis in head and neck cancer. *Microb Infect* 2017; 19(9-10): 464-75.
3. Mirghani H, Amen F, Tao Y, et al. Increased radiosensitivity of HPV-positive head and neck cancers: Molecular basis and therapeutic perspectives. *Cancer Treat Rev* 2015; 41(10): 844-52.
4. Vanpouille-Box C, Alard A, Aryankalayil MJ, et al. DNA exonuclease Trex1 regulates radiotherapy-induced tumour immunogenicity. *Nat Commun* 2017; 8(1): 15618.
5. Shaikh MH, Bortnik V, McMillan NA, et al. cGAS-STING responses are dampened in high-risk HPV type 16 positive head and neck squamous cell carcinoma cells. *Microb Pathog* 2019; 132: 162-5.
6. Chiang C, Pauli E-K, Biryukov J, et al. The human papillomavirus E6 oncoprotein targets USP15 and TRIM25 to suppress RIG-I-mediated innate immune signaling. *J Virol* 2017; 92 (6).
7. Wondergem NE, Nauta IH, Muijlwijk T, et al. The immune microenvironment in head and neck squamous cell carcinoma: on subsets and subsites. *Curr Oncol Rep* 2020; 22(8): 1-14.



TRANSLACIJSKI PRISTOPI KOMBINACIJE OBSEVANJA Z GENSKO TERAPIJO ALI ELEKTROKEMOTERAPIJO

Maja Čemažar

Oddelek za eksperimentalno onkologijo, Onkološki inštitut Ljubljana, Zaloška cesta 2, 1000 Ljubljana, Slovenija

Fakulteta za vede o zdravju, Univerza na Primorskem, Polje 42, 6310 Izola, Slovenija

Elektronski naslov: mcmazar@onko-i.si

Izvleček

Zdravljenje tumorjev s kombinacijo obsevanja in elektrokemoterapijo ali genskim elektroprenosom različnih plazmidov, ki nosijo zapis za antiangiogene molekule ali interlevkin 12 je uspešen pristop zdravljenja, ki ima potencial za translacijo v klinične študije.

Ključne besede: tumorski modeli, obsevanje, elektrokemoterapija, bleomicin, cisplatin, interlevkin-12, endoglin

Uvod

Radioterapija je eden od temeljnih terapevtskih načinov zdravljenja raka. Celice po obsevanju umirajo zaradi poškodb DNA, tako tumorske kot normalne celice. Povečano umiranje tumorskih celic po obsevanju lahko dosežemo z radiosenzibilizacijo tumorskih celic, kar pomeni, da povečamo njihovo občutljivost na obsevanje. Radiosenzibilizacijo tumorskih celic lahko dosežemo z dopolnilnim zdravljenjem z različnimi kemoterapevtiki ali pa imunomodulatornimi in antiangiogenimi pristopi.

Radiosenzibilizacija z elektrokemoterapijo s cisplatinom in bleomicinom

Elektrokemoterapija je lokalna terapija za zdravljenje tumorjev, kjer z uporabo električnih pulzov, ki jih dovedemo na tumor, povečamo učinkovitost protitumorskih kemoterapevtikov bleomicina in cisplatina. Z aplikacijo električnih pulzov na tumor povzročimo elektroporacijo celičnih membran, kar vodi v njihovo povečano permeabilnost in s tem je omogočen vstop povečane količine kemoterapevtika v celice in posledično njihovo večje protitumorsko delovanje.

V naših začetnih raziskavah smo preučili kako povečan vnos cisplatina z elektroporacijo vpliva na učinek obsevanja na modelu raka dojke na miših. Tumorje smo obsevali 20 minut po elektrokemoterapiji z intravensko aplikacijo cisplatina in dosegli 92 % popolnih odgovorov tumorjev, kar za 65 % več kot po samem obsevanju (1). Podoben radiosenzibilirajoč učinek elektrokemoterapije smo dosegli tudi na drugih tumorskih celicah in modelih (2, 3). Na modelu fibrosarkoma, smo določili faktor povečanja doze (ang. dose enhancement factor), ki je bil 1,6, kar pomeni, da je bila doza obsevanja pri kombinirani terapiji $1,6 \times$ nižja kot pri samem obsevanju za enak terapevtski učinek (3). Še boljši radiosenzibilirajoči učinek kot elektrokemoterapija s cisplatinom je imela elektrokemoterapija z bleomicinom, kjer smo na istem tumorskem modelu fibrosarkoma ugotovili, da faktor povečanja kar 1,9; doza obsevanja, kjer kontroliramo 50 % tumorjev (TCD_{50} doza) je bila pri kombinirani terapiji 12,4 Gy, pri samem

obsevanju pa 23,1 Gy (4).

Radiosenzibilizacija z elektrokemoterapijo z bleomicinom je bila signifikantna tudi pri drugih tumorskih modelih in pri različnih režimih obsevanja (enkratnim in frakcioniranim) (5). Izvedljivost in učinkovitost tovrstne terapije pa smo opisali tudi na kliničnem primeru kožnih metastaz adenokarcinoma (6).

Radiosenzibilizacija z genskim elektroprenosom

Poleg kemoterapevtikov lahko protitumorsko učinkovitost radioterapije povečamo tudi z delovanjem na ne-tumorske celice v tumorskem mikrookolju. V naših raziskavah smo se osredotočali na proučevanje radiosenzibilizacije z delovanjem na tumorsko žilje in na prirojen in pridobljen imunski odziv. Pri obeh načinih modulacije tumorskega mikrookolja smo uporabili kot dostavni sistem za terapevtske molekule plazmidno DNA, ki smo jo vnesli v celice s pomočjo elektroporacije. Za spodbujanje imunskega odziva smo uporabili genski elektroprenos plazmidne DNA z zapisom za interlevkin 12 (IL-12) (7). Testirali smo dva pristopa kombinacije z obsevanjem, sistemski, kjer smo genski elektroprenos izvedli v mišico in s tem dosegli sistemsko izločanje IL-12 in lokalni, intratumorski. Kombinacija genskega elektroprenosa IL-12 v mišico in obsevanja je bila izjemno učinkovita terapija. Na modelu podkožnih tumorjev smo dosegli 100 % popolnih odgovorov v primeru fibrosarkoma LPB in 50 % popolnih odgovorov v primeru fibrosarkoma SA-1. Na modelu pljučnih metastaz fibrosarkoma SA-1 smo s predhodno stimulacijo imunskega sistema preprečili rast pljučnih metastaz; na že obstoječih metastazah, pa smo dosegli faktor povečanja doze 1,3, kar pomeni, da je bila za enak učinek potrebna 1,3 nižja doza sevanja kadar smo izvedli še genski elektroprenos IL-12 (8). Še boljši protitumorski učinek pa smo dosegli pri kombinaciji lokalnega genskega elektroprenosa IL-12 in obsevanja. Na tumorskem modelu SA-1 je bil faktor povečanja doze 2,1, ob enaki toksičnosti terapije, ki smo jo merili preko sprememb na koži v obsevalnem polju (9). Še bolj tarčno terapijo pa lahko pri genskem elektroprenosu dobimo tako, da spreminjamo dele plazmida, ki nosi zapis za terapevtski protein. V primeru IL-12 smo testirali promotor gena za p21, za katerega je znano, da se aktivira v prisotnosti poškodbe celice ali pa v, za celico, neugodnih pogojih (10). Uporaba evkariontskega promotorja ima tudi prednost pred prokariotskimi ali virusnimi, saj se le-ti v evkariontskih celicah epigenetsko utišajo (11).

Drugo področje raziskav zajema preučevanje terapij, ki ciljajo tumorsko žilje in obsevanja. Kot tarčno molekulo smo si izbrali endoglin, ki se povečano izraža v tumorskih endotelih celicah ter, kadar je inhibirana signalna pot preko vaskularnega endotelijskega faktorja. Za utišanje izražanja endoglina smo pripravili plazmidne DNA molekule z zapisom za shRNA molekule proti endoglinu, ter uporabili promotor endotelina-1, ki je specifičen za endotelijske celice. Na tumorskem modelu karcinoma dojke v miših TS/A smo dokazali dober radiosenzibilizirajoč učinek, ki se je histološko kazal v zmanjšanem številu krvnih žil in proliferirajočih celic v tumorju, ter povečano nekrozo, apoptozo in hipoksijo (12). Učinek na tumorsko žilje smo dokazali tudi na modelu dorzalnega okna, kjer smo dokazali dobro korelacijo med površine žil in tumorsko perfuzijo, ki smo jo merili z lasersko Dopplersko pretočno metrijo (13). Na pomembnost imunskega mikrookolja in imuno fenotipa posameznega tumorskega modela pri testiranju novih terapij, smo pokazali v študiji, kjer smo z enakih plazmidom, kot smo ga uporabili pri tumorskem

modelu TS/A, testirali uspešnost na modelu melanoma B16F10, ki velja v primerjavi s tumorskim modelom TS/A za bolj imunogenega. V kombinaciji z obsevanjem, se je namreč pri tem tumorskem modelu izkazalo, da je za protitumorski učinek dovolj prisotnost plazmidne DNA v tumorskih celicah, ki sproži kaskado imunskega odziva preko citosolnih DNA senzorjev, saj smo že z genskim elektroprenosom plazmidne DNA brez zapisa za terapevtsko molekulo dosegli enak protitumorski učinek (14).

Zaključek

Kljub velikemu tehnološkemu napredku na področju obsevalnih tehnik, se še vedno iščejo radiobiološki pristopi, kako izboljšati protitumorsko učinkovitost radioterapije ob enaki stopnji poškodb normalnih tkiv. Tako elektrokemoterapija, kot genski elektroprenos plazmidne DNA z zapisom IL-12 in shRNA proti endoglinu so se izkazale kot uspešne terapije in primerne za translacijo v klinične študije.

Zahvala

Vse raziskave so potekale v okviru raziskovalnega programa P3-003, ki ga financira Agencija za raziskovalno dejavnost Republike Slovenije (ARRS).

Literatura

1. Serša G, Kranjc S, Čemažar M. Improvement of combined modality therapy with cisplatin and radiation using electroporation of tumors. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 2000; 46: 1037-41.
2. Kranjc S, Čemažar M, Grošel A, et al. Effect of electroporation on radiosensitization with cisplatin in two cell lines with different chemo- and radiosensitivity. *Radiol Oncol* 2003; 37(2): 101-7.
3. Kranjc S, Čemažar M, Grošel A, et al. Electroporation of LPB sarcoma cells *in vitro* and tumors *in vivo* increases radiosensitizing effect of cisplatin. *Anticancer Res* 2003; 23: 275-282.
4. Kranjc S, Cemazar M, Grosel A, et al. Radiosensitising effect of electrochemotherapy with bleomycin in LPB sarcoma cells and tumors in mice. *BMC Cancer* 2005; 5:115.
5. Kranjc S, Tevz G, Kamensek U, et al. Radiosensitizing effect of electrochemotherapy in a fractionated radiation regime in radiosensitive murine sarcoma and radioresistant adenocarcinoma tumor model. *Radiat Res* 2009; 172: 677-85.
6. Serša G, Čemažar M, Rudolf Z, et al. Adenocarcinoma skin metastases treated by electrochemotherapy with cisplatin combined with radiation. *Radiol Oncol* 1999; 33: 291-6.
7. Cemazar M, Jarm T, Sersa G. Cancer electrogene therapy with interleukin-12. *Current Gene Therapy* 2010; 10: 300-11.
8. Tevz G, Kranjc S, Cemazar M, et al. Controlled systemic release of IL-12 after gene electrotransfer to muscle for cancer gene therapy alone or in combination with ionizing radiation in murine sarcomas. *J Gene Med* 2009; 11: 1125-37.
9. Sedlar A, Kranjc S, Dolinšek T, et al. Radiosensitizing effect of intratumoral

- interleukin-12 gene electrotransfer in murine sarcoma. *BMC Cancer* 2013, 13(38): 1-20.
10. Kamensek U, Sersa G, Cemazar M. Evaluation of p21 promoter for interleukin 12 radiation induced transcriptional targeting in a mouse tumor model. *Mol Cancer* 2013; 12(1): 136.
 11. Kamenšek U, Serša G, Vidic S, et al. Irradiation, cisplatin, and 5-azacytidine upregulate cytomegalovirus promoter in tumors and muscles : implementation of non-invasive fluorescence imaging. *Mol Imaging Biol* 2011; 13(1): 43-52.
 12. Stimac M, Kamensek U, Cemazar M, et al. Tumor radiosensitization by gene therapy against endoglin. *Cancer Gene Ther* 2016; 23(7): 214-20.
 13. Savarin M, Prevc A, Rzek 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. Savarin M, Kamenšek U, Čemažar M, et al. Electrotransfer of plasmid DNA radiosensitizes B16F10 tumors through activation of immune response. *Radiol Oncol* 2017; 51: 30-9.



OBSEVANJE HPV POZITIVNIH TUMORJEV V KOMBINACIJI S CISPLATINOM IN ELEKTROKEMOTERAPIJA RADIOREZISTENTNIH TUMORJEV

Simona Kranjc Brezar^{1,2}, Ajda Prevc¹, Martina Nikšič Žakelj¹, Gregor Serša¹, Primož Strojan³

¹ Oddelek za eksperimentalno onkologijo, Onkološki inštitut Ljubljana, Zaloška cesta 2, 1000 Ljubljana, Slovenija

² Medicinska fakulteta, Univerza v Ljubljani, Vrazov trg 2, 1000 Ljubljana, Slovenija

³ Oddelek za teleradioterapijo, Sektor radioterapije, Onkološki inštitut Ljubljana, Zaloška cesta 2, 1000 Ljubljana, Slovenija

Elektronski naslov: skranjc@onko-i.si

Izvleček

V raziskavah smo okarakterizirali vpliv okužbe HPV na ploščatocelični karcinom ustnega žrela na radioobčutljivost in sočasno zdravljenje s cisplatinom, določili smo občutljivost radiorezistentnih tumorjev na zdravljenje z elektrokemoterapijo in raziskali molekularne mehanizme vpletene v odziv HPV-pozitivnih in HPV-negativnih tumorjev na navedena zdravljenja.

Ključne besede: Humani virus papiloma, ploščatocelični karcinom žrela, radioterapija, frakcionirano obsevanje, elektrokemoterapija, cisplatin, bleomicin

Uvod

Ploščatocelični karcinom velja za najpogostejši histološki tip raka glave in vratu. Poleg kajenja in prekomerne uporabe alkohola, pa v zadnjih letih okužba s humanim virusom papiloma (HPV) predstavlja enega od najpomembnejših vzrokov za nastanek ploščatoceličnega karcinoma ustnega žrela (1, 2). HPV-pozitivni ploščatocelični karcinomi ustnega žrela (HPV-pozitivni) bolje odgovorijo na sočasno radiokemoterapijo na osnovi platine od HPV-negativnih tumorjev, kar odpira možnosti za znižanje intenzivnosti zdravljenja pri teh bolnikih (1). Cilj je ohraniti delež ozdravitev, ki je dosežen s konvencionalnimi dozami obsevanja (frakcionirano obsevanje, skupna doza obsevanja 70 Gy) in sistemske kemoterapije, hkrati pa zmanjšati neželene stranske učinke zdravljenja. Dosedanje predklinične raziskave so pokazale, da so boljši rezultati zdravljenja HPV-pozitivnih tumorjev posledica večje občutljivosti le teh na radioterapijo in nekatere sistemske kemoterapevtike (cisplatin), ki se uporabljajo v kliniki (3, 4). Po drugi strani pa molekularni mehanizmi in stopnja povečanja občutljivosti HPV-pozitivnih celic še niso povsem raziskani. Namen raziskave je bil določiti za koliko lahko znižamo dozo obsevanja pri HPV-pozitivnem mišjem tumorskem modelu (2A3) (glede na standardno dozo), ne da bi s tem zmanjšali učinek (delež ozdravitev) zdravljenja. Prav tako je bil namen raziskati ali je povečana radioobčutljivost HPV-pozitivnih tumorjev posledica razlik v učinkovitosti popravljalnih mehanizmov poškodb DNA. V raziskavi smo primerjali tudi radioobčutljivost tumorjev 2A3 in FaDu, ki so bili sočasno zdravljeni s cisplatinom in s frakcioniranim obsevanjem ali obsevani le z eno samo, izoeffektivno dozo.

Učinkovitost radiokemoterapije je mogoče izboljšati z uporabo lokalnih ablativnih metod, kot je elektrokemoterapija (5-8). Elektrokemoterapija je učinkovit način zdravljenja pri različnih vrstah tumorjev, ki z elektroporacijo poveča vnos kemoterapevtikov (bleomicina ali cisplatina) v celice (9). Učinkovitost elektrokemoterapije je odvisna od pravilnosti izvedbe terapije in lastnosti samih tumorjev. V kliničnih raziskavah so opazili slabši odgovor tumorjev, ki so bili predhodno že zdravljeni s sistemsko kemoterapijo in/ali radioterapijo, najverjetneje zaradi pridobljene intrinzične odpornosti tumorskih celic na kemoterapevtike ali obsevanje (10-12). Ker je malo znanega kako mehanizmi pridobljene intrinzične kemo- in radiorezistence vplivajo na učinkovitost elektrokemoterapije, je bil drugi namen naše raziskave ovrednotiti odziv eksperimentalno induciranih radiorezistentnih celic ploščatoceličnega karcinoma ustnega žrela (FaDu-RR) in njihovih tumorskih ksenograftov.

Metode

Na humanih celičnih linijah (HPV-pozitivne (2A3), HPV-negativne (FaDu in njena radiorezistentna podlinija FaDu-RR, vzpostavljena s frakcioniranim obsevanjem) smo *in vitro* s testom klonogenosti določili stopnjo njihove občutljivosti: na obsevanje, terapijo s cisplatinom, kombinacijo obeh; na terapijo z bleomicinom ali elektrokemoterapijo z bleomicinom ali cisplatinom. Po terapiji smo določali delež in časovno dinamiko popravila poškodb DNA s kometnim testom in tvorbo žarišč fosforiliranih histonov γ H2AX na DNA. Dodatno smo pri FaDu in FaDu-RR celicah z metodo PCR spremljali razlike v izražanju genov za popravilo poškodb DNA po terapiji. S pretočno citometrijo smo določili spremembe poteka celičnega cikla po terapiji. Z masno spektrometrijo z induktivno sklopljeno plazmo smo primerjali privzem bleomicina in cisplatina po kemo- in elektrokemoterapiji pri FaDu in FaDu-RR celicah. Spremljali smo posredovane učinke sevanja, morfologijo celic po obsevanju in sočasni terapiji s cisplatinom ter ovrednotili delež apoptotičnih in mitotičnih celic po obsevanju HPV-pozitivnih in HPV-negativnih celic. Učinek sočasnega obsevanja in terapije s cisplatinom smo določali tudi pri sferoidih izbranih celičnih linij. Iste humane tumorske celične linije, kot v poskusih *in vitro*, smo uporabili za indukcijo podkožnih ksenograftov na imunsko oslABLjenih miših (SCID). S testom zaostanka v rasti tumorjev smo preverili odziv vseh treh tumorskih modelov na obsevanje in sočasno terapijo s cisplatinom ali elektrokemoterapijo. Določili smo tudi faktor modificiranja doze obsevanja ob sočasni terapiji s cisplatinom pri HPV-pozitivnih tumorjih za doseg enakega učinka zdravljenja kot pri HPV-negativnih tumorjih s standardnimi dozami.

Rezultati

HPV-pozitivne celice oziroma tumorji so bolj radioobčutljivi kot HPV-negativne celice in tumorji. *In vitro* sta bili celični liniji 2A3 in FaDu enako občutljivi na monoterapijo s cisplatinom, ob sočasni terapiji obsevanja in cisplatina je prišlo do potenciacije učinka obsevanja pri obeh tumorskih celičnih linijah (aditivni učinek, pri 2A3 za faktor 1,2 in pri FaDu za faktor 1,3). *In vivo* je bila učinkovitost dodanega cisplatina večja pri HPV-negativnih tumorjih, vendar je bil skupni učinek še vedno večji pri HPV-pozitivnih tumorjih. Faktor modificiranja doze, izračunan s primerjavo učinkovitosti obsevanja oziroma sočasne terapije obsevanja in cisplatina glede na HPV status tumorja, je znašal 1,3 oziroma 1,2, kar pomeni, da so HPV-pozitivni tumorji za 30 % bolje odgovorili na

radioterapijo ter za 20 % bolje na kombinirano terapijo kot HPV-negativni tumorji. Nadalje, zdravljenje obeh tumorskih modelov s cisplatinom in frakcioniranim režimom obsevanja je povzročilo radiosenzibilizacijo tumorjev: rast tumorja je bila 3- do 4-krat počasnejša kot po obsevanju z eno samo dozo. Sinergistični učinek radiosenzibilizacije je bil po zdravljenju HPV-pozitivnih tumorjev s cisplatinom in frakcioniranim obsevanjem veliko večji kot pri HPV-negativnih tumorjih. Natančneje, po kombiniranem zdravljenju je bilo preživetje miši (100 dni po zdravljenju, kar ustreza 5 letom pri ljudeh) s HPV-pozitivnimi tumorji za 26 % boljše kot pri miših s HPV-negativnimi tumorji. Pri raziskovanju molekularnih/celičnih mehanizmov smo ugotovili, da imajo HPV-pozitivne celice po samem obsevanju in po kombinirani terapiji večji delež dvoverižnih prelomov DNA; tudi popravilo nastalih poškodb je bilo v tej skupini počasnejše. Kombinirana terapija je pri HPV-pozitivnih celicah povzročila njihovo zaustavitev v fazi G_2/M celičnega cikla; delež apoptotičnih celic je bil večji in mitotičnih celic manjši, kot pri HPV-negativnih celicah. Posredovane učinke sevanja smo opazili le pri HPV-pozitivnih celicah po kombinirani terapiji.

