

NOVOSTI NA PODROČJU RADIOTERAPIJE IN RADIOBIOLOGIJE: OD RAZISKAV DO KLINIKE

3. mednarodni znanstveni simpozij

ZBORNİK PRISPEVKOV IN POVZETKOV

26. maj 2023

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 Sabina Lovšin, Onkološki inštitut Ljubljana
Tehnična in administrativna podpora:	Simona Kranjc Brezar, Onkološki inštitut Ljubljana
Sponzorji:	Novartis Labena d.o.o. Merck d.o.o. Roche farmacevtska družba d.o.o. Merck Sharp & Dohme, inovativna zdravila d.o.o.

NOVOSTI NA PODROČJU RADIOTERAPIJE IN RADIOBIOLOGIJE: OD RAZISKAV DO KLINIKE

3. mednarodni znanstveni simpozij

ZBORNIK PRISPEVKOV IN POVZETKOV

Urednice:	Tanja Marinko, Maja Čemažar, Simona Kranjc Brezar
Recenzenti:	Maja Čemažar, Tanja Marinko, Gregor Serša, Primož Strojan
Tehnična urednica :	Simona Kranjc Brezar
Oblikovanje:	Simona Kranjc Brezar
Izdano pri:	Onkološki inštitut Ljubljana Združenje za radioterapijo in onkologijo pri Slovenskem zdravniškem društvu
Tiskano pri:	Fota-Cop d.o.o.
Izdaja:	1. izdaja, 80 izvodov

CIP - Kataložni zapis o publikaciji
Narodna in univerzitetna knjižnica, Ljubljana
616-006-085.849(082)



NOVOSTI na področju radioterapije in radiobiologije: od raziskav do klinike (simpozij) (3 ; 2023 ; Ljubljana)

Novosti na področju radioterapije in radiobiologije: od raziskav do klinike : zbornik prispevkov in povzetkov : 3. mednarodni znanstveni simpozij : 26. maj 2023, Onkološki inštitut Ljubljana / organizatorja Onkološki inštitut Ljubljana in Združenje za radioterapijo in onkologijo pri Slovenskem zdravniškem društvu ; [urednice Tanja Marinko, Maja Čemažar, Simona Kranjc Brezar]. - 1. izd. - Ljubljana : Onkološki inštitut : Združenje za radioterapijo in onkologijo pri Slovenskem zdravniškem društvu, 2023

ISBN 978-961-7029-62-8 (Onkološki inštitut)
COBISS.SI-ID 152527619

NOVOSTI NA PODROČJU RADIOTERAPIJE IN RADIOBIOLOGIJE: OD RAZISKAV DO KLINIKE

3. mednarodni znanstveni simpozij

26. maj 2023

Onkološki inštitut Ljubljana

ZBORNİK PRISPEVKOV IN POVZETKOV

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



ONKOLOŠKI INŠTITUT
INSTITUTE OF ONCOLOGY
LJUBLJANA



**Slovensko
Zdravniško
Društvo**
1861

KAZALO VSEBINE

Program	5
Seznam prispevkov	8
Seznam povzetkov	9
Prispevki	13
Povzetki	59
Indeks avtorjev	93
Sponzorji	96

PROGRAM

Petek, 26. maj 2023

8:00 - 8:30 **Prijava udeležencev**

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

Tanja Marinko in Maja Čemažar, Onkološki inštitut Ljubljana

8:40 - 9:15 **Artificial Intelligence in the era of precision medicine: role of medical imaging**

Robert Jeraj, Univerza v Wisconsinu in Univerza v Ljubljani

Bazične in aplikativne raziskave – 1. del

Moderator: Maja Čemažar

9:15 - 9:30 **Organoidi glioblastoma razkrivajo odpornost na standardno terapijo**

Metka Novak, Nacionalni inštitut za biologijo

9:30 - 9:45 **Fizikalni modeli imunoterapije in radioterapije**

Damijan Valentinuzzi, Fakulteta za matematiko in fiziko

9:45 - 10:00 **Transferability of knowledge-based plan prediction models: toward benchmark and large-scale plan automation for breast radiotherapy**

Claudio Fiorino, Medical Physics Department, San Raffaele Scientific Institute, Milano

10:00 - 10:15 **Infrastruktura NIX za uporabo metod strojnega učenja na medicinskih slikah**

Andrej Studen, Univerza v Ljubljani, Fakulteta za matematiko in fiziko, Inštitut Jožef Stefan