Da bi razjasnili vpliv različnih mehanizmov intrinzične kemo- in radiorezistence tumorjev, izvane s predhodnim obsevanjem, ki bi lahko vplivali na učinkovitost elektrokemoterapije, smo primerjali dve izogeni humani celični liniji z različno občutljivostjo na obsevanje, FaDu in FaDu-RR. Ugotovili smo da ima radiorezistentna celična linija FaDu-RR inducirane obrambne mehanizme, ki so poleg pridobljene radiorezistence vodili tudi do navzkrižne rezistence na cisplatin, ne pa tudi na bleomicin. Radiorezistentne celice FaDu-RR so poleg zmanjšane intracelularnega kopičenja cisplatina (v primerjavi s starševsko celično linijo FaDu) učinkoviteje popravljale določene tipe poškodb DNA ter imele spremenjen spekter izražanja genov za popravilo poškodb DNA. Radiorezistentni tumorji FaDu-RR (0 % popolnih odgovorov) so bili bolj odporni na zdravljenje s frakcioniranim obsevanjem in cisplatinom ter na elektrokemoterapijo s cisplatinom v primerjavi s tumorji FaDu (do 33 % popolnih odgovorov). Elektrokemoterapija z bleomicinom pa je bila pri obeh celičnih linijah oziroma tumorskih modelih (40 % ozdravljenih tumorjev) enako učinkovita.

Zaključki

HPV-pozitivni tumorski model (2A3) je bolj občutljiv na obsevanje z eno dozo kot HPV-negativni model FaDu. Sočasna terapija s cisplatinom deluje aditivno, ne glede na status HPV. Rezultati kažejo na možnost 20 % znižanje doze obsevanja pri kombinirani terapiji s cisplatinom pri HPV-pozitivnih tumorjih, pri čemer bi dosegli enako učinkovitost, kot jo dosežemo s standardno dozo pri radiokemoterapiji HPV-negativnih tumorjev. Kombinirano zdravljenje s frakcioniranim režimom obsevanja in cisplatinom deluje sinergistično pri HPV-pozitivnem in HPV-negativnem tumorskem modelu, vendar je ta učinek večji pri HPV-pozitivnih tumorjih. Povečana občutljivost HPV-pozitivnih tumorjev na zdravljenje je med drugim posledica višje ravni poškodb DNA, nižje stopnje popravila teh poškodb, zaustavitve celičnega cikla v fazi G_2/M in večjega deleža apoptoze.

Frakcionirano obsevanje HPV-negativnih tumorskih celic (FaDu-RR) vodi v radiorezistenco in kemorezistenco na cisplatin preko različnih mehanizmov (boljše in hitrejše popravilo poškodb DNA, spremembe v izražanju genov, spremembe v regulaciji celičnega cikla, slabši privzem cisplatina). Zato so bili FaDu-RR tumorji v primerjavi

s FaDu tumorji bolj odporni tudi na elektrokemoterapijo s cisplatinom, vendar enako občutljivi na elektrokemoterapijo z bleomicinom. Zaradi navzkrižne rezistence FaDu-RR celic na cisplatin, je za zdravljenje radiorezistentnih in ponovno izraslih tumorjev po predhodni radioterapiji priporočena uporaba elektrokemoterapije z bleomicinom.

Zahvala

Vse raziskave so potekale v okviru raziskovalnih programov P3-003, P3-0307 in projekta J3-7460, ki jih financira Agencija za raziskovalno dejavnost Republike Slovenije (ARRS).

Literatura

1. Marur S, D'Souza G, Westra WH, et al. HPV-associated head and neck cancer: a virus-related cancer epidemic. *Lancet Oncol* 2010; 11(8): 781-9.
2. Johnson DE, Burtness B, Leemans CR, et al. Head and neck squamous cell carcinoma. *Nat Rev Dis Prim* 2020; 6(92): 1-22.
3. Ang KK, Harris J, Wheeler R, et al. Human papillomavirus and survival of patients with oropharyngeal cancer. *N Engl J Med* 2010; 363(1): 24-35.
4. Kimple RJ, Smith MA, Blitzer GC, et al. Enhanced radiation sensitivity in HPV-positive head and neck cancer. *Cancer Res* 2013; 73(15): 4791-800.
5. Kranjc S, Cemazar M, Grosel A, et al. Radiosensitising effect of electrochemotherapy with bleomycin in LPB sarcoma cells and tumors in mice. *BMC Cancer* 2005; 5: 115.
6. Kranjc S, Cemazar M, Grosel A, et al. Electroporation of LPB sarcoma cells *in vitro* and tumors *in vivo* increases the radiosensitizing effect of cisplatin. *Anticancer Res* 2003; 23(1 A): 275-81.
7. Kranjc S, Tevz G, Kamensek U, et al. Radiosensitizing effect of electrochemotherapy in a fractionated radiation regimen in radiosensitive murine sarcoma and radioresistant adenocarcinoma tumor model. *Radiat Res* 2009; 172: 677-85.
8. Serša G, Kranjc S, Čemažar M. Improvement of combined modality therapy with cisplatin and radiation using electroporation of tumors. *Int J Radiat Oncol Biol Phys.* 2000; 46(4): 1037-41.
9. Gehl J, Sersa G, Matthiessen LW, et al. Updated standard operating procedures for electrochemotherapy of cutaneous tumours and skin metastases. *Acta Oncol* 2018; 57(7): 874-82.
10. Campana LG, Mali B, Sersa G, et al. Electrochemotherapy in non-melanoma head and neck cancers: a retrospective analysis of the treated cases. *Br J Oral Maxillofac Surg* 2014; 52(10): 957-64.
11. Plaschke CC, Bertino G, McCaul JA, et al. European Research on Electrochemotherapy in Head and Neck Cancer (EURECA) project: Results from the treatment of mucosal cancers. *Eur J Cancer* 2017; 87: 172-81.
12. Bertino G, Sersa G, De Terlizzi F, et al. European Research on Electrochemotherapy in Head and Neck Cancer (EURECA) project: Results of the treatment of skin cancer. *Eur J Cancer* 2016; 63: 41-52.

GENSKI ELEKTROPRENOS VNETNIH KEMOKINOV CCL5 IN CCL17 V MIŠJE TUMORJE VPLIVA NA IZRAŽANJE CITOKINOV IN VODI DO POPOLNIH ODGOVOROV V KOMBINACIJI Z OBSEVANJEM

Tim Božič^{1,2}, Simona Kranjc Brezar^{1,2}, Gregor Serša^{1,3}, Maja Čemažar^{1,4}, Boštjan Markelc^{1,3}

¹ Oddelek za eksperimentalno onkologijo, Onkološki inštitut Ljubljana, Zaloška cesta 2, 1000 Ljubljana, Slovenija

² Medicinska fakulteta, Univerza v Ljubljani, Vrazov trg 2, 1000 Ljubljana, Slovenija

³ Zdravstvena fakulteta, Univerza v Ljubljani, Zdravstvena pot 5, 1000 Ljubljana, Slovenija

⁴ Fakulteta za vede o zdravju, Univerza na Primorskem, Polje 42, 6310 Izola, Slovenija

Email: tbozic@onko-i.si

Izveček

Raziskava kemokinov CCL5 in CCL17 po GET v mišja tumorska modela raka dojke, 4T1 in E0771, in debelega črevesa, CT26 in MC38, je pokazala, da terapija poveča izražanje vnetnih citokinov in, v kombinaciji z obsevanjem, vodi do popolnih odgovorov.

Ključne besede: Genski elektroprenos, CCL5, CCL17, mišji tumorji, izražanje citokinov

Uvod

Učinek imunoterapij korelira s stopnjo in tipom infiltracije imunskih celic v tumorsko tkivo, zato imunoterapije, ki vplivajo na infiltracijo specifičnih imunskih celic v tumorje dobivajo vedno več pozornosti (1). Eden izmed potencialnih pristopov v imunoterapiji raka je tako genska terapija, ki z namenom povečanja infiltracije efektorskih imunskih celic v tumorsko mikrookolje izkorišča kemokine. Kemokini so majhni signalni proteini (~10 kDa) iz družine citokinov, njihova glavna funkcija pa je uravnavanje migracije različnih celic, vključno imunskih celic, vzdolž kemokinskega gradienta (2). Izmed vnetnih kemokinov, ki lahko sprožijo imunski odziv sta kemokina CCL5 in CCL17 v literaturi povezana s povečano infiltracijo citotoksičnih (CD8+) T limfocitov v tumorsko tkivo (3, 4). Povečana infiltracija imunskih celic v tumor pa sama po sebi ne vodi vedno v aktivacijo imunskega odziva in posledično protitumorskega učinka (5). Genska terapija s kemokinoma je zato lahko učinkovita le v kombinaciji s terapijo, ki aktivira imunski odziv. Ena izmed terapij pri kateri zaradi njenega delovanja pride do sproščanja vnetnih citokinov in drugih signalnih molekul, ki vodijo v aktivacijo imunskih celic je radioterapija. Poleg tega se radioterapija v kombinaciji z imunoterapijami inhibitorjev kontrolnih točk zaradi potencialnih sinergističnih učinkov že uporablja v klinični praksi (6). Kombinacija genskega elektroprenosa (GET) plazmidne DNA z zapisom za kemokina CCL5 in CCL17 in radioterapije bi torej lahko privabila imunske celice v tumorje, kjer bi se potem aktivirale zaradi delovanja radioterapije. Na tak način bi lahko aktivirali imunski sistem, ter s tem povečali protitumorsko učinkovitost v primerjavi s samostojnima terapijama.

Materiali in metode

V *in vitro* delu raziskave smo z uporabo reagenta Lipofectamine 2000 (TF) transfecirali dve mišji celični liniji raka dojke 4T1 in E0771, ter dve mišji celični liniji raka debelega črevesja, CT26 in MC38 s komercialno dostopnimi plazmidi pUNO1 (kontrolni plazmid (pDNA Ctrl) in plazmida z zapisom za CCL5 in CCL17). Po 48 h smo določili viabilnost celic s testom PrestoBlue, izražanje 11 vnetnih citokinov pa z metodo kvantitativni PCR v realnem času (qRT-PCR). V *in vivo* poskusih smo se osredotočili na tumorska modela 4T1 in CT26, ki se razlikujeta v imunskem statusu, oba pa rasteta na mišjem singenskem sevu Balb/c. Ko so tumorji presegle volumen 50 mm³ smo izvedli terapijo z intratumorskim injiciranjem 25 ali 50 µg plazmidne DNA, po 5 min pa je sledil genski elektroprenos (GET), pri katerem smo tumorjem z uporabo 6 mm ploščatih elektrod aplicirali električne pulze. V primeru kombinirane terapije smo tumorje po GET obsevali z enkratno (10 Gy) ali frakcionirano dozo (3 × 5 Gy). Miši smo evtanizirali, ko je volumen tumorjev dosegel 500 mm³. Rast tumorjev smo trikrat tedensko merili s kljunastim merilom (Caliper), izražanje 9 vnetnih citokinov tretji in sedmi dan po terapiji pa smo določili z metodo qRT-PCR. Vse raziskave so potekale v skladu z navodili in dovoljenjem Ministrstva za kmetijstvo, gozdarstvo in prehrano Republike Slovenije (št. dovoljenja: U34401-1/2015/43).

Rezultati

Viabilnost vseh celičnih linij je bila po 48 h od lipofekcije nad 80 %. Analiza izražanja genov 11 citokinov 48 h po lipofekciji celic je pokazala značilno višje izražanje kemokinov CCL5, CCL17 ter s tem uspešno transfekcijo, hkrati pa tudi povišano raven izražanja IL-6 in CXCL10. Genska terapija z GET po intratumorskim injiciranjem plazmidne DNA z zapisom za CCL5 ali CCL17 v tumorje CT26 in 4T1 je privedla do majhnega zaostanka v rasti tumorjev. Analiza 7 citokinov v tumorjih tretji in sedmi dan po GET je pokazala povečano izražanje obeh kemokinov, ter v tumorjih CT26 tudi povišano raven izražanja vnetnih citokinov IL-6, IL-12, CXCL9 in IFN γ . Spremenjeno izražanje citokinov *in vitro* in *in vivo* je tako značilno za vnetje. Genska terapija kemokinov CCL5 in CCL17 v kombinaciji z enkratnim in frakcioniranim obsevanjem na mišjih tumorjih CT26 vodi v značilno višji zaostanek v rasti tumorjev in v nekaterih primerih celo do popolnih odgovorov. Kombinirana terapija ni imela značilnega vpliva na rast tumorjev 4T1, poleg tega pa pri zdravljenju ni prišlo do popolnih odgovorov. Glede na rezultate sprememb v tumorskem mikrookolju kot posledica terapije bodo nadaljnji poskusi usmerjeni k določevanju mehanizmov imunskega odziva in optimalnega časovnega okna v primeru kombinacije obsevanja in GET plazmidne DNA z zapisom za kemokina CCL5 in CCL17.

Razprava

Raziskava je pokazala, da z lipofekcijo dosežemo visoko izražanje kemokinov CCL5 in CCL17 v vseh štirih celičnih linijah ter spremenjeno izražanje vnetnih citokinov. Enake spremembe so bile opažene tudi po lipofekciji s kontrolnim plazmidom, kar nakazuje, da so spremembe v izražanju posledica vnosa tuje DNA v citoplazmo. Rezultati *in vivo* dela študije kažejo, da lahko z uporabo standardnega pulznega protokola, ki se uporablja v kliniki pri elektrokemoterapiji, dosežemo visoko izražanje vnesenih transgenov

(CCL5 in CCL17), pri tem pa tudi CXCL9 in IFN γ , dveh ključnih aktivatorjev imunskega odziva. Kljub temu GET kemokinov CCL5 in CCL17 vodi do popolnih odgovorov le v kombinaciji z obsevanjem v primeru tumorskega modela CT26.

Zahvala

Raziskava je bila izvedena v okviru Agencije za raziskovalno dejavnost Republike Slovenije (ARRS) in raziskovalnih programov J3-8202 in P3-0003. Sredstva so bila financirana s strani Republike Slovenije in Evropskega sklada za regionalni razvoj v okviru projekta SmartGene.Si.

Literatura

1. Bruni D, Angell HK, Galon J. The immune contexture and immunoscore in cancer prognosis and therapeutic efficacy. *Nat Rev Cancer* 2020; 20(11): 662-680.
2. Chen K, Bao Z, Tang P, et al. Chemokines in homeostasis and diseases. *Cell Mol Immunol* 2018; 15(4): 324-34.
3. Dangaj D, Bruand M, Grimm AJ, et al. Cooperation between constitutive and inducible chemokines enables T cell engraftment and immune attack in solid tumors. *Cancer Cell* 2019; 35(6): 885-900.e10.
4. Semmling V, Lukacs-Kornek V, Thaiss CA, et al. Alternative cross-priming through CCL17-CCR4-mediated attraction of CTLs toward NKT cell-licensed DCs. *Nat Immunol* 2010; 11(4): 313-20.
5. Anandappa AJ, Wu CJ, Ott PA. Directing Traffic: How to effectively drive T cells into tumors. *Cancer Discov* 2020; 10(2): 185-97.
6. Thangamathesvaran L, Shah R, Verma R, et al. Immune checkpoint inhibitors and radiotherapy-concept and review of current literature. *Ann Transl Med* 2018; 6(8): 155.



PRIPRAVA IN TESTIRANJE TUMORSKE VAKCINE Z OBSEVANJEM

Tinkara Remic^{1,2}, Gregor Serša^{1,3}, Maja Čemažar^{1,4}, Katja Uršič^{1,5}, Kristina Levpušček^{1,2},
Urška Kamensček^{1,5}

¹ Oddelek za eksperimentalno onkologijo, Onkološki inštitut Ljubljana, Zaloška cesta 2, 1000 Ljubljana, Slovenija

² Medicinska fakulteta, Univerza v Ljubljani, Vrazov trg 2, Ljubljana, SI-1000 Ljubljana, Slovenija

³ Zdravstvena fakulteta, Univerza v Ljubljani, Zdravstvena pot 5, 1000 Ljubljana, Slovenija

⁴ Fakulteta za zdravstvene vede, Univerza na Primorskem, Polje 42, 6310 Izola, Slovenija

⁵ Biotehniška fakulteta, Univerza v Ljubljani, Jamnikarjeva ulica 101, 1000 Ljubljana, Slovenija

Elektronski naslov: tremic@onko-i.si

Izvleček

Namen raziskave je bil pripraviti in testirati novo tumorsko vakcino, pripravljeno iz z obsevanjem ubitih tumorskih celic, z adjuvantnim genskim elektroprenosom IL-12. Učinkovitost vakcine smo testirali v kombinaciji z radioterapijo. Raziskave smo izvedli na dveh imunološko različnih tumorskih modelih B16-F10 in CT26, na singenih miši C57Bl/6 in Balb/c. Za oba tumorska modela smo uspešno pripravili učinkovito tumorsko vakcino. S terapevtsko vakcinacijo v kombinaciji z obsevanjem smo dosegli značilen doprinos vakcine k protitumorskemu učinku obsevanja na B16-F10 (sinergizem). S preventivno vakcinacijo smo preprečili izrast do 56 % CT26 tumorjev. Z izbranim optimalnim obsevalnim (5×5 Gy) in vakcinacijskim ($1 \times$ za B16-F10 ter $3 \times$ za CT26) režimom smo potrdili lokalni in sistemski imunski odziv na vakcinacijo. Rezultati raziskave so pokazali potencial razvite tumorske vakcine v kombinaciji z obsevanjem ter so osnova za nadaljnje raziskave.

Ključne besede: tumorska vakcina, obsevanje, genski elektroprenos, IL-12

Uvod

Avtologne tumorske vakcine so vrsta terapevtskih vakcin za zdravljenje raka. Pripravljene so iz spremenjenih in z obsevanjem inaktiviranih ali liziranih bolnikovih tumorskih celic, ki so pomemben vir tumorskih antigenov (1, 2). Namen raziskave je bil pripraviti in testirati novo tumorsko vakcino, pripravljeno iz z obsevanjem ubitih tumorskih celic, z adjuvantnim genskim elektroprenosom (GEP) plazmida z zapisom za imunostimulatorni citokin interlevkin-12 (IL-12) (3). GEP je varna ne-virusna metoda vnosa genov v celice in najbolj raziskan je ravno GEP IL-12 (4, 5), ki je trenutno že v klinični fazi preizkušanja (6). Razvito vakcino smo kombinirali z radioterapijo. Z vakcino smo nameravali aktivirati imunski odziv proti tumorskim antigenom, z radioterapijo pa usmeriti aktiviran imunski odziv proti zdravljenemu tumorju (1, 7).

Materiali in metode

Raziskave smo izvedli na imunološko različnih tumorskih modelih B16-F10 in CT26, na singenih miši C57Bl/6NCrl ali Balb/cAnNCrl v skladu z navodili in dovoljenjem Ministrstva za kmetijstvo, gozdarstvo in prehrano Republike Slovenija (U34401-1/2015/43 in U34401-35/2020/8). Tumorsko vakcino smo pripravili iz z obsevanjem ubitih tumorskih celic in dodali plazmidno DNA z zapisom za mišji IL-12.

Vakcinacijo smo izvedli z injiciranjem vakcine v podkožje na hrbtu miši in s kontaktno več-točkovno elektrodo aplicirali nizkonapetostne električne pulze (24 pulzov, 170 V/cm, 5,64 Hz, 150 ms) za adjuvantni genski elektroprenos IL-12, prisotnega v vakcini. Terapevtski učinek vakcine smo testirali v kombinaciji z obsevanjem (IR). Najprej smo inducirali podkožne tumorje. S terapijo smo pričeli, ko so tumorji dosegli velikost 30-40 mm³. Vakcinacijo smo izvedli v kožo oddaljeno od tumorja. Tumorje smo obsevali z dozo 15 Gy. Protitumorski učinek smo spremljali z merjenjem velikosti tumorja in izračunom volumna ($V=a \times b \times c \times \pi/6$). Za določitev preventivnega učinka vakcine smo najprej aplicirali vakcino in nato inducirali tumorje in spremljali njihov izrast. Z izbrano kombinacijo optimalnih režimov na obeh tumorskih modelih smo nato določili lokalni in sistemski imunski odziv na vakcinacijo: z imunohistokemično analizo smo v koži na mestu vakcinacije in v tumorjih določili prisotnost grancim B+ efektorskih limfocitov (celice NK in celice T ubijalke), CD68+ makrofagov ter FoxP3+ celic T zaviralk, s testom FluoroSpot pa prisotnost tumorsko specifičnih efektorskih limfocitov v bezgavkah (GrB+/IFN γ + celice NK in celice T ubijalke).

Rezultati

Terapevtska vakcinacija je značilno doprinesla k protitumorskemu učinku obsevanja pri tumorskem modelu B16-F10 (2.97 ± 1 dni daljši zaostanek v rasti tumorjev kot po obsevanju, $P < 0,05$), ne pa tudi pri modelu CT26 (ns). Po drugi strani pa smo s preventivno vakcinacijo preprečili izrast do 56 % CT26 tumorjev, ne pa tudi B16-F10 tumorjev. Po optimizaciji obsevalnega in vakcinacijskega režima smo za B16-F10 tumorski model izbrali 5×5 Gy in $1 \times$ vakcinacijo ($2,17 \pm 0,38$ dni daljši zaostanek v rasti tumorjev kot po obsevanju, $P < 0,05$) za CT26 pa 5×5 Gy in $3 \times$ vakcinacijo ($8,45 \pm 1,2$ dni daljši zaostanek v rasti tumorjev in $2 \times$ višjo ozdravljivost tumorjev - 60 %, kot po obsevanju, $P < 0,05$). Med optimizacijo režimov smo pri B16-F10 modelu opazili večji vpliv spremembe obsevalnih režimov na učinkovitost kombinirane terapije, za razliko od CT26 modela, kjer je sprememba režima vakcinacije imela večji vpliv na učinkovitost terapije. Z izbranim režimom smo na B16-F10 modelu na mesto vakcine privabili makrofage in efektorske limfocite ($P < 0,05$). V B16-F10 tumorjih smo zaznali trend povišanja makrofagov, efektorskih limfocitov in celic T zaviralk, vendar le po kombinirani terapiji (ns). Prav tako smo po kombinirani terapiji dobili značilno povišano količino efektorskih limfocitov v bezgavkah ($P < 0,05$). Na CT26 modelu smo z izbranim režimom na mesto vakcinacije prav tako privabili makrofage ($P < 0,05$), nismo pa zvišali prisotnosti efektorskih limfocitov. Ta se je zvišala šele s kombinacijo z radioterapijo ($P < 0,05$). Zanimivo je, da smo v tumorjih pri tem modelu zaznali trend znižanja količine makrofagov po kombinirani terapiji (ns).

Razprava

Priprava tumorske vakcine se je izkazala za velik izziv zaradi različnega odziva obeh tumorskih modelov, predvidoma zaradi različne intrinzične imunogenosti izbranih modelov (8). Predpostavljamo, da pri manj imunogenem B16-F10 tumorskem modelu z obsevanjem izpostavimo tumorske antigene in vzpostavimo bolj imunoreaktivno tumorsko mikrookolje ter s tem omogočimo delovanje vakcine (7, 9). Zato smo pri tem modelu med optimizacijo terapevtskih režimov opazili večji vpliv sprememb v obsevalnem režimu na učinkovitost kombinirane terapije. Temeljno vlogo obsevanja

pri kombinirani terapiji smo dodatno potrdili z imunohistokemično in s FluoroSpot analizo, kjer smo s kombinirano terapijo značilno zvišali prisotnost imunskih celic na mesto vakcinacije in tumorsko specifičnih imunskih celic v bezgavkah. Pri bolj imunogenem CT26 tumorskem modelu pa smo s preventivno vakcinacijo omogočili, da imunski sistem prepozna že izpostavljene tumorske antigene na tumorskih celicah in jih lahko uniči. Zato je pri tem modelu sprememba režima vakcinacije bolj vplivala na učinkovitost kombinirane terapije, kot pa sprememba obsevalnega režima. Z optimizirano kombinirano terapijo smo tudi pri tem modelu na mesto vakcinacije privabili makrofage, medtem ko se je nakazalo, da v tumorjih s kombinirano terapijo celo znižamo količino makrofagov v primerjavi s samo radioterapijo. Za boljše razumevanje mehanizmov delovanja razvite vaccine so potrebne nadaljnje raziskave. Raziskava je pa nakazala, da bo za pripravo avtolognih vakcin pripravljenih z biopsijo tumorjev, potreben zelo individualen pristop, ki bo upošteval tako intrinzične lastnosti samih tumorskih celic, kot tudi lastnosti tumorskega mikrokolja.

Zahvala

Zahvaljujem se sodelavcem iz Oddelka za eksperimentalno onkologijo za njihovo pomoč, ter finančni podpori Javne agencije za raziskovalno dejavnost Republike Slovenije (P3-0003).

Literatura

1. Wennerberg E, Vanpouille-Box C, Bornstein S, et al. Immune recognition of irradiated cancer cells. *Immunol Rev* 2017; 280(1): 220-30.
2. Remic T, Sersa G, Ursic K, Cemazar M, Kamensek U. Development of tumor cell-based vaccine with IL-12 gene electrotransfer as adjuvant. *Vaccines* 2020; 8(1): 8-14.
3. Trinchieri G. Interleukin-12: A proinflammatory cytokine with immunoregulatory functions that bridge innate resistance and antigen-specific adaptive immunity. *Annu Rev Immunol* 1995; 13(1): 251-76.
4. Pavlin D, Cemazar M, Sersa G, et al. IL-12 based gene therapy in veterinary medicine. *J Transl Med* 2012; 10(1): 1.
5. Sersa G, Teissie J, Cemazar M, et al. Electrochemotherapy of tumors as in situ vaccination boosted by immunogene electrotransfer. *Cancer Immunol Immunother* 2015; 64(10): 1315-27.
6. Search of: IL-12 electroporation - List Results - ClinicalTrials.gov. Available from: <https://clinicaltrials.gov/ct2/results?recrs=&cond=&term=IL-12+electroporation&cntry=&state=&city=&dist=>
7. Cadena A, Cushman T, Anderson C, et al. Radiation and Anti-cancer vaccines: a winning combination. *Vaccines* 2018; 6(1): 9.
8. Mosely SIS, Prime JE, Sainson RCA, et al. Rational selection of syngeneic preclinical tumor models for immunotherapeutic drug discovery. *Cancer Immunol Res* 2016; 5(1): 29-41.
9. Formenti SC, Demaria S. Combining radiotherapy and cancer immunotherapy: a paradigm shift. *J Natl Cancer Inst* 2013; 105(4): 256-65.

PROGRAM ARRS P3-0307: RAK GLAVE IN VRATU – ANALIZA BIOLOŠKIH ZNAČILNOSTI IN POSKUS IZBOLJŠANJA ZDRAVLJENJA

Primož Strojani

Sektor radioterapije, Onkološki inštitut Ljubljana, Zaloška cesta 2, 1000 Ljubljana, Slovenija

Elektronski naslov: pstrojan@onko-i.si

Izveček

Program ARRS P3-0307 je namenjen preučevanju rakov glave in vratu: njihovih bioloških značilnosti kot tudi klinične obravnave. V prispevku so predstavljene osnovne aktivnosti programa v zadnjem obdobju financiranja (2019-2023).

Ključne besede: rak glave in vratu, biološke značilnosti, zdravljenje, raziskovanje

Uvod

Program P3-0307 je bil zasnovan leta 2004 kot platforma za promocijo raziskovalnih aktivnosti na področju obravnave rakov glave in vratu (RGV). Ustanovitev programa predstavlja logično nadaljevanje raziskovalnih prizadevanj med seboj že desetletja tesno sodelujočih skupin z Onkološkega inštituta Ljubljana (OIL) in Klinike za otorinolaringologijo in cervikofacialno kirurgijo Univerzitetnega Kliničnega centra Ljubljana (UKCL). Sprva pod vodstvom prof. Božene Ravnikar in akad. prof. Vinka Kambiča, kasneje pa prof. Marjana Budihne in prof. Lojzeta Šmida, sta ti dve skupini ključno oblikovali klinično prakso na področju rakov glave in vratu v Sloveniji ter skupaj uspešno izvedli številne projekte Javne agencije za raziskovalno dejavnost Republike Slovenije (ARRS). V zadnjem obdobju se aktivnosti programa vse tesneje prepletajo z dejavnostjo Oddelka za eksperimentalno onkologijo OIL, pa tudi Medicinske fakultete in Fakultete za elektrotehniko v Ljubljani.

Od ustanovitve programa P3-0307 pa do danes so bila torišče raziskav tri širša področja, znotraj katerih so se obravnavala različna specifična raziskovalna vprašanja. V nadaljevanju so navedene raziskovalne teme, obravnavane znotraj omenjenih področij v zadnjem obdobju financiranja programa (2019-2023).

Biološke značilnosti RGV

- ***Kvantitativni MR-perfuzijski in difuzijski parametri ter biomarkerji: vloga pri napovedi odgovora tumorjev na zdravljenje***

Zastavljena je prospektivna raziskava, ki v skupini prognostično neugodnih p16/HPV-negativnih ploščatoceličnih karcinomov (PCK) orofarinksa, zdravljenih s sočasno radiokemoterapijo na osnovi platine, ugotavlja:

- ali mutacijsko breme (TMB) ter pojavljanje specifičnih somatskih mutacij v tumorju oz. ctDNA v krvi napovedujejo učinkovitost zdravljenja in dinamiko razvoja bolezni;

- ujemanje med vrednostmi MR perfuzijskih parametrov in stopnjo izraženosti dejavnikov angiogeneze v krvi oz. miRNA v zunajceličnih veziklih.

Raziskava poteka v sodelovanju z Inštitutom za patologijo in Inštitutom za biokemijo Medicinske fakultete Ljubljana (MFL) ter Inštitutom za radiologijo UKCL. Raziskava je v fazi vključevanja bolnikov.

- **Človeški virus papiloma (HPV)**

HPV je eden najpomembnejših povzročiteljev PCK orofarinksa, HPV status tumorja pa je neodvisen dejavnik za napoved preživetja teh bolnikov. Načrtovana je izvedba prospektivne klinične raziskave faze 2. Hipoteza je naslednja: med bolniki s HPV-pozitivnim PCK orofarinksa je s pravilnim izborom mogoče poiskati tiste, pri katerih je mogoče znižati intenzivnost zdravljenja brez škode, da bi s tem poslabšali njegov izid. Temeljni namen intervencije je zmanjšati pogostnost in resnost stranskih učinkov zdravljenja.

Opravili smo pregled pristopov in raziskav, ki potekajo na področju deintezifikacije zdravljenja v tej skupini bolnikov (1); klinična raziskava je v fazi načrtovanja.

Aktivnosti, povezane s preučevanjem mehanizmov občutljivosti HPV-pozitivnega PCK orofarinksa, potekajo tudi na predklinični ravni, v povezavi z Oddelkom za eksperimentalno onkologijo OIL (2; vloga senzorjev DNA: Kristina Levpušček, dr. med., mlada raziskovalka).

- **Dodatna tema**

Ovrednotili smo pomen čakanja na zdravljenje/obsevanje: v sistematičnem pregledu obstoječe literature in z analizo lastnih podatkov (3, 4). Ugotavljamo, da odnos med čakanjem na zdravljenje/obsevanje in preživetjem bolnikov ni premočrten.

Novi pristopi k zdravljenju RGV

- **Elektrokemoterapija (EKT)**

EKT je lokalno ablativno zdravljenje, ki temelji na reverzibilni elektroporaciji in znotrajcelični akumulaciji hidrofilnih molekul citostatika (bleomicina ali cisplatina), kar močno poveča njihovo citotoksičnost. Uveljavljena je v zdravljenju kožnih tumorjev in metastaz, medtem ko je njena učinkovitost in toksičnost pri mukoznih PCK manj dognana. Po sistematičnem pregledu literature smo zaključili, da trenutni dokazi upravičujejo le paliativno uporabo EKT pri bolnikih brez drugih lokalnih ali sistemskih možnosti zdravljenja, medtem ko so za uporabo EKT v kurativne namene potrebne prospektivne primerjave z uveljavljenimi terapevtskimi načini (5).

V fazi načrtovana je raziskava, ki bo analizirala učinkovitost EKT z bleomicinom v različnih starostnih skupinah bolnikov s kožnimi RGV oz. glede na prejeto dozo citostatika. Raziskava bo izvedena na UKCL in OIL.

V sodelovanju z Oddelkom za eksperimentalno onkologijo OIL je načrtovana raziskava, ki bo ugotavljala pod katerimi pogoji EKT in ionizirajoče sevanje izzoveta imunološko pomembne spremembe v tumorskih celicah (Urša Kešar, mag. biotech., mlada

raziskovalka).

Člani raziskovalnega programa sodelujejo v projektu Smartgene in mednarodnem konzorciju InspECT (ang. International Network for Sharing Practices of ECT).

- ***Endoskopija z ozkospektralno osvetlitvijo (NBI, ang. Narrow-Band Imaging)***

NBI je endoskopski diagnostični postopek, ki uporablja ozkopasovne svetlobne filtre za boljši prikaz (pod)sluzničnih mikrovaskularnih struktur. Glavni namen NBI je zgodnja prepoznavna onkološko sumljivih sluzničnih sprememb. Del skupine na UKCL je zasnoval dve prospektivni klinični raziskavi: v prvi, ki je že zaključena, so preverili zanesljivost klasifikacije ELS (ang. European Laryngological Society) NBI žilnih sprememb na glasilkah (6); v drugi, ugotavljajo vlogo intrinzične prežiljenosti sluznice žrela v razvoju faringokutane fistule.

- ***Radiokemoterapija s cisplatinom***

Obsevanje s sočasno aplikacijo kemoterapije s cisplatinom predstavlja standardno zdravljenje bolnikov z lokoregionalno napredovalim PCK glave in vratu. Prirojena odpornost proti cisplatinu je eden od razlog za neučinkovitost zdravljenja; njeni mehanizmi so slabo poznani. Raziskati želimo, kateri geni oz. njihovih polimorfizmi so ključni za popravilo poškodb DNA, nastalih s cisplatinom, in ugotoviti, ali ti polimorfizmi vplivajo na učinkovitost in toksičnost zdravljenja z radiokemoterapijo s cisplatinom. V raziskavo, ki poteka v sodelovanju z Inštitutom za biokemijo in Inštitutom za patologijo MFL, smo vključili 110 bolnikov s PCK glave in vratu stadijev III in IV, zdravljenih z obsevanjem in vsaj 150 mg/m² cisplatina. V teku je genotipizacija in določitev SNP (ang. Single Nucleotide Polymorphisms) genov poti NER (ang. Nucleotide Excision Repair) ERCC1, ERCC4, ERCC5 in gena poti BER (ang. Base Excision Repair) XRCC1. Načrtovana je še imunohistokemična analiza pMK2-kinaze, ki sodeluje v postranskripcijskem izražanju genov, ki so vpleteni v popravilo okvare DNA.

- ***Dodatne teme***

Analizirali smo učinkovitost pulznega obsevanja z nizko hitrostjo doze v izogenih celičnih linijah PCK glave in vratu z različno občutljivostjo na ionizirajoče sevanje. Radiorezistentne celice so se izkazale za bolj občutljive, kot starševske celice: v slednjih nismo zabeležili učinka nizkodozne hiperobčutljivosti (čeprav so te bolj občutljive na konvencionalno obsevanje) (7).

Preučili smo mehanizme in možnosti kombiniranja imunoterapije in radioterapije v zdravljenju primarnih in recidivnih/metastatskih RGV ter analizirali lastne izkušnje (8-10).

S sistematičnim pregledom literature smo ovrednotili značilnosti nevroendokrinih karcinomov grla (11, 12). V sodelovanju z Inštitutom za patologijo MFL in obema UKC poteka analiza diagnostične in prognostične vrednosti nekaterih tradicionalnih in novejših (INSM1, PD-L1) molekularnih in histoloških markerjev, kliničnih značilnosti ter rezultatov zdravljenja nevroendokrinih karcinomov žrela in grla, diagnosticiranih v Sloveniji v obdobju 1995-2020.

Ocenili smo pomen individualnih podlag za glavo za natančnost obsevanja bolnikov z RGV (13). V teku sta tudi:

- analiza uspešnosti zdravljenja prospektivne skupine bolnikov s PCK grla ali hipofarinksa, ki so bili namesto z laringektomijo zdravljeni z indukcijsko kemoterapijo, ki ji je v primeru ugodnega odgovora sledila sočasna kemoradioterapija;
- skupna raziskava s Fakulteto za elektrotehniko, Univerza v Ljubljani »Računalniško podprta analiza medicinskih slik za načrtovanje zdravljenja s protonsko radioterapijo« (ARRS J2-1732).

Posledice onkološkega zdravljenja

• Ocena funkcije zgornjega aerodigestivnega trakta po zdravljenju

V več prospektivnih kohortnih kliničnih raziskavah načrtujemo oceno najpogostejših motenj organov zgornjega aerodigestivnega trakta oz. njihove funkcije, ki jih povzročajo agresivno onkološko zdravljenje. Analiza poteka z uporabo različnih subjektivnih in objektivnih metod za oceno opazovanih funkcij pred zdravljenjem in v predhodno opredeljenih časovnih intervalih po zdravljenju.

Opravljene so bile analize kakovosti glasu po radioterapiji začetnega karcinoma glasilk (14), požiranja (15), psihičnih motenj (v povezavi s prehranskim stanjem) (16) ter kakovosti življenja bolnikov z napredovalim RGV po koncu zdravljenja z radioterapijo (17).

• Alergična reakcija na cetuksimab

V dveh predhodnih raziskavah faze II pri bolnikih s PCK glave in vratu, ki sta vključevali tudi zdravljenje s cetuksimabom, smo kljub dosledni uporabi protialergijske premedikacije ob prvi aplikaciji cetuksimaba zabeležili nepričakovano visok odstotek infuzijskih/alergičnih reakcij stopnje 3-4 po lestvici NCI-CTCAE v3.0 (16 % oz. 28,2 %). V literaturi se kot najbolj verjeten vzrok omenja tip I anafilaktične reakcije, nastale zaradi predhodne senzibilizacije iz okolja (ugriza klopa).

Da bi ugotovili ali je tudi pri slovenskih bolnikih z RGV posredi predhodna senzibilizacija iz okolja, smo pri 65 bolnikih z napredovalim PCK glave in vratu in v kontrolni skupini bolnikov z rakom debelega črevesa in danke (kandidati za zdravljenje s cetuksimabom) z imunsko encimskim testom določili titre specifičnih protiteles IgE. Analiza rezultatov je v teku.

Zaključek

Raziskovalne aktivnosti, ki potekajo v okviru programa ARRS P3-0307, poskušajo slediti sodobnim izzivom v znanosti, z ambicijo prenesti rezultate in spoznanja v vsakodnevno obravnavo bolnikov z RGV v Sloveniji.

Literatura

1. Plavc G, Strojani P. Možnosti deintenzifikacije zdravljenja HPV pozitivnih ploščatoceličnih karcinomov orofarinksa. *Onkologija* 2019; 23(2): 8-20.

2. Kranjc Brezar S, Prevc A, Niksic Zakelj M, et al. Synergistic effect of cisplatin chemotherapy combined with fractionated radiotherapy regimen in HPV-positive and HPV-negative experimental pharyngeal squamous cell carcinoma. *Sci Rep* 2020; 10: 1563.
3. Schoonbeek RC, Zwertbroek J, Plaat BEC, et al. Determinants of delay and association with outcome in head and neck cancer: a systematic review. *Eur J Surg Oncol* 2021. (v tisku)
4. Žumer B, Pohar Perme M, Jereb S, et al. Impact of delays in radiotherapy of head and neck cancer on outcome. *Radiat Oncol* 2020; 15: 202.
5. Strojjan P, Grošelj A, Serša G, et al. Electrochemotherapy in mucosal cancer of the head and neck: a systematic review. *Cancers* 2021; 13: 1254.
6. Šifrer R, Šereg-Bahar M, Gale N, et al. The diagnostic value of perpendicular vascular patterns of vocal cords defined by narrow-band imaging. *Eur Arch Otorhinolaryngol* 2020; 277: 1715-23.
7. Todorovic V, Prevc A, Niksic Zakelj M, et al. Pulsed low dose-rate irradiation response in isogenic HNSCC cell lines with different radiosensitivity. *Radiol Oncol* 2020; 54: 168-79.
8. Plavc G, Strojjan P. Combining radiotherapy and immunotherapy in definitive treatment of head and neck squamous cell carcinoma: review of current clinical trials. *Radiol Oncol* 2020; 54: 377-93.
9. Plavc G, Jesenko T, Oražem M, et al. Challenges in combining immunotherapy with radiotherapy in recurrent/metastatic head and neck cancer. *Cancers* 2020; 12: 3197.
10. Plavc G, Strojjan P, Azarija J, et al. Imunoterapija pri ploščatoceličnem karcinomu glave in vratu: izkušnje iz Slovenije. *Onkologija* 2021. (v tisku)
11. Strojjan P, Hernandez-Prera JC, Beitler JJ, et al. Small cell and large cell neuroendocrine carcinoma of the larynx: a comparative analysis. *Cancer Treat Rev* 2019; 78: 42-51.
12. Strosberg C, Ferlito A, Triantafyllou A, et al. Update on neuroendocrine carcinomas of the larynx. *Am J Clin Pathol* 2019; 152: 686-700.
13. Androjna S, Marcius VZ, Peterlin P, et al. Assessment of set-up errors in the radiotherapy of patients with head and neck cancer: standard vs. individual head support. *Radiol Oncol* 2020; 54: 364-70.
14. Mekis J, Strojjan P, Boltezar IH. Factors affecting voice quality in early glottic cancer before and after radiotherapy. *Radiol Oncol* 2019; 53: 459-64.
15. Pezdirec M, Strojjan P, Boltezar IH. Swallowing disorders after treatment for head and neck cancer. *Radiol Oncol* 2019; 53: 225-30.
16. Gosak M, Gradišar K, Rotovnik Kozjek N, et al. Psychological distress and nutritional status in head and neck cancer patients: a pilot study. *Eur Arch Otorhinolaryngol* 2020; 277: 1211-7.
17. Gradišar K, Gosak M, Strojjan P. Kakovost življenja bolnikov z rakom glave in vratu, zdravljenih z radioterapijo: prospektivna samoocena z vprašalnikom EORTC QLQ-C30 in QLQ-H&N35. *Zdrav Vest* 2021. (v tisku)

PRIMERJAVA RAZLIK MED VRISOVALCI PRI DOLOČANJU TUMORSKEGA TARČNEGA VOLUMNA PRI RAKU POŽIRALNIKA NA MR, CT IN PET CT

Ajra Šečerov Ermenc in Barbara Šegedin

Onkološki inštitut Ljubljana, Zaloška cesta 2, 1000 Ljubljana, Slovenija

Elektronski naslov: asecerov@onko-i.si

Izvleček

Z raziskavo želimo opredeliti vpliv slikovne metode MR na vrisovanje GTV pri raku požiralnika v primerjavi s standardnimi slikovnimi preiskavami: CT in PET CT.

Ključne besede: rak požiralnika, tarčni volumen, magnetna resonanca, računalniška tomografija (CT), pozitronska emisijska tomografija (PET CT)

Uvod

Za uspešnost zdravljenja z obsevanjem sta potrebni natančno načrtovanje in priprava. Pri določanju tarčnih volumov v radioterapiji tradicionalno uporabljamo računalniško tomografijo (CT). Določanje proksimalnega in distalnega roba tumorja s pomočjo CT pri raku požiralnika ni povsem natančno, predvsem zaradi slabše ločljivosti mehkih tkiv na CT. Sillah in sodelavci so opravili primerjavo dolžine tumorjev, ocenjenih s CT slikanjem, in dejanske dolžine tumorjev na patohistoloških preparatih in ugotovili, da je dolžina, ocenjena s CT slikami, lahko večja. Glede na pridobljene izsledke raziskave so priporočali, da pri načrtovanju obsevanja uporabljamo še druge modalitete slikanja (1).

Uporaba pozitronske emisijske tomografije (PET) lahko izboljša natančnost določanja tarče pri načrtovanju obsevanja. Funkcionalna informacija o privzemu ¹⁸fluoro-2-deoksi-glukoze (FDG) in anatomsko informacija, pridobljena s pomočjo CT posnetka, omogoča boljši prikaz tumorja in posledično tudi natančnejše vrisovanje tarče pri načrtovanju obsevanja.