10:15 - 10:30 **Odmor**

PROGRAM

Bazične in aplikativne raziskave – 2. del

Moderator: Gregor Serša

- 10:30 - 10:40 **Z naprednimi raziskovalnimi metodami do novih znanj**
Monika Savarin, Labena
- 10:40 - 10:50 **Razvoj in karakterizacija mišjega modela za študije HPV-pozitivnega raka glave in vratu**
Živa Modic, Onkološki inštitut Ljubljana
- 10:50 - 11:00 **Surgical wound fluids from patients treated with intraoperative radiotherapy changes the phenotype of normal and malignant fibroblasts**
Oliwia Piwocka, Greater Poland Cancer Centre
- 11:00 - 11:10 **Protitumorsko delovanje genskega elektroprenosa plazmidne DNA z zapisom za kemokina CCL5 ali CCL17 in obsevanja na mišjih modelih karcinoma**
Tim Božič, Onkološki inštitut Ljubljana
- 11:10 - 11:25 **Teranostični pristopi z alfa sevalci**
Luka Ležaić, Univerzitetni klinični center Ljubljana
- 11:25 - 12:15 **Odmor**

Klinične raziskave- 1.del

Moderator: Tanja Marinko

- 12:15 - 12:30 **Pilotna študija zdravljenja poobsevalne kserostomije z alogenskimi mezenhimskimi matičnimi celicami**
Urban Švajger, Zavod RS za transfuzijsko medicino
- 12:30 - 12:45 **Radiooznačeni ligandi CCK2R kot potencialni radiofarmaki v teranostiki bolnikov z medularnim rakom ščitnice – primer translacijske študije (študije predklinike)**
Petra Kolenc, Univerzitetni klinični center Ljubljana

PROGRAM

- 12:45 - 13:00** **Radiooznačeni ligandi CCK2R kot potencialni radiofarmaki v teranostiki bolnikov z medularnim rakom ščitnice – primer translacijske študije (klinična študija)**
Katja Zaletel, Univerzitetni klinični center Ljubljana
- 13:00 - 13:15** **Novejši serumski markerji pri mezoteliomu**
Danijela Štrbac, Onkološki inštitut Ljubljana
- 13:15 - 13:45** **Odmor**

Klinične raziskave- 2.del

Moderator: Jasna But Hadžić

- 13:45 - 14:00** **Dinamika dolžine telomerov v levkocitih po zdravljenju z obsevanjem pri raku dojk**
Tanja Marinko, Onkološki inštitut Ljubljana
- 14:00 - 14:15** **Paliativno obsevanje zasevkov nedrobnoceličnega raka pljuč pred prvim zdravljenjem s kemoimunoterapijo - PRIMM**
Jasna But Hadžić, Onkološki inštitut Ljubljana
- 14:15 - 14:30** **Stereotaktično obsevanje kostnih zasevkov: rezultati zdravljenja na onkološkem inštitutu Ljubljana**
Ivica Ratoša, Onkološki inštitut Ljubljana
- 14:30 - 14:45** **Stereotaktično obsevanje kot nadomestilo brahiterapevtskega boosta pri pacientih z rakom prostate**
Daša Grabec, Onkološki inštitut Ljubljana
- 14:45 - 15:00** **Unraveling the role of STAT5 transcription factors in leukemia by murine stem cell transplantation**
Leo Edlinger, Medicinska univerza Gradec
- 15:00 - 15:10** **Zaključek srečanja**

SEZNAM PRISPEVKOV

1	Ali visoko maligni B-celični limfomi, dvojni ekspresorji, res potrebujejo intenzivnejšo kemoterapijo? <i>Lučka Boltežar</i>	14
2	Stereotaktično obsevanje kot nadomestilo brahiterapevtskega boosta pri pacientih z rakom prostate <i>Daša Grabec</i>	20
3	Teranostični pristopi z alfa sevalci <i>Luka Ležaić</i>	27
4	Dinamika dolžine telomerov v levkocitih po zdravljenju z obsevanjem pri raku dojk <i>Tanja Marinko</i>	32
5	Primer pregleda literature stereotaktičnega obsevanja trebušne slinavke skozi oči radiološkega inženirja <i>Irena Oblak</i>	38
6	Novejši pristopi k zdravljenju mezotelioma plevre <i>Danijela Štrbac</i>	43
7	Fizikalni modeli imunoterapije in radioterapije <i>Damijan Valentinuzzi</i>	46
8	Paliativno obsevanje zasevkov nedrobnoceličnega raka pljuč pred prvim zdravljenjem s kemoimunoterapijo – PRIMM <i>Tanja Žnidarič</i>	54