Pri raku požiralnika so povišan privzem radiofarmaka FDG v primarnem tumorju opažali v 68 % - 100 % (2-3). S pomočjo PET CT natančneje določimo prizadetost področnih bezgavk in oddaljenih zasevkov, kar je pomembno predvsem pri določanju stadija bolezni pred zdravljenjem (5). V treh raziskavah so primerjali dolžine tumorjev, vidne na FDG PET, in dolžine tumorjev v patohistoloških preparatih istih bolnikov ter ugotavljali dobro korelacijo (6- 8).

Slikovna diagnostika raka požiralnika z magnetno resonanco (MR) velja za tehnično zahtevno zaradi gibanja organov zaradi dihanja, utripanja srca in pretoka krvi skozi velike žile. Poleg tega požiralnik leži centralno v mediastinumu, kar slabša signal. V zadnjem desetletju je prišlo do številnih tehničnih izboljšav, ki omogočajo, da imajo slike odličen kontrast med požiralnikom in okolnim tkivom predvsem na T2 obteženih posnetkih (9).

Vloga MR pri vrisovanju tarčnih volumnov v radioterapiji raka požiralnika zaenkrat še ni opredeljena, potrebne so nadaljnje klinične raziskave.

Primernost določene slikovne metode za vrisovanje tarčnih volumnov lahko ocenimo z ocenjevanjem razlik med vrisovalci.

Dosedanje raziskave ocenjevanja razlik med vrisovalci pri raku požiralnika niso dale enotnih rezultatov (10-13).

Zasnova raziskave in metode

V raziskavo smo vključili 21 bolnikov z lokalno napredovalim rakom požiralnika, pri katerih je predvidena predoperativna ali definitivna kemoradioterapija. Bolniki so opravili pripravo na obsevanje po ustaljenem protokolu, ki ga običajno uporabljamo na Onkološkem inštitutu, dodatno so opravili MR sekvence. V raziskavi bo sodelovalo pet izkušenih vrisovalcev, ki imajo najmanj 5 let izkušenj pri načrtovanju obsevanja gastrointestinalnih tumorjev. Pridobljen slikovni material in vrisovalce bomo ustrezno anonimizirali. Predvideno je vrisovanje tumorskega tarčnega volumna (*angl. gross tumor volume – GTV*) ločeno na posameznih sekvencah, in sicer na CT, MR, PET CT, CT sekvencah z zlitjem MR in PET CT sekvencah z zlitjem MR. Vrisovalci bodo seznanjeni s kliničnimi podatki o primeru, prejeli bodo izvid opravljenih diagnostičnih preiskav pred obsevanjem (CT ali PET CT). Vrisovalci bodo beležili čas posameznega vrisovanja, kvaliteto slik in težavnost vrisovanja. Beležili bomo povprečni volumen GTV za vsakega vrisovalca, slikovno sekvenco in bolnika. Za ocenjevanje razlik med vrisovalci bomo pridobili generaliziran indeks konformnosti (*angl. generalised conformity index - CIgen*) za vsako slikovno sekvenco in vsakega bolnika. CIgen je neodvisen od števila vrisovalcev in predstavlja razmerje med vsoto presekov in vsoto unij vrisanih volumnov (14). Z uporabo algoritma STAPLE (*angl. simultaneous truth and performance level estimation*), ki z uporabo statistične metode iz več kontur generira povprečno, bomo ustvarili referenčno konturo iz kontur vseh sodelujočih vrisovalcev (15). Za analizo natančnosti vrisovanja bomo uporabljali programsko opremo CAT (Contour Analysis Tool) verzija 2, ki so jo izdelali na Oddelku za brahiradioterapijo OIL v sodelovanju s Fakulteto za matematiko, naravoslovje in informacijske tehnologije Primorske univerze, primerjali bomo testne konture ob vsakem vrisovanju z referenčno konturo. Za vsak par kontur bomo pridobili planarni indeks konformnosti (*angl. planar conformity index – PCI*), ki predstavlja razmerje med presekom in unijo testne in referenčne konture ter volumski indeks konformnosti (*angl. volume conformity index – VCI*), ki predstavlja razmerje med presekom in unijo testnega in referenčnega volumna, ter izvedli prostorsko analizo (16-17).

Pričakovani rezultati

Pričakujemo manjše razlike pri vrisovanju tumorskega tarčnega volumna na MR v primerjavi s CT ali PET CT, predvsem zaradi boljše ločljivosti mehkih tkiv na MR. Obenem pričakujemo daljše in zahtevnejše vrisovanje na MR sekvencah, ker metoda še ni uveljavljena. Pričakujemo največje razlike med vrisovalci v kranio-kavdalni smeri, ki pa bodo predvidoma najmanjše pri vrisovanju na MR sekvencah. Če bi z izsledki raziskave potrdili manjše razlike med vrisovalci, bi lahko tudi MR postala standardna metoda pri načrtovanju obsevanja pri raku požiralnika.

Zaključek

Natančno vrisovanje tarčnih volumnov je ključnega pomena pri načrtovanju obsevanja, razlike med vrisovalci lahko vplivajo na izid zdravljenja in toksične sopojava, prav zaradi tega je pomembno ocenjevanje le-teh.

Literatura

1. Sillah K, Williams LR, Laasch HU, et al. Computed tomography overestimation of esophageal tumor length: Implications for radiotherapy planning. *World J Gastrointest Oncol* 2010; 2(4): 197.
2. Himeno S, Yasuda S, Shimada H, et al. Evaluation of esophageal cancer by positron emission tomography. *Jpn J Clin Oncol* 2002; 32: 340-6.
3. Rankin SC, Taylor H, Cook GJ, et al. Computed tomography and positron emission tomography in the pre-operative staging of oesophageal carcinoma. *Clin Radiol* 1998; 53: 659-65.
4. Kato H, Kuwano H, Nakajima M, et al. Comparison between positron emission tomography and computed tomography in the use of the assessment of esophageal carcinoma. *Cancer* 2002; 94: 921-8.
5. Muijs CT, Beukema JC, Pruijm J, et al. A systematic review on the role of FDG-PET/CT in tumour delineation and radiotherapy planning in patients with esophageal cancer. *Radiother Oncol* 2010; 97(2): 165-71
6. Zhong X, Yu J, Zhang B, et al. Using 18F-Fluorodeoxyglucose Positron Emission Tomography to Estimate the Length of Gross Tumor in Patients With Squamous Cell Carcinoma of the Esophagus. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 2009; 73(1): 136-41.
7. Han D, Yu J, Yu Y, Zhang G, Zhong X, Lu J, et al. Comparison of 18F-Fluorothymidine and 18F-Fluorodeoxyglucose PET/CT in Delineating Gross Tumor Volume by Optimal Threshold in Patients With Squamous Cell Carcinoma of Thoracic Esophagus. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 2010; 76(4): 1235-41.
8. Mamede M, Fakhri GE, Abreu-E-Lima P, et al. Pre-operative estimation of esophageal tumor metabolic length in FDG-PET images with surgical pathology confirmation. *Ann Nucl Med* 2007; 21(10): 553-62.
9. Van Rossum PSN, van Lier ALHMW, Lips IM, et al. Imaging of oesophageal cancer with FDG-PET/CT and MRI. *Clin Radiol* 2015; 70(1): 81-95.
10. Schreurs LM, Busz DM, Paardekooper GM, et al. Impact of 18-fluorodeoxyglucose positron emission tomography on computed tomography defined target volumes in radiation treatment planning of esophageal cancer: reduction in geographic misses with equal inter-observer variability. *Dis Esophagus* 2010; 23(6): 493-501.
11. Nowee ME, Voncken FEM, Kotte ANTJ, et al. Gross tumour delineation on computed tomography and positron emission tomography-computed tomography in oesophageal cancer: A nationwide study. *Clin Transl Radiat Oncol* 2018; 14: 33-9.
12. Machiels M, Jin P, van Hooft JE, et al. Reduced inter-observer and intra-observer

- delineation variation in esophageal cancer radiotherapy by use of fiducial markers. *Acta Oncol* 2019; 58(6): 1-8.
13. Vollenbrock SE, Nowee ME, Voncken FEM, et al. Gross Tumor Delineation in Esophageal Cancer on MRI Compared With 18F-FDG-PET/CT. *Adv Radiat Oncol* 2019; 4(4): 596-604.
 14. Kouwenhoven E, Giezen M, Struikmans H. Measuring the similarity of target volume delineations independent of the number of observers. *Phys Med Biol* 2009; 54(9): 2863-73.
 15. Warfield SK, Zou KH, Wells WM. Simultaneous Truth and Performance Level Estimation (STAPLE): An Algorithm of Image Segmentation. *IEEE Trans Med Imaging* 2004; 23(7): 903-21.
 16. Šegedin B. Objektivna ocena vpliva učenja na razlike pri vrisovanju tarčnih volumnov v radioterapiji: doktorska disertacija. Ljubljana; Medicinska fakulteta 2016.
 17. Petrič P, Blas M, Hellebust TP, et al. Uncertainties of target volume delineation in MRI guided adaptive brachytherapy of cervix cancer: A multi-institutional study. *Radiother Oncol* 2013; 107(1): 6-12.

MINIMALNO INVAZIVNI DIAGNOSTIČNI PRISTOPI PRI PRIMARNIH MOŽGANSKIH TUMORJIH Z UPORABO PROSTO CIRKULIRAJOČIH NUKLEINSKIH KISLIN

Marija Skoblar Vidmar¹, Jernej Mlakar², Uroš Smrdel¹, Alenka Matjašič², Jože Pižem², Andrej Zupan²

¹ *Onkološki inštitut Ljubljana; Sektor radioterapije, Zaloška 2, 1000 Ljubljana, Slovenija*

² *Inštitut za patologijo, Medicinska fakulteta, Univerza v Ljubljani, Korytkova 2, 1000 Ljubljana, Slovenija*

Elektronski naslov: mskoblar@onko-i.si

Izveček

Tekočinska biopsija predstavlja minimalno invazivni postopek, ki zagotavlja podobne informacije iz telesnih tekočin, kot jih običajno dobimo iz vzorca biopsije tkiva. Uporaba tekočinske biopsije v kliničnem okolju dopolnjuje področje onkologije z vidika natančnega in personaliziranega pristopa po meri bolnika. Lahko se uporabi že pri postavitvi diagnoze in molekularno genetskem profiliranju možganskih tumorjev, kot tudi kasneje med onkološko terapijo ter spremljanjem odziva na zdravljenje.

Ključne besede: tekočinska biopsija, možganski tumorji, onkološko zdravljenje

Primarni možganski tumorji

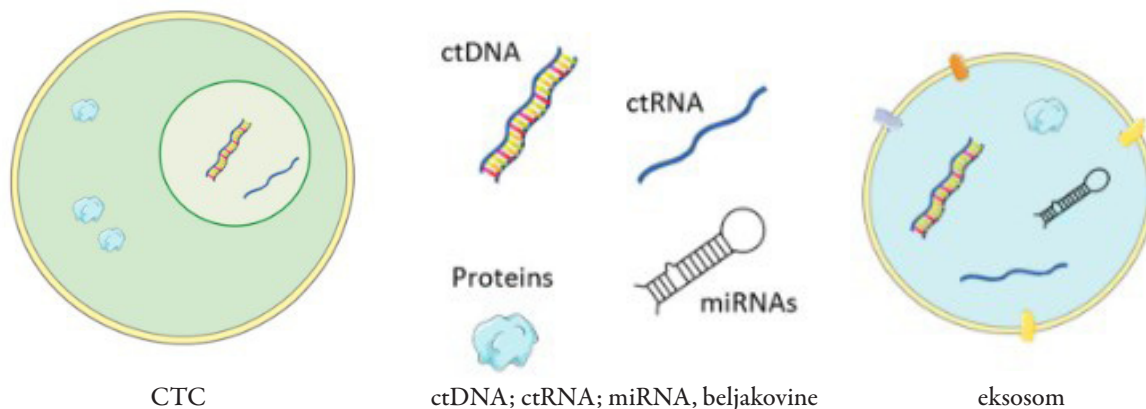
Primarni možganski tumorji vzniknejo v možganih ali hrbtenjači iz možganskih celic, ovojnic, živcev ali žlez. Obstaja več kot 120 različic, ki se razlikujejo po etiologiji, histologiji, molekularno genetski sliki, načinu in izidu zdravljenja. Pojavljajo se v razponu od benignih, asimptomatskih tumorjev, ki ne zahtevajo zdravljenja, do zelo invazivnih, najbolj malignih tumorjev, ki so običajno neozdravljivi. Trenutna klasifikacija možganskih tumorjev uporablja molekularno genetske značilnosti kot dodatek k histologiji pri mnogih tumorskih entitetah (1). Molekularno genetske značilnosti izboljšajo diagnostično natančnost in s spreminjanjem priporočil za zdravljenje vplivajo na klinični potek. Znano je, da mutacije v genih, ki kodirajo izocitrat dehidrogenazo (IDH) 1 ali 2 igrajo odločilno vlogo pri razvrščanju gliomov. Difuzni astrocitom IDH-divjega tipa se klinično obnaša kot najbolj maligni med glialnimi tumorji oz. kot glioblastom (2). Onkološko zdravljenje, ki vključuje kirurgijo, radioterapijo in sistemsko terapijo je vedno potrebno kadar gre za primarni glialni tumor IDH-divjega tipa, ne glede na histološki gradus. Glioblastom IDH-divjega tipa predstavlja približno 50 % vseh gliomov. Povprečno preživetje bolnikov s temi tumorji je 12- 15 mesecev (od postavitve diagnoze), 5 letno preživetje pa manj kot 5 %. Standardno zdravljenje glioblastoma in večine gliomov IDH-divjega tipa vključuje maksimalno kirurško resekcijo ter dodatno radiokemoterapijo s temozolomidom (3). Zaradi proliferativne, radiorezistentne in kemorezistentne narave tumorja ter izrazite heterogenosti se bolezen ponavlja, možnosti dodatnega zdravljenja pa so zelo skromne (4, 5).

Molekularno genetsko profiliranje gliomov je poleg heterogenosti med tumorji pokazalo tudi pomembno heterogenost znotraj posamičnega tumorja, v katerem so prisotne različne celične populacije z različnimi genetskimi profili (6, 7). Pridobitev

vzorca možganskega tumorja je invazivni postopek, ki neredko predstavlja tveganje za bolnika zaradi krvavitve v tumor ali možnosti nevrološkega poslabšanja. Poleg tega je biopsija tkiva odvzeta iz majhnega in lokaliziranega področja v tumorju, v katerem ne bo reprezentativno prikazana celotna intratumorska heterogenost. Zaradi naštetega biopsija tumorskega tkiva zagotovo ni metoda, primerna za spremljanje odziva možganskih tumorjev 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. pseudoprogrsa in radiacijske nekroze, ki pogosto simulirata progres tumorja (8). 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 po 1 ali 2 letih po obsevanju. Uporabljajo se dodatne slikovne metode, kot sta MR s perfuzijo ali MR spektroskopija, ter funkcionalne metode, kot je FET- PET-CT, vendar razlikovanje stranskih učinkov onkološkega zdravljenja od progressa tumorja še vedno predstavlja izziv (9, 10).

Tekočinska biopsija

Potrebne so nove objektivne metode za vrednotenje bremena bolezni med zdravljenjem in po njegovem zaključku (12, 13). V zadnjem desetletju se z razvojem modernih tehnologij odpirajo možnosti uporabe tekočinske biopsije tudi za bolnike z glialnimi tumorji (14-18). Kot je prikazano na sliki 1, so komponente tekočinske biopsije (kri/plazma ali cerebrospinalna tekočina), ki lahko posredujejo informacije o primarnem tumorju: cirkulirajoče tumorske celice (CTC) (ang. Cirrculating Tumor Cells), cirkulirajoča prosta tumorska DNA (ctDNA), cirkulirajoča prosta tumorska RNA (ctRNA), mikro RNA (miRNA) in ekstracelularni vezikli (eksosomi) (19).



Slika 1: Komponente, ki jih lahko analiziramo s tekočinsko biopsijo plazme: CTC-cirkulirajoča tumorska celica, ctDNA-cirkulirajoča prosta tumorska DNA, ctRNA- cirkulirajoča prosta tumorska RNA, miRNA mikro RNA, ekstracelularni vezikli (eksosomi); povzeto iz: Saenz-Antoñanzas A, et al. *Cancers* 2019; 11(7): 950 (19).

Nabor bolnikov, analize vzorcev in primerjava podatkov

V raziskavo bomo vključili 150-200 odraslih in otroških bolnikov s primarnim možganskim tumorjem in jih sledili od diagnoze, v času zdravljenja in po njem. Prvi vzorec krvi bo odvzet pred kirurškim posegom, drugi pred pričetkom zdravljenja z radiokemoterapijo in nato vsake tri mesece med zdravljenjem s kemoterapijo in med spremljanjem po zaključku zdravljenja. Skupno bo bolnikom odvzetih 4-6 vzorcev krvi. Primerjali bomo podatke iz tkivne biopsije s podatki iz tekočinskih biopsij, z namenom preučiti heterogenost in evolucijo tumorjev. Uporabljali bomo izjemno občutljive teste na osnovi digitalnega kapljičnega PCR-ja za visoko občutljivo odkrivanje ctDNA in ctRNA v krvi. Za zaznavanje širšega nabora molekularnih označevalcev (IDH1, EGFR, TP53, PTEN, NF1, MET, TERT, ATRX, H3F3A in drugi) bomo uporabili metodo sekvenciranja naslednje generacije. Z metodo sekvenciranja naslednje generacije bomo pri vzorcih krvi analizirali 52 genov, ki so pogosto pojavljajo pri teh tumorjih. Podatke bomo primerjali s podatki, pridobljenimi iz tkivnih vzorcev, ki so bili bolnikom odvzeti med operacijo tumorja; tu bo panel pri odraslih bolnikih obsegal 29 genov, pri otrocih pa 161 genov. V nabor bodo vključene tudi mutacije genov, ki bi lahko predstavljali tarče bodočih terapij (npr. BRAF, NTRK, ALK, ROS1, itd.). Opravili bomo tudi analizo izražanja RNA in analizo metilacijskega statusa.

Od sredine januarja 2021 je bilo v raziskavo vključenih 16 odraslih bolnikov. Pri petih bolnikih je bila kri vzeta dvakrat.

Zaključek

Maligni gliomi še vedno predstavljajo najbolj agresivno skupino tumorjev pri ljudeh, ki se kljub agresivnemu zdravljenju skoraj vedno ponovijo. Tkivna biopsija in slikovna diagnostika še vedno predstavljata osnovni orodji diagnostičnega postopka, za določitev prognoze, izbor zdravljenja in v spremljanju odziva na zdravljenje. Tekočinska biopsija iz plazme je privlačna in minimalno invazivna metoda za identifikacijo diagnostičnih in prognostičnih biomarkerjev, za spremljanje evolucije tumorjev, odziva na zdravljenje in izbor zdravljenja. Potrebna je celostna analiza dosedanjih raziskovalnih podatkov in standardizacija uporabnih tehnik: k temu bodo gotovo prispevali tudi rezultati naše raziskave. V primeru, da bodo rezultati raziskave potrdili zadostno občutljivost in specifičnost metode, bi lahko njena redna klinična uporaba znatno olajšala spremljanje bolnikov po zdravljenju in olajšala diagnostiko tumorjev na kirurško težko dostopnih mestih, kjer diagnostična biopsija predstavlja tveganje za razvoj nevrološke okvare.

Literatura:

1. Louis DN, Perry A, Reifenberger G, et al. The 2016 world health organization classification of tumors of the central nervous system: a summary. *Acta Neuropathol* 2016; 131: 803-20.
2. Cohen AL, Colman H. Glioma biology and molecular markers. *Cancer Treat Res* 2015; 163: 15-30.
3. Stupp R, Mason WP, van den Bent MJ, et al. Radiotherapy plus concomitant and adjuvant temozolomide for glioblastoma. *N Engl J Med* 2005; 352: 987-96.
4. Stupp R, Hegi ME, Mason WP, et al. Effects of radiotherapy with concomitant

and adjuvant temozolomide versus radiotherapy alone on survival in glioblastoma in a randomised phase III study: 5-year analysis of the EORTC-NCIC trial. *Lancet Oncol* 2009; 10: 459-66.

5. Brennan CW, Verhaak RG, McKenna A, et al. The somatic genomic landscape of glioblastoma. *Cell* 2013; 155: 462-77.
6. Siegal T. Clinical impact of molecular biomarkers in gliomas. *J Clinical Neurosci* 2015; 22(3): 437-44.
7. Aldape K, Zadeh G, Mansouri S, et al. Glioblastoma: pathology, molecular mechanisms and markers. *Acta Neuropathologica* 2015; 129(6): 29-848.
8. Peca C, Pacelli R, Elefante A, et al. Early clinical and neuroradiological worsening after radiotherapy and concomitant temozolomide in patients with glioblastoma: tumour progression or radionecrosis? *Clin Neurol Neurosurg* 2009; 111(4): 331-4.
9. Zhou J, Tryggstad E, Wen Z, et al. Differentiation between glioma and radiation necrosis using molecular magnetic resonance imaging of endogenous proteins and peptides. *Nat Med* 2011; 17(1): 130-4.
10. Zhang H, Ma L, Wang Q, et al. Role of magnetic resonance spectroscopy for the differentiation of recurrent glioma from radiation necrosis: a systematic review and meta-analysis. *Eur J Radiol* 2014; 83: 2181-2189.
11. Siravegna G, Marsoni S, Siena S, et al. Integrating liquid biopsies into the management of cancer. *Nat Rev Clin Oncol* 2017; 14(9): 531-48.
12. Shankar GM, Balaj L, Stott SL, et al. Liquid biopsy for brain tumors. *Expert Rev Mol Diagn* 2017; 17(10): 943-47.
13. Heitzer E, Haque IS, Roberts CES, et al. Current and future perspectives of liquid biopsies in genomics-driven oncology. *Nat Rev Genet* 2019; 20: 71-88.
14. Xu T, Wang H, Huang X, et al. Gene fusion in malignant glioma: an emerging target for next generation personalized treatment. *Transl Oncol* 2018; 11(3): 609-18.
15. Haase S, Garcia-Fabiani MB, Carney S, et al. Mutant ATRX: uncovering a new therapeutic target for glioma. *Expert Opin Ther Targets* 2018; 22(7): 599-613.
16. Piccioni DE, Achrol AS, Kiedrowski LA, et al. Analysis of cell-free circulating tumor DNA in 419 patients with glioblastoma and other primary brain tumors. *CNS oncology*. 2019; 8(2): CNS34.
17. Yang P, Zhang W, Wang Y, et al. IDH mutation and MGMT promoter methylation in glioblastoma: results of a prospective registry. *Oncotarget* 2015; 6(38): 40896-906.
18. Romani M, Pistillo MP, Banelli B. Epigenetic Targeting of glioblastoma. *Front Oncol* 2018; 8:448-8.
19. Saenz-Antoñanzas A, Auzmendi-Iriarte J, Carrasco-Garcia E, et al. Liquid Biopsy in glioblastoma: opportunities, applications and challenges. *Cancers* 2019; 11(7): 950.