SEZNAM POVZETKOV

P1	Obsevanje in genska terapija s kemokinoma CCL5 ali CCL17 na mišjih modelih karcinoma <i>Tim Božič</i>	60
P2	Imunoterapija z bakteriofagi, ki na plaščnih proteinih predstavljajo tumorski peptid MAGE-A1 za zdravljenje malignega melanoma <i>Nuša Brišar</i>	62
P3	Stereotaktično obsevanje kostnih zasevkov: rezultati zdravljenja na Onkološkem inštitutu Ljubljana <i>Alenka Čulk</i>	63
P4	Unraveling the role of STAT5 transcription factors in leukemia by murine stem cell transplantation <i>Leo Edlinger</i>	64
P5	Transferability of knowledge-based plan prediction models: toward benchmark and large-scale plan automation for breast radiotherapy <i>Claudio Fiorino</i>	65
P6	AI in precision medicine: role of medical imaging <i>Robert Jeraj</i>	67
P7	Sproščanje dejavnikov imunogene celične smrti HMGB1 in ATP iz celičnih linij se povečuje s časom po obsevanju <i>Urša Kešar</i>	68
P8	Radiooznačeni ligandi CCK2R kot potencialni radiofarmaki v teranostiki bolnikov z medularnim rakom ščitnice – primer translacijske študije (študija predklinike) <i>Petra Kolenc</i>	70
P9	Kombinirano zdravljenje solidnih tumorjev z intratumoralnim genskim elektroprenosom plazmidne DNA z zapisom za protitelesa anti-CTLA4 in obsevanjem <i>Simona Kranjc Brezar</i>	72
P10	Organoidi glioblastoma razkrivajo odpornost na standardno terapijo <i>Bernarda Majc</i>	74
P11	Smrt endotelijskih celic po ionizirajočem sevanju ne vpliva na funkcionalnost tumorskega žilja v mišjih tumorskih modelih <i>Boštjan Markelc</i>	75

SEZNAM POVZETKOV

P12	Aktivacija vzorčno prepoznavnih senzorjev po genskem elektroprenosu plazmida z zapisom za interleukin-12 <i>Ajda Medved</i>	76
P13	Razvoj in karakterizacija mišjega modela za študije HPV-pozitivnega raka glave in vratu <i>Živa Modic</i>	78
P14	Surgical wound fluids from patients treated with intraoperative radiotherapy changes the phenotype of normal and malignant fibroblasts <i>Oliwia Piwócka</i>	79
P15	Radiosenzibilizacija tumorjev z elektroprenosom plazmida za dve antiangiogeni tarči <i>Monika Savarin</i>	80
P16	Infrastruktura NIX za uporabo metod strojnega učenja na medicinskih slikah <i>Andrej Studen</i>	81
P17	Molekularne in transkripcijske spremembe tumorskih endotelijskih celic po obsevanju pri miših <i>Iva Šantek</i>	83
P18	Pilotna študija zdravljenja poobesevalne kserostomije z alogenskimi mezenhimskimi stromalnimi matičnimi celicami – študijski protokol <i>Urban Švajger</i>	85
P19	Vaskularizacija in vaskularni učinki kot prognostični dejavniki za zdravljenje tumorjev z lokalnimi ablacijskimi tehnikami <i>Tadej Tomanič</i>	88
P20	Radiooznačeni ligandi CCK2R kot potencialni radiofarmaki v teranostiki bolnikov z medularnim rakom ščitnice – primer translacijske študije (klinična študija) <i>Katja Zaletel</i>	90

PRISPEVKI

ALI VISOKO MALIGNI B-CELIČNI LIMFOMI, DVOJNI EKSPRESORJI, RES POTREBUJEJO INTENZIVNEJŠO KEMOTERAPIJO?

Lučka Boltežar^{1,2}, Samo Rožman¹, Gorana Gašljević¹, Biljana Grčar Kuzmanov¹, Barbara Jezeršek Novaković^{1,2}

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

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

Elektronski naslov: lboltezar@onko-i.si

Izvleček

Velikocelični B limfomi z BCL2 in BCL6 preureditvijo so imenovani "double-hit" oziroma "triple-hit" limfomi, z imunohistokemično ekspresijo pa dvojni ekspresorji (DE) in vsi imajo slabšo prognozo od klasičnih velikoceličnih limfomov B. Opravljena je bila študija vseh bolnikov z visoko malignimi B limfomi in difuznim velikoceličnim limfomom B, zdravljenih na Onkološkem inštitutu Ljubljana med leti 2017 in 2021. Večina izmed 154 vključenih bolnikov je bila zdravljenih z R-CHOP terapijo (rituksimab, ciklofosfamid, doksorubicin, vinkristin in prednizon), mediani čas spremljanja bolnikov je bil 22 mesecev. 110 bolnikov (71,4 %) ni imelo ponovitve bolezni v opazovanem obdobju. V primerjavi štirih uporabljenih terapevtskih protokolov v skupini DE nismo našli razlik v preživetju ($p = 0,712$). Preživetje bolnikov z "double-hit" in "triple-hit" limfomi je bilo, pričakovano, slabo. Naši podatki kažejo, da je velik del bolnikov z DE, zdravljen z R-CHOP in standardno CZS profilakso, tudi uspešno ozdravljen. Za potrditev naših izsledkov so potrebne večje randomizirane raziskave.