GENETSKI OZNAČEVALCI PRI MEZOTELIOMU

Danijela Štrbac^{1,2}, Katja Goričar³, Vita Dolžan³, Viljem Kovač^{1,2}

¹ Sektor Radioterapije, Onkološki Inštitut Ljubljana, Zaloška 2, 1000 Ljubljana, Slovenija;

² Medicinska Fakulteta, Univerza v Ljubljani, Vrazov trg 2, 1000 Ljubljana, Slovenija

³ Laboratorij za farmakogenetiko, Inštitut za biokemijo, Medicinska fakulteta, Univerza v Ljubljani, Vrazov trg 2, Ljubljana, 1000, Slovenija

Elektronski naslov: dstrbac@onko-i.si

Izvleček

Maligni mezoteliom je redka, vendar agresivna bolezen, ki ima še vedno malo diagnostičnih in terapevtskih možnosti. Pri raziskovanju bioloških označevalcev smo izbrali deset polimorfizmov v treh različnih genih za metaloproteinaze: rs243865, rs243849 in rs7201 v *MMP2*; rs17576, rs17577, rs20544 in rs2250889 v *MMP9*; rs1042703, rs1042704 in rs743257 v *MMP14*. V študijo napovednih dejavnikov smo vključili 199 bolnikov z mezoteliomom, v študijo tveganja za nastanek mezotelioma pa 236 bolnikov in 161 zdravih krvodajalcev. Dokazali smo vpliv *MMP9* rs2250889 alela na krajše preživetje ter vpliv *MMP9* rs20544 in *MMP14* rs1042704 na pomembno daljše preživetje bolnikov z mezoteliomom. Nosilci *MMP2* rs243865 alela so imeli manjše tveganje za nastanek mezotelioma.

Ključne besede: maligni mezoteliom, genetski označevalec, polimorfizem proteinaz, folatna pot pemetreksed

Uvod

Maligni mezoteliom je v Sloveniji redka bolezen s približno 40-50 novimi primeri na leto (1).

Diagnostika je pogosto zahtevna, saj biopsija plevre vedno ne potrdi bolezni. Že pred približno 50 leti so pričeli iskati serumske označevalce, ki bi lahko služili v diagnostiki in za sledenje mezotelioma. Med njimi je mezotelin prvi in trenutno tudi edinim uveljavljen serumski označevalec. Sledile so raziskave z drugimi označevalci, kot sta survivin in fibulin (2, 3). Naša skupina je raziskala polimorfizme v genih, ki sodelujejo pri metabolizmu folatne poti pemetrekseda. Polimorfizem v *MTHFD1* je vplival na odgovor na zdravljenje in preživetje (4). Raziskovanje smo nadaljevali s preučevanjem polimorfizmov v genih za metaloproteinaze (*MMP*) *MMP2*, *MMP9* in *MMP14*. Z raziskovanjem polimorfizmov pogostih proteinaz smo želeli ugotoviti, ali ti lahko napovejo čas do napredovanja bolezni, celokupno preživetje in kateri posamezniki imajo večje tveganje za nastanek mezotelioma.

Bolniki in metode

Genotipizacijo smo opravili pri 199 bolnikih z mezoteliomom, pri katerih smo vrednotili čas do napredovanja bolezni in celokupno preživetje. Izbrali smo deset polimorfizmov: rs243865, rs243849 in rs7201 v *MMP2*; rs17576, rs17577, rs20544 in rs2250889 v *MMP9*; rs1042703, rs1042704 in rs743257 v *MMP14*. Vpliv na preživetje smo izračunali s Coxovo regresijo.

Pri raziskovanju tveganja za nastanek mezotelioma smo uporabili serume 236 bolnikov z

mezoteliomom, ki smo jih zdravili na Onkološkem Inštitutu in 161 zdravih krvodajalcev. Izbrali smo deset istih polimorfizmov, kot pri bolnikih z mezoteliomom. Genotipizacija smo naredili s testom KASPer. Pri statistični analizi smo uporabili dominantne in aditivne genetske modele. Pri izračunu tveganja za nastanek mezotelioma v povezavi s polimorfizmi *MMP* pa smo uporabili logistično regresijo in rezultat izrazili z razmerjem obetov s 95 % intervalom zaupanja.

Rezultati

Rezultatih so pokazali vpliv *MMP9* rs2250889, *MMP9* rs20544 in *MMP14* rs1042704 na celokupno preživetje pri bolnikih z mezoteliomom. Nosilci *MMP9* rs2250889 alela so imeli krajše celokupno preživetje (9,23 proti 19,10 mesecev). Nosilci vsaj enega polimorfnega alela *MMP9* rs20544 in *MMP14* rs1042704 pa so imeli signifikantno daljše preživetje (19,5 proti 13,5 in 12,7 proti 17,5 mesecev).

Pri raziskovanju tveganja za nastanek mezotelioma smo ugotovili, da imajo nosilci vsaj enega *MMP2* rs243865 alela manjše tveganje za nastanek mezotelioma (razmerje obetov 0,66, 95 % interval zaupanja 0,44 - 1,00, $p = 0,05$). Povezava med tveganjem za nastanek mezotelioma in *MMP2* rs243865 alelom je bila še bolj značilna pri bolnikih, ki so bili izpostavljeni azbestu (razmerje obetov 0,55, 95 % interval zaupanja 0,35-0,68, $p = 0,009$).

Razprava

Iz naših rezultatov je razvidno, da imajo genetski polimorfizmi v izbranih genih za *MMP* različen vpliv tako na celokupno preživetje kot na čas do napredovanja bolezni. *MMP2* rs243865 deluje celo protektivno in ščitijo pred razvojem mezotelijoma, še posebej posameznike, ki so bili izpostavljeni azbestu (5, 6). Rezultati izpostavljajo različen vpliv posameznih polimorfizmov v genih za *MMP* in se ujemajo z rezultati večjih tovrstnih študij pri bolj pogostih rakih (7).

Polimorfizmi v izbranih genih za *MMP* so lahko pomembni napovedni označevalci in označevalci tveganja za razvoj mezotelioma. Njihova vrednost se še poveča v kombinaciji z drugimi označevalci (8). Sodobne tehnologije z nanosenzorji bi lahko pomagale pri odkrivanju novih označevalcev (9).

Literatura

1. Incidenca - Slora. Dostopno na: <http://www.slora.si/stevilo-novih-bolnikov>
2. Kovac V, Dodic-Fikfak M, Arneric N, et al. Fibulin-3 as a biomarker of response to treatment in malignant mesothelioma. *Radiol Oncol* 2015; 49(3): 279-85.
3. Hmeljak J, Erčulj N, Dolžan V, et al. Is survivin expression prognostic or predictive in malignant pleural mesothelioma? *Virchows Arch* 2013; 462(3): 315-21.
4. Goričar K, Kovač V, Dolžan V. Polymorphisms in translesion polymerase genes influence treatment outcome in malignant mesothelioma. *Pharmacogenomics* 2014; 15(7): 941-50.
5. Strbac D, Goricar K, Dolzan V, et al. Matrix metalloproteinases polymorphisms as baseline risk predictors in malignant pleural mesothelioma. *Radiol Oncol* 2018;

52(2): 160-6.

6. Štrbac D, Goričar K, Dolžan V, et al. Matrix metalloproteinases polymorphisms as prognostic biomarkers in malignant pleural mesothelioma. *Dis Markers* 2017; 2017: 8069529.
7. Chen TY, Li YC, Liu YF, et al. Role of MMP14 gene polymorphisms in susceptibility and pathological development to hepatocellular carcinoma. *Ann Surg Oncol* 2011; 18(8): 2348-56.
8. Lacerenza S, Ciregia F, Giusti L, et al. Putative Biomarkers for Malignant Pleural Mesothelioma Suggested by Proteomic Analysis of Cell Secretome. *Cancer Genomics Proteomics* 2020; 17(3): 225-36.
9. Phan JH, Moffitt RA, Stokes TH, et al. Convergence of biomarkers, bioinformatics and nanotechnology for individualized cancer treatment. *Trends Biotechnol* 2009; 27(6): 350-8.

12

MOLEKULARNI OZNAČEVALCI ODGOVORA NA ZDRAVLJENJE PRI RAKU DOJK

Tanja Marinko^{1,2}, Vita Dolžan³, Katja Goričar³

¹ Onkološki inštitut Ljubljana, Zaloška 2, 1000 Ljubljana, Slovenija

² Medicinska fakulteta, Univerza v Ljubljani, Vrazov trg 2, 1000 Ljubljana, Slovenija

³ Inštitut za biokemijo in molekularno genetiko, Medicinska fakulteta, Univerza v Ljubljani, Vrazov trg 2, 1000 Ljubljana, Slovenija

Elektronski naslov: tmarinko@onko-i.si

Izvleček

Dopolnilno obsevanje bolnic z rakom dojk izboljša preživetje bolnic, hkrati pa lahko povzroča neželene učinke zdravljenja. V raziskavi "Molekularni označevalci odgovora na zdravljenje pri raku dojk", želimo raziskati, kateri genetski označevalci so povezani z neželenimi učinki zdravljenja z obsevanjem na koži in na srcu.

Ključne besede: rak dojk, molekularni označevalci, zdravljenje z obsevanjem, neželeni učinki zdravljenja

Uvod

Rak dojk je najpogostejši rak pri ženskah v razvitem svetu in drugi najpogostejši vzrok smrti zaradi raka pri ženskah (1). Z dopolnilnim obsevanjem bolnic po operaciji raka dojk pomembno izboljšamo lokalno kontrolo bolezni. Kot vsako zdravljenje, ima tudi obsevanje neželene zgodnje in kasne učinke, ki lahko pomembno vplivajo na kakovost življenja, vendar med bolniki obstajajo razlike v njihovem pojavljanju. Zaenkrat ne poznamo metode, s pomočjo katere bi lahko že pred začetkom zdravljenja napovedali, katere bolnice bodo imele bolj izražene neželene učinke, da bi temu prilagodili zdravljenje z obsevanjem. Nekateri raziskave so že pokazale, da so genomski in plazemski dejavniki (zunajcelični vezikli in miRNA) lahko povezani z odgovorom na zdravljenje z obsevanjem in pojavom neželenih učinkov (2, 3).

"Molekularni označevalci raka dojk" je naslov obširne krovne raziskave, ki je bila s strani Komisije za medicinsko Etiko Republike Slovenije in s strani ustreznih komisij na Onkološkem inštitutu (OI) odobrena leta 2016, ko se je tudi začela. Namen raziskave je prepoznavanje novih molekularnih napovednih dejavnikov odgovora na zdravljenje z obsevanjem pri bolnicah z rakom dojk s pomočjo kliničnih podatkov, parametrov obsevanja, podatkov slikovnih preiskav ter genetskih in plazemskih označevalcev. Raziskava ima retrospektivni in prospektivni del. V okviru retrospektivnega dela raziskave so nekateri rezultati že objavljeni; navedeni so v nadaljevanju (4).

V okviru prospektivnega dela raziskave potekata dva raziskovalna projekta ARRS. Prvi projekt z naslovom "Molekularni napovedni dejavniki odgovora na zdravljenje z obsevanjem pri raku dojk" (J3-1753) poteka od leta 2019 v sodelovanju med OI in Inštitutom za biokemijo in molekularno genetiko Medicinske fakultete Univerze v Ljubljani. Drugi projekt z naslovom "Novi pristopi za napovedovanje kardiotoksičnosti pri obsevanju raka dojk" (J3-2527) pa poteka od leta 2020 in poleg obeh že omenjenih

ustanov vključuje še Oddelek za kardiologijo Univerzitetnega kliničnega centra Ljubljana. V okviru obeh projektov trenutno poteka vključevanje bolnic, prvi rezultati pa bodo objavljeni prihodnje leto.

V retrospektivni raziskavi smo želeli preveriti, ali je genetska variabilnost v antioksidativnih mehanizmih in v mehanizmih popraviljanja poškodb DNA s homologno rekombinacijo povezana s tveganjem za pojav poznih neželenih učinkov obsevanja na koži ter na srcu pri raku dojke. Genetska variabilnost lahko povzroči spremembe v delovanju ali izražanju encimov, to pa se odraža v stopnji obrambne sposobnosti celice pred oksidativnim stresom ali v zmožnosti popraviljanja DNA ter posledično v izraženosti neželenih učinkov po obsevanju

Materiali in metode

V retrospektivni del raziskave smo vključili 101 bolnico s HER2 pozitivnim zgodnjim rakom dojke, ki so bile zdravljene s trastuzumabom in dopolnilnim obsevanjem. DNA smo izolirali iz brisov ustne sluznice. Za določanje izbranih polimorfizmov v antioksidativnih genih (*CAT*, *SOD2*, *PON1*, *GSTP1*, *HIF1*) in genih, ki sodelujejo pri popraviljanju DNA s homologno rekombinacijo (*NBN*, *RAD51*, *XRCC3*) smo uporabili alelno specifični PCR. Za spremljanje poznih neželenih učinkov na koži smo uporabili kriterije CTCAEv.3 in LENT-SOMA, za spremljanje neželenih učinkov na srcu pa nivo NT-proBNP (N-konec pro-B-tipa natriuretičnega peptida), razred NYHA (New York Heart Association) in spremembo LVEF (iztisni delež levega prekata). Povezavo med genetskimi dejavniki in poznimi neželenimi učinki obsevanja smo ovrednotili z uporabo logistične regresije, kjer smo določili razmerje obetov (RO) in 95 % interval zaupanja (IZ).

Rezultati

Večina bolnic je bila obsevana z odmerkom 25×2 Gy (84, 83,2 %), ostale pa s $17 \times$ ali $18 \times 2,5$ Gy. Srednji čas spremljanja bolnic po obsevanju je bil 4,0 (2,6-5,4) leta. Pri 12 (11,9 %) bolnicah so se pojavili pozni neželeni učinki na koži stopnje 2 po lestvici CTCAE, 33 (32,7 %) bolnic pa je poročalo o poznih neželenih učinkih stopnje ≥ 2 po LENT-SOMA kriterijih. Povišan NT-proBNP smo ugotovili pri 36 (35,6 %) bolnicah, višji razred NYHA pri 17 (16,8 %) bolnicah, do poslabšanja LVEF pa je prišlo pri 9 (8,9 %) bolnicah.

Nosilci vsaj enega polimorfnege alela *PON1* rs854560 so imeli redkeje povišan NT-proBNP (RO = 0,34; 95 % IZ = 0,15-0,79; $p = 0,012$), tudi po prilagoditvi za starost ($p = 0,017$). Nosilci vsaj enega polimorfnege alela *PON1* rs662 pa so imeli v univariatni (RO = 4,44; 95 % IZ = 1,85-10,66; $p = 0,001$) in multivariatni ($p < 0,001$) analizi pogosteje povišan NT-proBNP. Nosilci vsaj enega polimorfnege alela *GSTP1* rs1695 so imeli v multivariatni analizi prav tako redkeje povišan NT-proBNP ($p = 0,026$), nosilci vsaj enega polimorfnege alela *CAT* rs1001179 pa v univariatni analizi ($p = 0,012$) in po prilagoditvi za hiperlipidemijo in indeks telesne mase ($p = 0,023$) večje tveganje za višji razred NYHA. Po prilagoditvi za hipertenzijo in sočasno zdravljenje s taksani so imeli nosilci vsaj enega polimorfnege alela *PON1* rs854560 ($p = 0,036$) ter vsaj enega polimorfnege alela *CAT* rs1001179 ($p = 0,049$) večje tveganje za pojav neželenih učinkov obsevanja na koži po kriteriju LENT-SOMA.

Nosilci dveh polimorfnih alelov *XRCC3* rs1799794 so imeli pogostejše pozne neželene učinke na koži (RO = 5,83; 95 % IZ = 1,22-28,00, $p = 0,028$), tudi po prilagoditvi za klinične dejavnike ($p = 0,014$). Nosilci vsaj enega polimorfnega alela *XRCC3* rs861539 pa so imeli redkeje neželene učinke na koži (RO = 0,43; 95 % IZ = 0,18-1,00, $p = 0,050$), vendar povezava v multivariatni analizi ni bila več statistično značilna ($p = 0,097$). Nosilci dveh polimorfnih alelov *RAD51* rs12593359 so imeli manjše tveganje za višji razred NYHA (RO = 0,09; 95 % IZ = 0,01-0,79; $p = 0,030$), tudi po prilagoditvi za klinične dejavnike ($p = 0,034$). Nosilci dveh polimorfnih alelov *RAD51* rs1801321 pa so imeli večje tveganje za višji razred NYHA v univariatni (RO = 10,0; 95 % IZ = 1,63-61,33; $p = 0,013$) in multivariatni analizi ($p = 0,027$).

Razprava

S pojavom poznih neželenih učinkov obsevanja na koži so bili v naši raziskavi statistično značilno povezani polimorfizmi *CAT*, *PONI* in *XRCC3*, s pojavom neželenih učinkov obsevanja na srcu pa polimorfizmi *PONI*, *CAT*, *GSTP1* ter *RAD51*.

V raziskavi smo identificirali nove genetske označevalce, povezane s poznimi neželenimi učinki zdravljenja z obsevanjem na koži in na srcu tudi po prilagoditvi za nekatere klinične dejavnike. To bi lahko pripomoglo k boljšemu razumevanju odgovora na zdravljenje in bolniku prilagojenemu zdravljenju pri bolnicah z rakom dojk.

Zahvala

Avtorice prispevka se zahvaljujemo vsem sodelavkam in sodelavcem OI, MF in UKC Lj, ki sodelujejo v raziskavi. Zahvaljujemo se tudi vsem bolnicam, ki so že ali pa še bodo privolile v sodelovanje v raziskavi in s tem omogočile raziskavo.

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

Literatura

1. Cardoso F, Kyriakides S, Ohno S, et al. Early breast cancer: ESMO Clinical Practice Guidelines for diagnosis, treatment and follow-up. *Ann Oncol* 2019; 30(10): 1194-220.
2. Kole AJ, Kole L, Moran MS. Acute radiation dermatitis in breast cancer patients: challenges and solutions. *Breast Cancer* (Dove Med Press). 2017; 9: 313-23.
3. Shunmoogam N, Naidoo P, Chilton R. Paraoxonase (PON)-1: a brief overview on genetics, structure, polymorphisms and clinical relevance. *Vasc Health Risk Manag* 2018; 14: 137-43.
4. Marinko T, Stojanov Konda JT, Dolžan V, et al. Genetic Variability of antioxidative mechanisms and cardiotoxicity after adjuvant radiotherapy in HER2-positive breast cancer patients. *Dis Markers*. 2020; 2020: 6645588.

NOVOSTI V KOMBINIRANEM ZDRAVLJENJU RAKA DANKE V DOBI PRECIZNE MEDICINE

Vaneja Velenik

Sektor radioterapije, Onkološki inštitut Ljubljana, Zaloška 2, 1000 Ljubljana, Slovenija

Elektronski naslov: vvelenik@onko-i.si

Uvod

Rak danke (RD) predstavlja približno 30 % vseh rakov debelega črevesa in danke (RDČD).

Večina bolnikov z RD, približno 50–60 %, ima ob postavitvi diagnoze lokalno in/ali področno napredovalo bolezen (LNRD), torej bolezen z visokim tveganjem za lokalno in/ali sistemsko ponovitev bolezni. Oddaljeni zasevki ostajajo vodilni vzrok smrti LNRD. Zavedanje vpliva posameznih dejavnikov na končni izid zdravljenja bolnika z LNRD je »iz ene medicine za vse« privedlo do stratificirane medicine, v kateri bolnike ločimo (tj. stratificiramo) glede na tveganje ponovitve bolezni in posledično temu izberemo terapijo. S poznavanjem značilnosti posameznega tumorja ter bolnikovih želja pa zdravljenje LNRD vstopa v ero personalizirane in precizne medicine.

Kdo potrebuje obsevanje in koliko?

Ameriške, Evropske in Slovenske smernice priporočajo predoperativno radiokemoterapijo (KRT) ali kratek režim obsevanja le pri bolnikih z LNRD. Cilj zdravljenja je tako lokalna kontrola kot tudi zmanjšanje stadija tumorja in tako večja možnost radikalne resekcije. Vedno bolj pa prihaja v ospredje potreba po zdravljenju, ki omogoča ohranitev organa. V ta namen potekajo raziskave, ki proučujejo vpliv definitivne radiokemoterapije oziroma samega obsevanja (raziskava Star-Trec) ali kombinacije obsevanja in lokalne elscizije pri zgodnjem stadiju bolezni (raziskava Tresar) (1, 2).

V kolikor je naš cilj obsevanja le lokalna kontrola bolezni, lahko enakovredno izbiramo med kratkim režimom obsevanja, ki ji v nekaj dneh sledi operacija ali KRT in operacijo z odlogom. Dve randomizirani raziskavi, ki sta primerjali oba načina, sta namreč dokazali, da med skupinama bolnikov ni bilo razlik v lokalni kontroli in preživetju (3, 4). V obeh pa so v roki s KRT beležili statistično značilno višji delež popolnih patohistoloških odgovorov. Zato, če je naš cilj morebitna ohranitev organa, je režim izbora KRT, saj je v primerjavi z njo tudi kratek režim z odlogom do operacije inferioren (6 % proti 16 %) (5).

Z namenom dviga deleža popolnih odgovorov in izogib operacije se preizkuša različne strategije intenzifikacije zdravljenja. Ena od preizkušanih je intenzifikacija obsevanja (Tabela 1) (6). Večina objavljenih raziskav, ki so potekale v letih 2000-2017, je bilo faz II in z doznim razponom 55-65 Gy. Prikazane so v Tabeli 1.

Tabela 1. Pregled raziskav z eskalacijo obsevalne doze

	Št. bolnikov	shema	EQD2 ($\alpha/\beta=10$)	Čas do op	pCR
Passoni et al. IJROBP 2013	25 (cT3N+)	45,6 Gy/18 fr + 5-FU/ox	47,8 Gy	9-19 ted	18 %
Zhou et al. Radiat Oncol 2014	78 (LNRD)	55 Gy/25 fr + capox + konsolid. capox	55,9 Gy	8 ted	24 %
Hernando-Requejo et al. Strahl Oncol 2014	74 (LNRD)	57,5 Gy/23 fr + cap	71,8 Gy	6-8 ted	31 %
Wang et al. Dis Colon rectum 2015	260 (LNRD)	50,6 Gy/22 fr + cap	51,9 Gy	6-16 ted	19 %
But-Hadzic et al. IJROBP 2016	51 (II-III)	T2/3 46,2/22 fr + cap T4 48,4 Gy/22 fr + cap	T2/3 46,6 Gy T4 49,2 Gy	6-8 ted	26 %
Alongi et al. Clin Transl Oncol 2017	40 (cT3N+)	60 Gy/30 fr + cap	60 Gy	8-12 ted	25 %
Lipatelli et al. Radiat Oncol 2017	76 (LNRD)	52,5-57,5 Gy/25 fr + cap	52,9-65,1 Gy	6-12 ted	22 %

Opozorila bi na našo raziskavo BISER Jasne But-Hadžić in sod., v kateri so bili bolniki z LNRD obsevani z intenzitetno moduliranim hipofrakcioniranim obsevanjem s sočasnim integriranim dodatkom doze in biološko ekvivalentno dozo (EQD2), nižjo kot v večini vključenih raziskav. Delež pCR je bil 26 %, znižanje stadija T, N in celokupnega stadija pa 68 %, 83 % in 87-odstoten. Uspešnost zdravljenja potrjujejo pravkar objavljeni 5-letni rezultati: celokupno preživetje 81 %, preživetje brez bolezni 75 % in lokalna kontrola 95 %. V podskupini bolnikov s pCR je bil izid zdravljenja še boljši: celokupno preživetje 92 %, preživetje brez bolezni in lokalna kontrola pa kar 100 % (7, 8).

Kdo potrebuje kompletno neoadjuvantno zdravljenje (angl. Total Neoadjuvant Therapy-TNT)?

TNT je intenzifikacija neoadjuvantnega zdravljenja, pri katerem je poleg KRT vsa kemoterapija (KT) umeščena v čas pred operacijo. Vse zgoraj omenjene smernice jo priporočajo pri bolnikih z visokim tveganjem za lokalno in/ali sistemsko ponovitev bolezni. Nekoliko se razlikujejo se po opredelitvi dejavnikov tveganja, predvsem pa po zaporedju samih modalitet in režimu obsevanja. Ameriške priporočajo indukcijsko KT s kapecitabinom ali 5-fluorouracilom in platino (shema FOLFOX/CAPOX), ki ji sledi KRT, evropske pa kratek režim RT in KT v konsolidacijskem obdobju. Slednjo shemo so pred dobrim letom sprejele tudi ameriške in dodale še shemo indukcijske KT pred kratkim režimom RT. V zadnji izdaji so razširili indikacije za TNT, pri tumorjih T4N+ pa priporočili indukcijsko KT z dodanim irinotekanom (shema FOLFOXIRI). Naša priporočila vsebujejo KRT (privzeto po raziskavi BISER) in kombinacijo indukcijske in konsolidacijske KT. Najpomembnejše ugotovitve nedavno objavljenih rezultatov primerjave te sheme s klasičnim zdravljenjem (KRT, operacija in adjuvantna KT) pri bolnikih z visokim tveganjem za ponovitev bolezni (T4, N2, zajetost mezorektalne fascije ali prisotnost ekstramuralne venske invazije), so povzete v tabeli (Tabela 2). V primerjavi s klasično predoperativno kemoradioterapijo je zdravljenje s TNT učinkovitejše, saj s tem pristopom in ob uporabi prej omenjenih naprednih obsevalnih tehnik dosegamo višji delež pCR (v 32 %), boljšo complianco pri sistemski kemoterapiji, ugodnejšo prognozo

preživetja, višjo stopnjo znižanja stadija tumorja in bezgavk, višji delež radikalnih resekcij in krajši čas do zapore stome ob primerljivi celokupni toksičnosti in nižji toksičnosti stopnje 3 ali več (9).

Tabela 2. Najpomembnejše statistično značilne razlike med KRT in TNT v naši raziskavi

statistično značilne razlike	KRT	TNT 4×KT + KRT + 2×KT
Akutna toksičnost G3-5	14 %	3 %
komplianca	68 %	89 %
APE	21 %	17 %
pCR	17 %	32 %
Pooperativni zapleti	39 %	24 %
Čas do zapore stome	33 dni	20 dni

APE - apdominoperinealna resekcija; PCR - popolni patohistološki odgovor

V primerjavi z edino do sedaj objavljeno raziskavo TNT zdravljenja pri bolnikih z visokim tveganjem za ponovitev bolezni RAPIDO, v kateri so bili bolniki deležni kratkega režima RT in konsolidacijske KT, je naše TNT zdravljenje glede deleža pCR (32 % proti 28 %), akutne toksičnosti (3 % proti 48 %), deleža operacij z ohranitvijo sfinktra (83 % proti 42 %), compliance pri sistemskem zdravljenju (89 % proti 67 %), deležu pCR (32 % proti 28 %) in deležu pooperativnih zapletov (24 % proti 50 %) učinkovitejše in tudi manj toksično (10). Rezultati kratkoročnih preživetvenih parametrov naše raziskave bodo lahko izvedene v kratkem, saj mineva 2 leti od zdravljenja še zadnjih vključenih bolnikov.

Izsledki nemške randomizirane raziskave faze II, v kateri so primerjali induksijsko s konsolidacijsko KT pri bolnikih z RD stadijev II in III (raziskava CIAO/ARO/AIO-12), nakazujejo, da je shema TNT s konsolidacijsko KT učinkovitejša (delež pCR 25 % proti 17 %) ter manj toksična (G3 akutna toksičnost 27 % proti 37 %) (11). V prid konsolidacijski shemi pričajo tudi delni izsledki randomizirane raziskave faze III (Organ preservation in Rectal Cancer - OPRA), saj je bil delež bolnikov z ohranjeno danko 58 % v primerjavi z induksijsko, kjer je bil 43-odstoten (12). Glede preživetja brez bolezni in preživetja brez pojava metastaz sta bila pristopa primerljiva.

Objavljene potencialne prednosti TNT s konsolidacijsko KT so nas spodbudile k novi raziskavi faze II »pick the winner«, v kateri bomo ob KRT (shema po raziskavi BISER) v eni od podanaliz primerjali učinkovitost našega standardnega TNT s tistim, pri katerem bo vsa KT v konsolidacijskem obdobju (raziskava IKONA).

Neoperativni pristop pri bolnikih s cCR

Po TNT pri tretjini bolnikov dosežemo cCR. Neoperirani bolniki imajo tudi brez definitivne operacije primerljivo lokalno kontrolo in preživetje kot operirani s pCR,

ob odličnem funkcionalnem izidu in kakovosti življenja. Metaanalize in podatki mednarodnih registrov navajajo lokalno ponovitev bolezni 15-25 % bolnikov, od tega jih je večina rešljiva z operacijo. Preživetje brez bolezni je 81-89 % in celokupno preživetje 84-94 % (13, 14).

Vendar pa klinični, s slikanjem z magnetno resonanco (MR) ocenjen cCR ni vedno skladen pCR, zato bi bile nujno potrebne dodatne metode, ki bi pomagale prepoznati tiste bolnike z resničnim popolnim odgovorom, da bi se lahko izognili nepotrebni operaciji in z njo povezanimi morebitnimi zapleti. Z nedavno razvito tehnologijo tekočinske biopsije za pridobitev in karakterizacijo cirkulirajoče tumorske deoksiribonukleinske (ctDNA) iz preprostega odvzema periferne krvi, v kombinaciji z napredno tehniko slikanja z MR bi tako lahko pridobili podatke o heterogenosti tumorskega genoma pred in med zdravljenjem, hitreje ocenili odziv na neoadjuvantno in adjuvantno terapijo, zaznavali nastajajočo odpornost na zdravila/terapijo in zaneslivejše ocenili cCR. Rezultati maloštevilnih do sedaj objavljenih študij potrjujejo, da je zaznavanje ctDNA po zaključenem zdravljenju RD tudi zanesljiv slab napovedni dejavnik ponovitve in razsoja bolezni. Pilotno raziskavo, s katero želimo proučiti vrednost ctDNA za oceno cCR in napovedno vrednost za preživetje bolnikov, zdravljenih s TNT, smo zastavili tudi na Onkološkem inštitutu. Žal nam omejena finančna sredstva trenutno ne dopuščajo njenega pričetka.

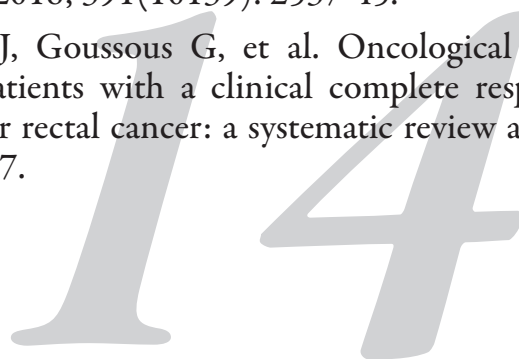
Zaključek

Zdravljenje LNRD vstopa v obdobje precizne medicine in postaja vedno bolj zapleteno. Stratifikacija bolnikov v podskupine in s smernicami priporočenim zdravljenjem se bo v naslednjih letih sicer nadaljevala, vendar pa se bo število dejavnikov, na osnovi katerih bomo bolnike stratificirali in število možnih kombinacij zdravljenja, ki jih bomo lahko bolniku ponudili, strmo povečevalo. Spoznavamo nove prognostične dejavnike za ocenjevanje stadija tumorja (z magnetno resonanco potrjena ekstramuralna venska invazija, cirkulirajoča tumorska DNA, mikrobiomski test črevesa) in napovednike odgovora tumorja na zdravljenje (genetski markerji; tkivni molekularni markerji - KRAS, BRAF mutacije, mikrosatelitna nestabilnost; difuzijsko obtežena magnetna resonanca; organoidi). Poleg tega tehničnega napredka pa postaja vse pomembnejše mnenje vsakega posameznega bolnika, kakšno zdravljenje si želi in kaj od njega lahko pričakuje.

Literatura

1. Rombouts AJM, Al-Najami I, Abbott NL, et al. Can we Save the rectum by watchful waiting or Trans Anal microsurgery following (chemo) Radiotherapy versus Total mesorectal excision for early REctal Cancer (STAR-TREC study)?: protocol for a multicentre, randomised feasibility study. *BMJ Open* 2017; 7(12): e019474.
2. Borstlap WA, Tanis PJ, Koedam TW, et al. A multi-centred randomised trial of radical surgery versus adjuvant chemoradiotherapy after local excision for early rectal cancer. *BMC Cancer* 2016; 21: 16:513.
3. Bujko K, Nowacki MP, Nasierowska-Guttmejer A, et al. Long-term results of a randomized trial comparing preoperative short-course radiotherapy with preoperative conventionally fractionated chemoradiation for rectal cancer. *Br J Surg* 2006; 10: 1215-23.

4. Ngan SY, Burmeister B, Fisher RJ, et al. Randomized Trial of Short-Course Radiotherapy Versus Long-Course Chemoradiation Comparing Rates of Local Recurrence in Patients With T3 Rectal Cancer: Trans-Tasman Radiation Oncology Group Trial 01.04. *JCO* 2021; 30: 3827-33.
5. Hoendervangers S, Couwenberg AM, Intwen MPW, et al. Comparison of pathological complete response rates after neoadjuvant short-course radiotherapy or chemoradiation followed by delayed surgery in locally advanced rectal cancer. *EJSO* 2018; 44: 1013-7.
6. Burbach JP, den Harder AM, Intven M, et al. Impact of radiotherapy boost on pathological complete response in patients with locally advanced rectal cancer: a systematic review and meta-analysis. *Radiother Oncol* 2014; 113 (1): 1-9.
7. But-Hadzic J, Anderluh F, Breclj E, et al. Acute Toxicity and tumor response in locally advanced rectal cancer after preoperative chemoradiation therapy with shortening of the overall treatment time using intensity-modulated radiation therapy with simultaneous integrated boost: a phase 2 trial. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 2016; 96: 1003-10.
8. But-Hadzic J, Meden Boltezar A, Skerl T, et al. Preoperative intensity-modulated chemoradiotherapy with simultaneous integrated boost in rectal cancer: five-year follow-up results of a phase II study. *Radiol Oncol* 2021 (accepted for publication).
9. Tuta M, Boc N, Breclj E, et al. Total neoadjuvant therapy vs standard therapy of locally advanced rectal cancer with high-risk factors for failure. *World J Gastrointest Oncol* 2021; 13: 119-30.
10. Bahadoer RR, Dijkstra EA, van Etten B, et al. Short-course radiotherapy followed by chemotherapy before total mesorectal excision (TME) versus preoperative chemoradiotherapy, TME, and optional adjuvant chemotherapy in locally advanced rectal cancer (RAPIDO): a randomised, open-label, phase 3 trial. *Lancet Oncol* 2021; 22: 29-42.
11. Fokas E, Allgäuer M, Polat B, et al. Randomized Phase II Trial of Chemoradiotherapy Plus Induction or Consolidation Chemotherapy as Total Neoadjuvant Therapy for Locally Advanced Rectal Cancer: CAO/ARO/AIO-12. *J Clin Oncol* 2019; 37: 3212-22.
12. Garcia-Aguilar J, Patil S, Kim JK, et al. Preliminary results of the organ preservation of rectal adenocarcinoma (OPRA) trial. *J Clin Oncol* 2020; 38: suppl abstr 4008.
13. Vander Valk MJM, Hilling DE, Bastiaannet E, et al. Long-term outcomes of clinical complete responders after neoadjuvant treatment for rectal cancer in the International Watch & Wait Database (IWWD): an international multicentre registry study. *Lancet* 2018; 391(10139): 2537-45.
14. Dattani M, Heald RJ, Goussous G, et al. Oncological and Survival outcomes in watch and wait patients with a clinical complete response after neoadjuvant chemoradiotherapy for rectal cancer: a systematic review and pooled analysis. *Ann Surg* 2018; 268: 955-67.



PREGLED ZDRAVLJENJA S HIPERBARIČNO OKSIGENACIJO PO OBSEVANJU MEDENICE – DOSEDANJE IZKUŠNJE

Helena Barbara Zobec Logar, Ana Perpar

Sektor radioterapije, Onkološki inštitut Ljubljana, Zaloška 2, 1000 Ljubljana, Slovenija

Elektronski naslov: hlogar@onko-i.si

Izvleček

Namen raziskave: Z raziskavo smo želeli oceniti varnost in učinkovitost zdravljenja s hiperbarično oksigenacijo (HBO) pri poškodbah po obsevanju medenice.

Materiali in metode: V raziskavo smo vključili 23 bolnikov. Stopnjo težav pred in po zdravljenju s HBO smo ocenili z vprašalnikom EPIC in lestvico CTCAE v5.0. Uspešnost zdravljenja smo ocenili glede na spremembe v stopnji težav pred in po zdravljenju.

Rezultati: Pri 19-ih bolnikih (82,6 %) je prišlo do izboljšanja simptomov po lestvici CTCAE v5.0, pri devetih bolnikih (39,1 %) so težave povsem izginile, pri štirih bolnikih (17,4 %) pa nismo ugotovili izboljšanja. Največji vpliv (sprememba stopnje po vprašalniku EPIC za 2) je imelo zdravljenje na zmanjšanje hematohezije, bolečine, hematurije, in frekvence uriniranja.

Zaključek: Zdravljenje s HBO predstavlja dodatno možnost zdravljenja kroničnih okvar črevesja in mehurja, nastalih po obsevanju medenice.

Ključne besede: hiperbarična oksigenacija, radiocistitis, radioproktitis, kronične posledice obsevanja

Uvod

Moderne tehnike obsevanja so pomembno pripomogle k zmanjšanju stranskih učinkov zdravljenja. Pri obsevanju medenice je možnost nastanka pomembnejših stranskih učinkov še vedno nezanimljiva, saj gre za agresivno zdravljene bolnike, pri katerih pričakujemo dolgotrajno preživetje. Pozne posledice se lahko razvijejo že znotraj 3-6 mesecev po zaključku zdravljenja: te so opredeljene kot zgodnje pozne posledice. Večinoma pa nastanejo okvare več let, običajno 2-3 leta po zaključku zdravljenja. Incidenca kroničnega simptomatskega cistitisa je ocenjena na 5-10 %, kroničnega hemoragičnega proktitisa pa na 1-5 % (1-3). Kronični radiocistitis opredeljuje skupek več simptomov in znakov kot so: dizurija, polakisurija, urgenca, inkontinenca, bolečina pri uriniranju; najbolj patognomoničen znak je rekurentna hematurija. Kronični radioproktitis poleg hematohezije spremljajo še povečano izločanje sluzi, krči, proktalgija, spremenjena konsistenca blata, povečana frekvenca odvajanj in fekalna inkontinenca. Nastanek poznih posledic obsevanja je odvisen od doze, volumna obsevanih tkiv, načina frakcionacije in obsevalne tehnike. Dodatni dejavniki tveganja so pridružene bolezni, kot so npr. sladkorna bolezen, uporaba antikoagulantne terapije, arterijska hipertenzija, dodatno operativno zdravljenje in uporaba sočasne kemoterapije.

Zdravljenje s 100 % kisikom s pomočjo hiperbarične komore je edino vzročno zdravljenje, ki je na voljo za zdravljenje kroničnih poobsevalnih poškodb. 100 % kisik naj bi z izboljšano oksigenacijo prizadetih tkiv vplival na angiogenezo, celjenje in manjšo možnost okužbe ran, kratkotrajna vazokonstrikcija pa naj bi prispevala h kontroli

aktivne krvavitve (1, 2). Randomiziranih raziskav s področja zdravljenja radiocistitisa in radioproktitisa s hiperbarično oksigenacijo (HBO) je malo. Shao s sodelavci ni dokazal bistvenega izboljšanja hemoragičnega radiocistitisa s HBO v primerjavi z instalacijo hialuronske kisline (4). V raziskavi RICH-ART je prišlo do izboljšanja simptomatike kroničnega radiocistitisa zmerne stopnje (5). S področja radioproktitisa sta bili objavljeni dve randomizirani raziskavi, HORTIS in HOT2, z nasprotujočimi si rezultati (6, 7). Kasnejša meta-analiza je potrdila potencialno vlogo HBO pri lažšanju težav kronične ga radioproktitisa (8). Učinkovitost zdravljenja s HBO, opredeljena s številom bolnikov, ki jih je potrebno zdraviti, da koristimo enemu bolniku (NNT - število, potrebnih za zdravljenje, angl. number needed to treat), je pri radioproktitisu in radiocistitisu približno 3 (6, 9).

Materiali in metode

V raziskavo smo vključili bolnike po obsevanju medenice. Indikacije za zdravljenje s HBO so bile: radioproktitis, radiocistitis in postradiacijski analni mukozitis z ulkusom. Pred zdravljenjem je bilo potrebno izključiti ponovitev bolezni, bolnike s kronično obstruktivno pljučno boleznijo pa napotiti k pulmologu za oceno sposobnosti za zdravljenje s 100 % kisikom. Bolniki so poleg kliničnega pregleda in osnovnih laboratorijskih preiskav za izključitev drugih možnih vzrokov za težave opravili še cistoskopijo in rektoskopijo ali kolonoskopijo. Stopnja težav je bila ocenjena pred in po zdravljenju s HBO: subjektivno, z anamnezo oziroma vprašalnikom (EPIC, angl. *The Expanded Prostate Cancer Index Composite*), in objektivno z lestvico CTCAE v5.0 (angl. *Common Terminology Criteria for Advers Events verzija 5.0*). Uspešnost zdravljenja s HBO smo ocenili glede na razliko v stopnji težav pred in po zdravljenju za različne opazovane parametre, povezane z odvajanjem blata in vode kot so: inkontinenca, hematohezija, bolečina, urgenca, frekvenca, konsistenca blata, inkontinenca, hematurija, dizurija, velikost curka urina. Zdravljenje je potekalo v Centru za baromedicino Medicinske fakultete v Ljubljani. 100 % kisik so bolniki vdihavali preko maske pri povišanem zračnem tlaku, ki je bil za 1,4 do 1,5 bara višji od normalnega. Terapija ali potop (dihanje) je trajala običajno 90 minut. Raziskava je bila odobrena s strani Komisije za etiko in strokovno oceno protokolov kliničnih raziskav (ERID-KESOPKR/59) in Komisije za medicinsko etiko (MZ 0120-251/2016-4 KME 92-93/06/16, 27/09/16).

Rezultati

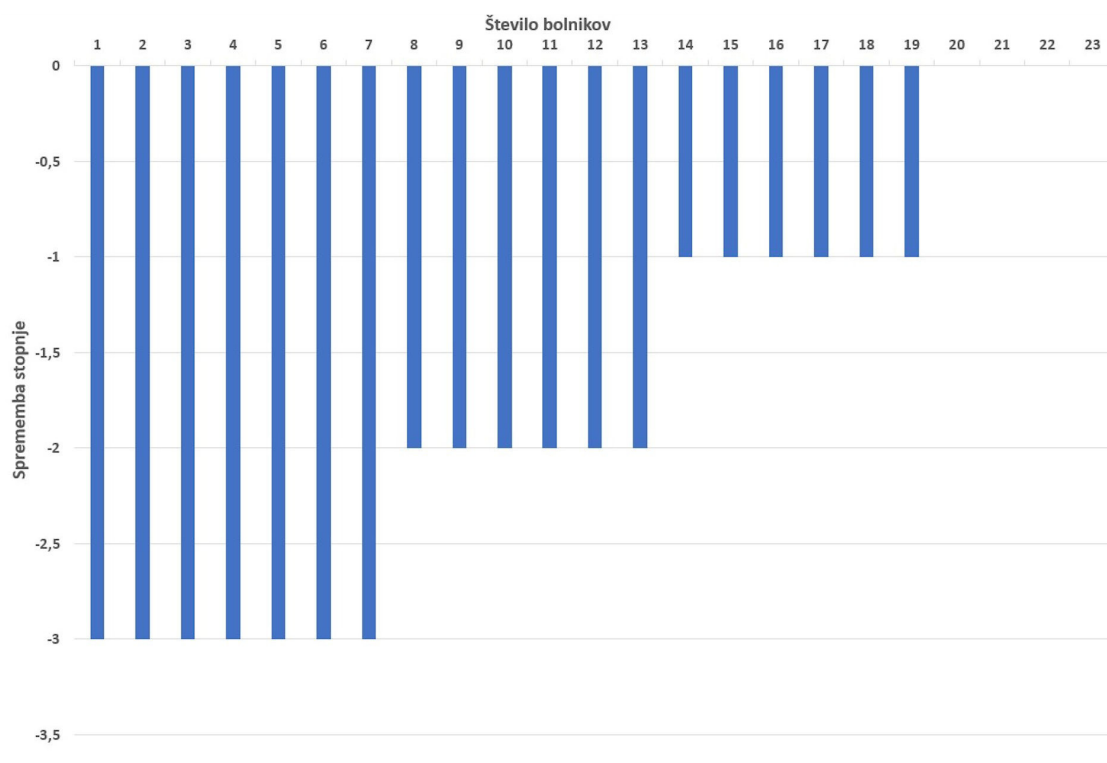
V raziskavo smo vključili 23 bolnikov po obsevanju medenice. Značilnosti vključenih bolnikov so predstavljene v tabeli 1. Težave po obsevanju so se pojavile po srednjem času 15,1 meseca (rang 2-72) po zaključku zdravljenja. Vsi bolniki z izjemo dveh so predhodno že prejeli eno izmed oblik simptomatskega zdravljenja: pri hemoragičnem proktitisu največkrat budenozid ali mesalazin, redkeje koagulacijo z argonsko plazmo, ki sodi med invazivne posege, pri hemoragičnem cistitisu pa hialuronsko kislino z/brez antibiotične terapije. Srednji čas od nastopa simptomov do pričetka zdravljenja v hiperbarični komori je znašal 23,2 meseca (rang 4-62), srednje število potopov pa je bilo 40. Šestim bolnikom so se po prvem sklopu zdravljenja težave ponovile, pet jih je zdravljenje ponovilo dvakrat, en bolnik pa štirikrat.

Tabela 1. Značilnosti vključenih bolnikov

Spremenljivka		N	SD/min-max	
Starost (leta)		70,3	12,1	
Starost ob nastopu težav (leta)		65,4	12,4	
Spol	moški	19		
	ženski	4		
Vrsta raka	prostata	14		
	maternični vrat	4		
	maternica	1		
	danka	1		
	zadnjik	3		
Pridružene bolezni/zdravila	kajenje	8		
	arterijska hipertenzija	8		
	sladkorna bolezen	3		
	kronična atrijska fibrilacija	1		
	antikoagulantna terapija	1		
	antiagregacijska terapija	4		
Obsevanje	teleradioterapija	21		
	brahiterapija	2		
	teleradioterapija+brahiterapija	7		
	EQD2 (Gy) (10)*	71,2	17,7	
	EQD2 danka (Gy) $\alpha\beta$ 3*	61,9	8,0	
EQD2 mehur (Gy) $\alpha\beta$ 3*	65,9	5,7		
Dodatno zdravljenje	operativni poseg	9		
	kemoterapija	4		
Čas	od zaključka obsevanja do pojavov simptomov (mesece)	17,2	15,3	
	od zaključka obsevanja do zdravljenja v HBK (mesece)	40,4	20,9	
	od pojava simptomov do zdravljenja v HBK (mesece)	23,2	15,7	
Vzrok težav	radiocistitis	5		
	radioproktitis	19		
	postradiacijski analni mukozitis z ulkusom	3		
Preiskave pred HBK	rektoskopija/kolonoskopija	18		
	cistoskopija	2		
Zdravljenje pred HBK	budenozyd, mesalazin	18		
	hialuronska kislina, kortikosteroid	1		
	argon laser	6		
	hidrokortizonska klizma	3		
	krioterapija	1		
	drugo (antibiotik, krioterapija, protibolečinska terapija)	3		
Zdravljenje s HBK	število potopov (mediana)	40	25-154	
	število ponovitev (mediana)	1	1-4	
Stopnja simptomov po CTCAE**	pred HBK (mediana)	3	1-4	
	po HBK (mediana)	1	0-3	
	sprememba stopnje	2	0-3	
Sprememba stopnje simptomov po EPIC*** (mediana)	danka	inkontinenca	0	0-2
		krvavitev	2	1-3
		bolečina	2	1-2
		urgenca	0	0-3
		frekvenca	1	0-1
	mehur	konsistenca	0	0
		inkontinenca	0	0-3
		krvavitev	2	2
		dizurija	2	2
		urgenca	1,5	0-3
frekvenca	2	1-3		
curek urina	1	1-3		

N - število, povprečje, mediana; SD - standardna deviacija, min-max - najmanjša-največja vrednost; HBK - hiperbarična komora; $\alpha\beta$ 2(10)* - $\alpha\beta$ 2 za prostato, 10 za ostale tumorje, 3 za kritične organe (mehur, danka); CTCAE v5.0 - angl. Common Terminology Criteria for Advers Events verzija 5.0; EPIC - angl. The Expanded Prostate Cancer Index Composite

Pri 19-ih bolnikih (82,6 %) je prišlo do izboljšanja simptomov, pri šestih (26,1 %) za eno, šestih (26,1 %) za dve in sedmih (30,4 %) za tri stopnje po CTCAE v5.0. Pri štirih bolnikih (17,4 %) smo opazili stagnacijo simptomov (slika 1). Izmed štirih bolnikov, ki niso odgovorili na zdravljenje, je en bolnik pričel zdravljenje s HBO 62 mesecev po nastopu simptomov, drugi bolnik je bil napoten na HBO zaradi zgodnjih kroničnih težav 17 mesecev po obsevanju, tretja bolnica je predčasno zaključila zdravljenje po 25-ih potopih zaradi stenokardije in težav z dihanjem, pri zadnjem bolniku pa je bil 3 mesece po zdravljenju s HBO ugotovljen lokoregionalen progres bolezni. Pri devetih bolnikih (39,1 %) so po zdravljenju s HBO težave povsem izzvenele (srednji čas od zaključka HBO do izboljšanja simptomov 4,7 meseca, rang 0-12). Zdravljenje s HBO je bilo uspešno tudi pri dveh bolnikih, ki sta pričela zdravljenje 6 let po zaključku obsevanja. Učinek zdravljenja je bil statistično neznačilno boljši, če smo z zdravljenjem pričeli znotraj dveh let po nastopu težav ($p = 0.16$). Bolniki so z vprašalnikom EPIC ocenili zmanjšanje za 2 stopnji pri naslednjih simptomih: hematohezija in bolečina pri defekaciji, hematurija, dizurija in frekvenca uriniranja. Težave so izzvenele po srednjem času 2 mesecev (rang 0-15) po zdravljenju, pri enem bolniku je prišlo do izboljšanja že med zdravljenjem s HBO.



Slika 1. Sprememba v stopnji simptomov po CTCAE v5.0 pred in po zdravljenju s hiperbarično oksigenacijo pri posameznih bolnikih

Dva bolnika sta imela med potopi težave, eden s tiščanjem za prsnico in težkim dihanjem, drugi v obliki epileptičnega napada. Po zaključku zdravljenja sta kontrolni cistoskopija in rektoskopija pri bolnikih z odgovorom na zdravljenje s HBO pokazali na mestu predhodnih ulkusov zabrazgotinjeno sluznico, z neenakomerno, a manj vulnerabilno žilno risbo blagega proktitisa ali cistitisa.

Razprava

HBO predstavlja eno izmed možnosti zdravljenja poškodb po obsevanju medenice. Pred pričetkom zdravljenja s HBO je smiselna uporaba neinvazivnih metod zdravljenja, kot so hialuronska kislina pri hemoragičnem cistitisu oziroma budenozid in mesalazin pri hemoragičnem proktitisu. Te omogočajo takojšen in cenovno sprejemljiv pričetek zdravljenja na domu. Po nekaterih raziskavah naj bi takšno zdravljenje trajalo najmanj tri mesece (7). Po HBO smo izboljšanje simptomov dosegli pri 82,6 % bolnikov. V primerjavi z drugimi raziskavami je ta odstotek primerljiv in celo nekoliko višji (5, 10). Težave so povsem izvenele pri 39,1 % bolnikov, najpogosteje znotraj treh mesecev po zaključku zdravljenja, kar je skladno z ugotovitvami drugih raziskav (5). Večji učinek zdravljenja lahko pričakujemo, če pričnemo zdraviti dovolj zgodaj, ko še ni prišlo do nastanka čvrste fibroze, ki zmanjšuje učinek 100% kisika. V naši raziskavi, podobno kot v nekaterih drugih, tega nismo potrdili, saj je bil pozitiven učinek zdravljenja ugotovljen tudi pri bolnikih, ki so pričeli z zdravljenjem 6 let po zaključku obsevanja (4, 5). Učinek na zdravljenje je bil statistično neznačilno boljši, če smo k zdravljenju pristopili znotraj dveh let po nastopu simptomov. Zdravljenje s HBO se lahko ponovi, v kolikor se težave ponovno pojavijo. Druge raziskave zdravljenja radiacijskega cistitisa s HBO so prav tako potrdile pozitiven vpliv na hematurijo, dizurijo in frekvenco uriniranja (4, 10). V naši skupini je samo pri enem bolniku tri mesece po zdravljenju s HBO prišlo do progressa tumorja. Ostale raziskave do sedaj niso potrdile vzročne povezave med HBO in večjo možnost progressa tumorja na račun neovaskularizacije in/ali tvorbe prostih radikalov (4, 6). Slabost naše raziskave je brez dvoma majhno število vključenih bolnikov, kar onemogoča podrobnejšo statistično analizo. V naši raziskavi tudi nismo ovrednotili možnega placebo učinka in spontanega izboljšanje simptomov, ki ga omenjajo nekatere randomizirane dvojno slepe raziskave (5, 6).

Kljub izboljšanju obsevalnih tehnik in zmanjšanju stranskih učinkov zdravljenja, je v bodoče pričakovati porast potrebe po tovrstnem zdravljenju na račun pogostejših ponovnih obsevanj (re-iradiacij), ki jih omogočajo napredne obsevalne tehnike.

Zahvala

Prof. dr. Žarku Finderletu, dr. med. z Inštituta za fiziologijo Medicinske fakultete v Ljubljani, kjer poteka zdravljenje s hiperbarično komoro, za tvorno sodelovanje, posredovanje podatkov o potopih in fotografij hiperbarične komore.

Literatura

1. Helissey C, Cavallero S, Brossard C, et al. Chronic inflammation and radiation-induced cystitis: molecular background and therapeutic perspectives. *Cells* 2020; 10(1): 1-20.
2. Paquette IM, Vogel JD, Abbas MA, et al. The American society of colon and rectal surgeons clinical practice guidelines for the treatment of chronic radiation proctitis. *Dis Colon Rectum* 2018; 61(10): 1135-40.
3. Nelamangala Ramakrishnaiah VP, Krishnamachari S. Chronic haemorrhagic radiation proctitis: A review. *World J Gastrointest Surg* 2016; 8(7): 483-91.
4. Shao Y, Lu GL, Shen ZJ. Comparison of intravesical hyaluronic acid instillation and

hyperbaric oxygen in the treatment of radiation-induced hemorrhagic cystitis. *BJU* 2012; 109(5): 691-4.

5. Oscarsson N, Müller B, Rosén A, et al. Radiation-induced cystitis treated with hyperbaric oxygen therapy (RICH-ART): a randomised, controlled, phase 2–3 trial. *Lancet Oncol* 2019; 20(11): 1602-14.
6. Clarke RE, Tenorio LMC, Hussey JR, et al. Hyperbaric oxygen treatment of chronic refractory radiation proctitis: a randomized and controlled double-blind crossover trial with long-term follow-up. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 2008; 72(1): 134-43.
7. Glover M, Smerdon GR, Andreyev HJ, et al. Hyperbaric oxygen for patients with chronic bowel dysfunction after pelvic radiotherapy (HOT2): A randomised, double-blind, sham-controlled phase 3 trial. *Lancet Oncol* 2016; 17(2): 224-33.
8. Yuan JH, Song LM, Liu Y, et al. The effects of hyperbaric oxygen therapy on pelvic radiation induced gastrointestinal complications (Rectal bleeding, Diarrhea, and pain): A meta-analysis. *Front Oncol* 2020; 10: 1-14.
9. Clarke R. Radiation-induced cystitis and hyperbaric oxygen therapy. *Lancet Oncol* 2019; 20(12):e660.
10. Oscarsson N, Arnell P, Lodding P, et al. Hyperbaric oxygen treatment in radiation-induced cystitis and proctitis: A prospective cohort study on patient-perceived quality of recovery. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 2013; 87(4): 670-5.

VLOGA RADIOMIKE V NAPOVEDOVANJU UČINKOVITOSTI ZDRAVLJENJA Z IMUNOTERAPIJO PRI BOLNIKI Z RAKOM PLJUČ

Martina Vrankar¹, Damijan Valentinuzzi^{2,3}, Nina Boc¹, Mojca Unk¹

¹ Onkološki inštitut Ljubljana, Zaloška cesta 2, 1000 Ljubljana, Slovenija

² Fakulteta za matematiko in fiziko, Univerza v Ljubljani, Jadranska ulica 19, 1000 Ljubljana, Slovenija

³ Institut Jožef Stefan, Jamova cesta 39, 1000 Ljubljana, Slovenija

Izvleček

V raziskavi smo proučevali vlogo kvantitativnih lastnosti posnetkov ¹⁸F-FDG PET in ugotovili, da je iRADIOMICS obetajoč slikovni biološki označevalec, ki bolje napove odgovor na zdravljenje s pembrolizumabom pri bolnikih z razsejanim nedrobnoceličnim rakom pljuč kot standardne metode.

Uvod

Rak pljuč je tretji najpogostejši rak v Sloveniji in najpogostejši vzrok smrti zaradi raka. Leta 2017 je na novo zbolelo 1457 bolnikov; pri 80 % bolnikov smo potrdili nedrobnocelični rak pljuč (NDPR), 50 % bolnikov pa je imelo ob diagnozi razsejano bolezen (1). Pri bolnikih z razsejanim NDPR brez izraženih mutacij, se je v zadnjih letih v prvi liniji za učinkovito pokazala imunoterapija z zaviralci imunskih kontrolnih točk (ICI) kot monoterapija ali pa v kombinaciji s kemoterapijo (2). Kljub temu, da molekularni označevalec PD-L1 ni napovedni dejavnik odgovora na zdravljenje z ICI, nam njegova izraženost pomaga pri izboru bolnikov, ki bodo imeli največjo dobrobit od zdravljenja. Radiološki odziv na ICI je drugačen kot pri klasični sistemski terapiji, zato se trenutno uporablja kriterije iRECIST (immune response evaluation criteria in solid tumors) (3). Zaradi pomanjkljivosti se raziskuje druge neinvazivne slikovne biološke označevalce, s katerimi bi lahko zgodaj napovedali, kateri bolniki na zdravljenje ne bodo odgovorili. Hitro razvijajoče se področje analize medicinskih slik, tako imenovana "radiomika", je pristopila k problemu z računanjem številnih kvantitativnih lastnosti (t.i. teksturnih metrik) iz slik, pridobljenih z različnimi vrstami medicinskega slikanja (4). Radiomska analiza omogoča vpogled v skrite informacije o tumorju, ki navadno očem niso vidne, kot npr. informacijo o prostorski heterogenosti slikanih tumorjev. ¹⁸F-fluorodeoksiglukoza pozitronska emisijska tomografija/računalniška tomografija (¹⁸F-FDG PET CT) je standardna preiskava v diagnostiki pljučnega raka, oceni odziva na terapijo in načrtovanju obsevanja. Z uporabo ¹⁸F-FDG PET CT kot napovednega biomarkerja zdravljenja z ICI se raziskuje prostorska heterogenost, za katero se predpostavlja, da odgovarja dejanski biološki heterogenosti tumorja, kot je npr. heterogenost v tumorskem fenotipu in genotipu (5). Trenutno ni standardiziranih metod za izbiro radiomskih metrik z največjo napovedno močjo iz celotne skupine obstoječih, prav tako pa ni standardov za poročanje in ocenjevanje dobljenih rezultatov.

Namen naše raziskave je bilo proučiti, ali radiomske značilnosti slik ¹⁸F-FDG PET pri bolnikih z razsejanim NDPR, ki jih zdravimo z ICI, napovedo odgovor na zdravljenje natančneje od trenutnih tumorskih označevalcev, ki jih uporabljamo v klinični praksi (7).

Materiali in metode

Od januarja 2017 do marca 2019 smo vključili 30 bolnikov z razsejanim NDPR, ki so pričeli zdravljenje s pembrolizumabom. Vsi bolniki so imeli opravljen ^{18}F -FDG PET/CT pred začetkom zdravljenja ter en in štiri mesece po pričetku zdravljenja. Bolniki s celokupnim preživetjem (OS) > 14,9 meseca so bili opredeljeni kot odzivniki. Izbrani prag je bilo mediano preživetje v multicentrični raziskavi KEYNOTE-010 (podskupina bolnikov z NSCLC s PD-L1 > 50%, zdravljeni z odmerkom pembrolizumaba 2 mg/kg) (6). Analizirali smo povezave šestih robustnih radiomskih metrik (2 volumetrični in 4 teksturne) primarnih tumorjev z OS, za kar smo uporabili Mann-Whitney U-test, Coxovo regresijsko analizo in analizo krivulje ROC. iRADIOMICS smo oblikovali na podlagi univariatnega in multivariatnega logističnega modela z najbolj obetajočimi metrikami. Napovedno moč iRADIOMICS smo primerjali z napovedno močjo deleža tumorskih celic z izraženim PD-L1 ter s kriteriji iRECIST, za kar smo uporabili analizo krivulje ROC.

Rezultati

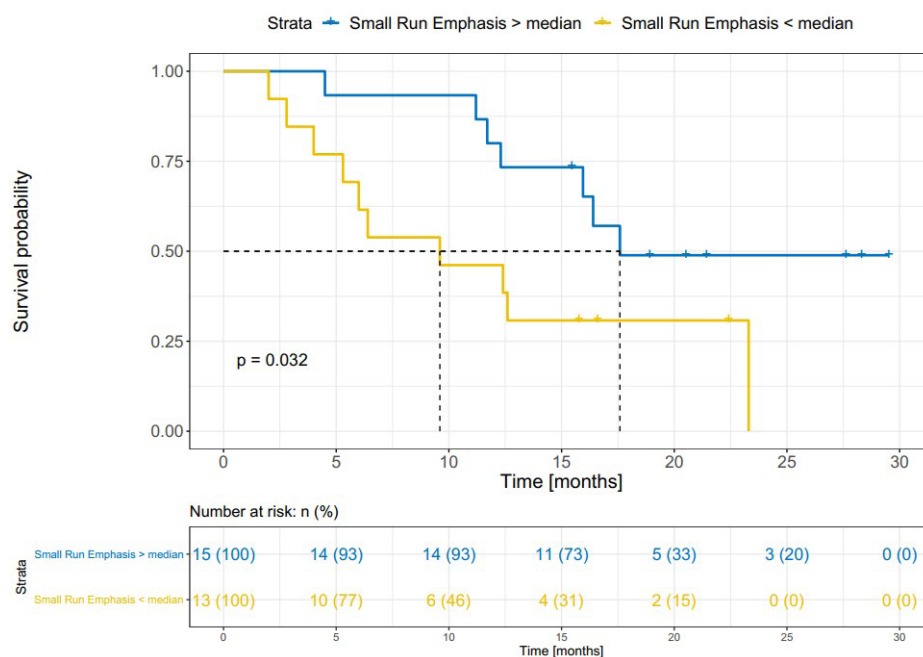
Demografske značilnosti bolnikov so navedene v Tabeli 1. Srednji OS vseh bolnikov je bil 15,9 meseca ob srednjem času spremljanja 21,4 mesecev. Največjo napovedno moč radiomskih metrik na ^{18}F -FDG PET/CT smo beležili pred zdravljenjem. Pred zdravljenjem sta se za značilno različne med odzivniki in ne-odzivniki pokazali teksturni metriki Entropy-GLCM ($p = 0,046$) in Small Run Emphasis (SRE) ($p = 0,001$). ROC krivulja je pokazala visoko napovedno vrednost za SRE (AUC = 0,85), medtem ko so bile napovedne vrednosti ostalih metrik zmerne ($0,6 < \text{AUC} < 0,8$). En mesec po začetku zdravljenja je bil le volumen značilno različen med odzivniki in ne-odzivniki ($p = 0,035$, AUC = 0,75), pri 4 mesecih pa nobena metrika ni bila značilno različna. Za SRE, ki se je v vseh statističnih testih pokazal kot najbolj informativen, smo naredili krivuljo preživetja s Kaplan-Meier metodo med skupinama, ki sta bili oblikovani glede na mediano vrednostjo SRE. Srednji OS pri odzivnikih je bil 17,6 mesecev, pri ne-odzivnikih 9,6 mesecev ($p = 0,032$) (Graf 1). Analizo preživetja v odvisnosti od radiomskih metrik smo opravili tudi s Coxovo regresijsko analizo, v kateri smo v univariantni analizi potrdili volumen tumorja, DE (angl. Difference Entropy) in SRE pred zdravljenjem kot napovedni dejavnik za preživetje, v multivariantni analizi sta se kot napovedni dejavnik pokazala DE in SRE ($p = 0,006$).

Analizirali smo tudi napovedno moč iRADIOMICS (izhodni), iRECIST (prvi in četrti mesec) in PD-L1 (izhodni). Multivariatna analiza iRADIOMICS se je izkazala boljše od trenutnih standardov tako s stališča napovedne moči kot časovno, če primerjamo AUC (95 % CI) in natančnost napovedi (standardne deviacije): iRADIOMICS (pred zdravljenjem), 0,90 (0,78 - 1,00), 78 % (18 %); PD-L1 (pred terapijo) 0,60 (0,37 - 0,83), 53 % (18 %); iRECIST (1. mesec), 0,79 (0,62 - 0,95), 76 % (16 %); iRECIST (4. mesec), 0,86 (0,72 - 1,00), 76 % (17 %).

Tabela 1. Značilnosti bolnikov

	Vsi bolniki (razpon)	Odzivniki (OS>14,9 meseca) mediana (razpon)	Ne-odzivniki (OS>14,9 meseca) mediana (razpon)	p-vrednost
Število bolnikov	30	16	14	
Starost (leta)	65 (46 - 77)	67 (48 - 76)	61 (46 - 77)	0,298
PD-L1 (%)	75 (3 - 100)	77.5 (3 - 100)	75 (10 - 100)	0,933
Spol				0,715
Ženske	15	9	6	
Moški	15	7	8	
Histologija				0,532
Adenokarcinom	17	8	9	
Ploščatocelični karcinom	8	4	4	
Drugo	5	4	1	
ECOG PS				0,162
0	8	2	6	
1	18	12	6	
2	4	2	2	
Linija zdravljenja				0,096
1	15	10	5	
2	13	4	9	
3	2	2	0	
Paliativna RT med imunoterapijo				0,657
Ne	24	12	12	
Da	6	4	2	

Okrajšave: ECOG PS - stanje zmogljivosti, OS - preživetje



Graf 1. Preživetje bolnikov glede na vrednost SRE, ki je bila najpomembnejša napovedna metrika.

Zaključek

iRADIOMICS se je pokazal kot obetajoč slikovni biološki označevalec, ki bi lahko bolje napovedal odgovor na zdravljenje z ICI pri bolnikih z razsejanim NDPR. Bolnikom, katerim bi iRADIOMICS napovedal, da najverjetneje ne bodo odgovorili na zdravljenje z ICI, bi lahko ponudili drugačno vrsto zdravljenja. Naše rezultate je potrebno potrditi na večjem vzorcu bolnikov z razsejanim NDPR.

Zahvala

Raziskava je potekala v sodelovanju strokovnjakov različnih ved in specialnosti, ter osebja oddelka za nuklearno medicino Onkološkega inštituta Ljubljana, ki so vedno prijazno pomagali. Hvala, Robert Jeraj, Žiga Zupančič, Valentina Ahac, Ivana Žagar, Katja Škalič, Andrej Studen, Urban Simončič, Jens Eickhoff, in številni drugi.

Literatura

1. Rak v Sloveniji 2017. Ljubljana: Onkološki inštitut Ljubljana, Epidemiologija in register raka, Register raka Republike Slovenije, 2020.
2. NCCN Guidelines. NSCLC version 4.2021. Available at: https://www.nccn.org/professionals/physician_gls/pdf/nscl.pdf (Accessed April 2021)
3. Seymour L, Bogaerts J, Perrone A, et al. iRECIST: guidelines for response criteria for use in trials testing immunotherapeutics. *Lancet Oncol* 2017; 18: e143-52.
4. Thawani R, McLane M, Beig N, et al. Radiomics and radiogenomics in lung cancer: A review for the clinician. *Lung Cancer* 2018; 115: 34-41.
5. Desseroit MC, Tixier F, Weber WA, et al. Reliability of PET/CT shape and heterogeneity features in functional and morphologic components of non-small cell lung cancer tumors: a repeatability analysis in a prospective multicenter cohort. *J Nucl Med* 2017; 58: 406-11.
6. Herbst RS, Baas P, Kim DW, et al. Pembrolizumab versus docetaxel for previously treated, PD-L1-positive, advanced non-small-cell lung cancer (KEYNOTE-010): a randomised controlled trial. *Lancet* 2016; 387(10027): 1540-50.
7. Valentinuzzi D, Vrankar M, Boc N, et al. [18F]FDG PET immunotherapy radiomics signature (iRADIOMICS) predicts response of non-small-cell lung cancer patients treated with pembrolizumab. *Radiol Oncol* 2020; 54(3): 285-94.

16

KARAKTERIZACIJA IMUNSKEGA ODZIVA MIŠJIH TUMORJEV PRI RADIOTERAPIJI IN ELEKTROPRENOSU PLAZMIDNE DNA Z ZAPISOM ZA KEMOKINE

Lucija Kozjek Mencinger¹, Tim Božič^{2,3}, Gregor Serša^{1,2}, Maja Čemažar^{2,4}, Boštjan Markelc^{1,2}

¹ Zdravstvena fakulteta, Univerza v Ljubljani, Zdravstvena pot 5, Ljubljana, SI-1000, Slovenija

² Oddelek za eksperimentalno onkologijo, Onkološki inštitut Ljubljana, Zaloška cesta 2, Ljubljana, SI-1000, Slovenija

³ Medicinska fakulteta, Univerza v Ljubljani, Vrazov trg 2, Ljubljana, SI-1000, Slovenija

⁴ Fakulteta za vede o zdravju, Univerza na Primorskem, Polje 42, 6310 Izola, Slovenija

Elektronski naslov: lucijakm@gmail.com

Izvleček

Raziskava določuje infiltracijo imunskih celic (CD4+, CD8+ limfocitov T in makrofagov) v mišjem tumorskem modelu raka debelega črevesja CT26 in raka dojke 4T1 po genskem elektroprenosu kemokinov CCL5 in CCL17 v kombinaciji z enkratnim obsevanjem.

Ključne besede: tumorsko mikrookolje, fluorescenčna mikroskopija, genski elektroprenos, kemokini

Uvod

V zadnjem času se velik pomen v procesu karcinogeneze pripisuje tumorskemu mikrookolju, ki pa je heterogeno, saj ga poleg tumorskih celic tvorijo tudi stromalne celice, fibroblasti, ter različne imunske celice (1). Vrsta in količina imunskih celic se med tumorskimi modeli razlikuje, zato lahko tumorje opredelimo glede na imunski status. Skrajna pola tako predstavljajo vnetni tumorji z visoko infiltracijo efektorskih imunskih celic, ter imunsko zapuščeni tumorji z malo imunskimi celicami ali pa z visoko infiltracijo supresorskih imunskih celic (2). Stopnja infiltracije imunskih celic v tumorsko tkivo lahko vpliva na potek bolezni in učinkovitost terapij, zato so terapije z imunomodulatornimi učinki pomembne. Ena izmed takih je tudi genska terapija, ki temelji na genskem elektroprenosu (GET) vnetnih kemokinov CCL5 in CCL17 v tumorje (3). Poleg tega je bila povečana prisotnost imunskih celic v tumorjih opažena tudi kot eden izmed učinkov obsevanja, ki ga pri zdravljenju raka prejme več kot polovica bolnikov (4-6). Zaradi tega se obsevanje že uporablja v kombinaciji z imunoterapijami zaviralcev imunskih kontrolnih točk. Ni pa še raziskano ali lahko s kombinirano terapijo GET kemokinov in obsevanja še povečamo infiltracijo imunskih celic v tumor.

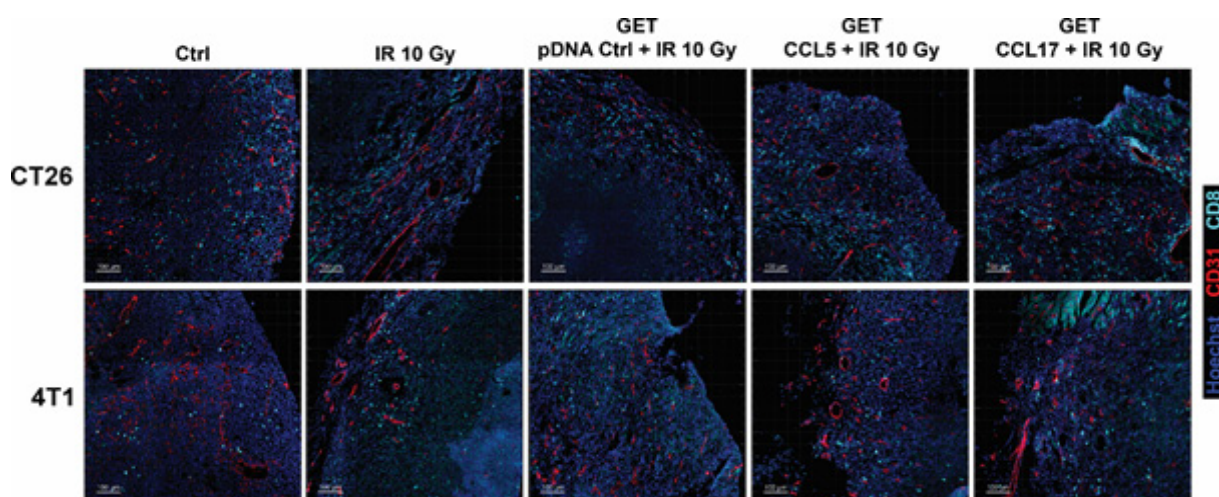
Materiali in metode

Sestavo tumorskega mikrookolja mišjega tumorskega modela raka debelega črevesja CT26 in raka dojke 4T1 po kombinirani terapiji GET kemokinov in obsevanja smo določevali z imunofluorescenčnim barvanjem. Oba tumorska modela rasteta na singeni mišji liniji Balb/c, razlikujeta pa se po imunskem statusu. Tumorji CT26 spadajo med vnetni tumorski model, medtem ko tumorski model 4T1 velja za imunsko zapuščenega. Vzorci podkožno nasajenih tumorjev so bili pridobljeni v sklopu prejšnjih raziskav

(št. dovoljenja: U34401-1/2015/7). Tumorji so bili tretirani s terapijo GET plazmidne DNA z zapisom za kemokina CCL5 ali CCL17, ter kontrolnim plazmidom pDNA Ctrl v kombinaciji z obsevanjem z ekratno dozo (10 Gy). Tumorji so bili odvzeti sedmi dan od začetka terapije, in nato hitro zamrznjeni. Zmrzle tkivne rezine so bile pripravljene z uporabo kriostata in nato pobarvane s primarnimi protitelesi specifičnimi proti antigenom CD4, CD8, F4/80 in CD31 ter sekundarnimi fluorescenčnimi protitelesi proti primarnim protitelesom. Uporabili smo tudi barvilo Hoechst 33342, ki označuje celična jedra. Vzorce smo pregledali s konfokalnim mikroskopom Zeiss LSM 800. Uporabljene fluokrome smo vzbujali z laserji valovnih dolžin 405 nm, 488 nm, 561 nm ali 640 nm. Emitirano svetlobo pa smo zajeli z detektorjem iz galijevega fosfida (GaAsP) v kombinaciji z nastavljivim dikroičnim filtrom ter filtri specifičnimi za emitirano svetlobo posameznih fluorokromov. Za zajem slik smo uporabili program Zen 2.5 (Carl Zeiss), za analizo slik pa program Imaris (Bitplane).

Rezultati

Primerjava stopnje infiltracije posameznih imunskih celic v tumorsko tkivo je pokazala, da se število CD4+ in citotoksičnih CD8+ limfocitov T pri obeh tumorskih modelih poveča že po samem obsevanju z enkratno dozo 10 Gy. Prav tako je število infiltriranih CD8+ limfocitov T pri obeh tumorskih modelih višje po kombinirani terapiji GET kontrolnega plazmida (pDNA Ctrl) in obsevanja z 10 Gy v primerjavi s kontrolo. Največja sprememba v številu infiltriranih CD8+ limfocitov T v primerjavi s kontrolo pa je bila pri tumorskem modelu CT26 po kombinirani terapiji GET CCL17 in obsevanja z 10 Gy, kar prikazuje tudi spodnja slika (Slika 1). Največja infiltracija CD4+ limfocitov T in makrofagov v primerjavi s kontrolo je bila opažena pri kombinirani terapiji GET CCL5 in obsevanja z 10 Gy pri obeh tumorskih modelih.



Slika 1: Infiltracija citotoksičnih CD8+ limfocitov T v tumorsko tkivo. Slika prikazuje robove tumorskih rezin tumorjev CT26 in 4T1 na sedmi dan od začetka terapije. Rezine tumorskega tkiva so bile pobarvane z anti-CD8 (ciano-modra, Cy3), anti-CD31 (rdeča, Alexa Fluor 647) in Hoechst 33342 (modra). Skala: 100 μ m

Razprava

Preliminarni rezultati imunofluorescenčnega barvanja zmrzlih tumorskih rezin kažejo, da kombinirana terapija GET kemokinov in enkratnega obsevanja z dozo 10 Gy prispeva k višji infiltraciji CD4+ limfocitov T in citotoksičnih CD8+ limfocitov T v tumorsko tkivo. Poznavanje dinamike infiltracije imunskih celic v tumorsko tkivo po obsevanju ali po kombinirani terapiji bo pomagalo pri razumevanju mehanizmov odziva tumorja na terapijo ter pri nadaljnji optimizaciji kombinirane terapije.

Zahvala

Raziskava je bila izvedena v okviru magistrske naloge bolonjskega študija 2. stopnje na Oddelku za eksperimentalno onkologijo Onkološkega inštituta Ljubljana in raziskovalnih programov J3-8202 in P3-0003. Sredstva so bila financirana s strani Agencije za raziskovalno dejavnost Republike Slovenije (ARRS) in Evropskega sklada za regionalni razvoj v okviru projekta SmartGene.Si.

Literatura

1. Hui L, Chen Y. Tumor microenvironment: Sanctuary of the devil. *Cancer Lett* 2015; 368(1): 7-13.
2. Galluzzi L, Chan TA, Kroemer G, et al. The hallmarks of successful anticancer immunotherapy. *Sci Transl Med* 2018; 10(459): 1-15.
3. Bozic T, Sersa G, Kranjc Brezar S, et al. Gene electrotransfer of proinflammatory chemokines CCL5 and CCL17 as a novel approach of modifying cytokine expression profile in the tumor microenvironment. *Bioelectrochemistry* 2021; 140: 107795.
4. Dangaj D, Bruand M, Grimm AJ, et al. Cooperation between constitutive and inducible chemokines enables T cell engraftment and immune attack in solid tumors. *Cancer Cell* 2019; 35(6): 885-900.e10.
5. Semmling V, Lukacs-Kornek V, Thaiss CA, et al. Alternative cross-priming through CCL17-CCR4-mediated attraction of CTLs toward NKT cell-licensed DCs. *Nat Immunol* 2010; 11(4): 313-20.
6. Thangamathesvaran L, Shah R, Verma R, et al. Immune checkpoint inhibitors and radiotherapy—concept and review of current literature. *Ann Transl Med* 2018; 6(8): 155-155.

INDEKS AVTORJEV

B

Boc Nina 69

Bošnjak Maša 19

Božič Tim 33, 73

C

Čemažar Maja 11, 19, 22, 25, 33, 36, 73

D

Dolžan Vita 52, 55

G

Goričar Katja 52, 55

H

Heller Loree C. 19

J

Jesenko Tanja 19, 22

K

Kamenšek Urška 36

Kovač Viljem 52

Kozjek Mencinger Lucija 73

Kranjc Brezar Simona 29, 33

L

Levpušček Kristina 22, 36

M

Marinko Tanja 55

Markelc Boštjan 16, 19, 33, 73

Matjašič Alenka 48

Mlakar Jernej 48

N

Nikšič Žakelj Martina 29

P

Perpar Ana 63

Pižem Jože 48

Prevc Ajda 29

R

Remic Tinkara 36

S

Šečerov Ermenc Ajra 44

Šegedin Barbara 44

Serša Gregor 11, 19, 22, 29, 33, 36, 73

Skoblar Vidmar Marija 48

Smrdel Uroš 48

Štrbac Danijela 52

Strojan Primož 11, 22, 29, 39

U

Unk Mojca 69

Uršič Katja 36

V

Valentinuzzi Damijan 69

Velenik Vaneja 58

Vrankar Martina 69

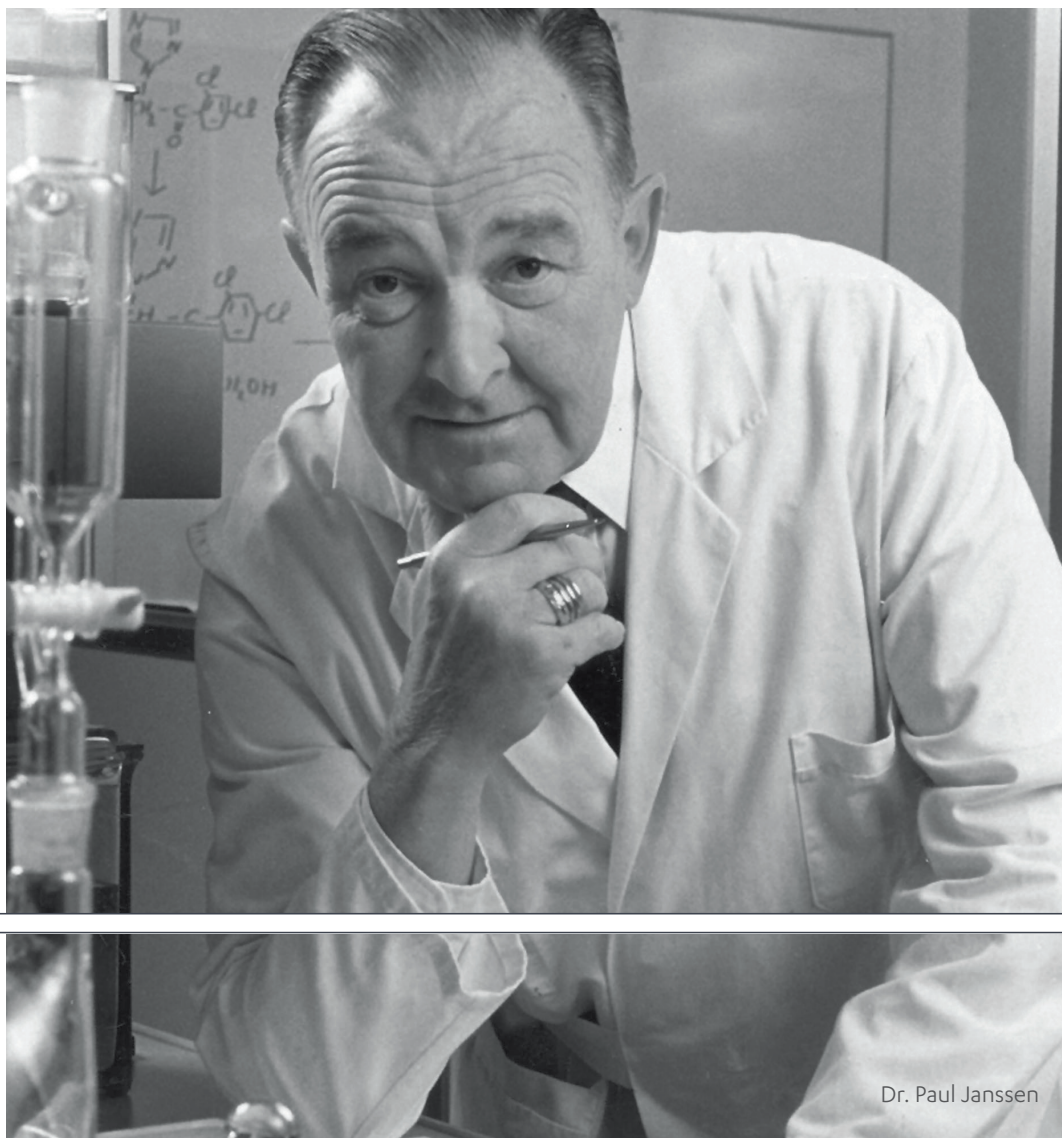
Z

Žnidar Katarina 19

Zobec Logar Helena Barbara 63

Zupan Andrej 48

SPONZORJI



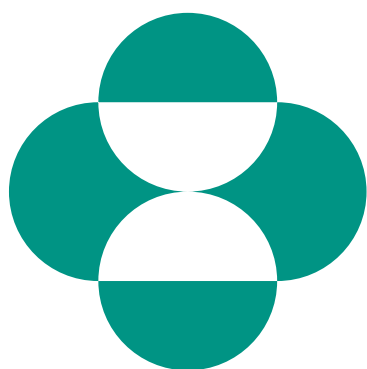
Ponosni smo na preteklost.
Ustvarjamo boljšo prihodnost.

Nadaljujemo z znanstvenim delom dr. Paul Janssen-a, ustanovitelja farmacevtskega podjetja Janssen in enega najbolj inovativnih znanstvenikov na področju farmacije.

SAMO ZA STROKOVNO JAVNOST
CP-224866/140421

Janssen, farmacevtski del Johnson & Johnson d.o.o., Šmartinska cesta 53, 1000 Ljubljana,
tel.: 01 401 18 00, e-mail: info@janssen-slovenia.si





MSD

INVENTING FOR LIFE

Lilly

PHILIPS

gorenjeGTI

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 benzidaminijevega klorida, kar ustreza 1,34 mg benzidamina. V enem razpršku je 0,17 ml raztopine. En razpršek vsebuje 0,255 mg benzidaminijevega klorida, kar ustreza 0,2278 mg benzidamina. **Sestava 3 mg/ml:** 1 ml raztopine vsebuje 3 mg benzidaminijevega klorida, kar ustreza 2,68 mg benzidamina. V enem razpršku je 0,17 ml raztopine. En razpršek vsebuje 0,51 mg benzidaminijevega 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/BSI/BEN/2021/007


ANGELINI

SPONZORJI



MERCK