Uvod

V letu 2016 objavljena prenovljena klasifikacija Svetovne Zdravstvene Organizacije (SZO) je dodala obvezno molekularno testiranje v diagnostiki difuznega velikoceličnega limfoma B (DVCBL) v vsakodnevno prakso hematopatologov (1). Velikocelični B limfomi z MYC preureditvijo in »B-cell lymphoma 2« (BCL2) ter »B-cell lymphoma 6« (BCL6) preureditvijo so bili klasificirani kot »double-hit« (DHL) in »triple-hit« (THL) limfomi. V kolikor pa kromosomske preureditve niso prisotne in celice izražajo MYC in BCL2 proteina le imunohistokemično, se tak limfom imenuje dvojni ekspresor (DE) DVCBL (1). V letu 2022 posodobljena SZO klasifikacija ukinja BCL6 in ohranja le MYC in BCL2 prerazporeditvi kot definicijo »double-hit« limfomov (2). Incidenca DHL, THL in DE variira. V literaturi je opisano od 7 % DHL v populaciji DVCBL (3) do 14 % DHL in 34 % DE (4). V splošnem se ocenjuje, da so DE prisotni v 20 do 30% pri novoodkritem DVCBL (2,5). Standardno zdravljenje DVCBL je R-CHOP (rituksimab, ciklofosfamid, doksorubicin, vinkristin in prednizon), a mednarodne smernice priporočajo intenzivnejšo kemoterapijo za DHL in THL (6), medtem ko priporočila za DE niso tako jasna in so dokazi o potrebnem intenzivnejšem zdravljenju DE limfomov šibkejši (7,8). DE DVCBL imajo slabše preživetje brez napredovanja bolezni (PFS) in celokupno preživetje (OS) kot standardni DVCBL, in to ne glede na mednarodni prognostični indeks (IPI) ali celico izvora (1,9).

Namen naše raziskave je bil določiti incidenco DHL, THL in DE limfomov v naši seriji bolnikov z DVCBL in oceniti njihove klinične karakteristike, prvo zdravljenje in primerjati preživetje med tistimi, ki so bili zdravljeni s standardnim R-CHOP in tistimi, ki so bili zdravljeni z intenzivnejšimi protokoli.

Metode

Retrospektivno smo analizirali vse bolnike z DVCBL in visoko malignimi B-celičnimi limfomi z MYC in BCL2 ter BCL6 preureditvami, ki so bili diagnosticirani na Onkološkem inštitutu med leti 2017 in 2021. V nadaljnje analize smo vključili le bolnike z diagnozo DE DVCBL, DHL in THL. Vključeni so bili vsi tisti, ki so dobili vsaj en ciklus sistemskega zdravljenja, medtem ko smo izključili tiste, ki za sistemsko zdravljenje niso bili sposobni oziroma so bili le paliativno obsevani. Zajeli smo demografske podatke, izračunali IPI in zabeležili sheme zdravljenja. Upoštevali smo prvi red zdravljenja za DE/DHL/THL, torej, če je bila diagnoza DE postavljena ob ponovitvi bolezni, smo upoštevali zdravljenje, ki ga je bolnik dobil za DE diagnozo. Podatke o preživetju smo pridobili iz Registra raka na dan 9.5.2022. Raziskavo je odobrila komisija za klinične raziskave Onkološkega inštituta (KSOPKR-0088/2021) in Etična komisija Onkološkega inštituta (EK-0100/2021).

Vzorke tkiva sta ločeno pregledali izkušeni hematopatologinji, ki nista imeli podatkov o kliničnem poteku bolezni. Po odčitku sta rezultate primerjali ter primere, kjer sta se odločili drugače, skupaj pregledali pod mikroskopom ter podali končno mnenje. DVCBL smo razdelili glede na celico izvora na aktivirani B-celični podtip (ABC) ter podtip germinalnega centra (GCB), glede na Hansov algoritem (10).

Za demografske podatke smo uporabili deskriptivno statistiko ter Mann-Whitneyev neparametrični test. Preživetje smo ocenili s Kaplan-Meier metodo in razlike iskali z log-rank testom. P vrednost manj kot 0,05 smo šteli kot statistično značilno. Uporabili smo program IBM SPSS Statistics, verzijo 26.

Rezultati

Skupno je bilo pregledanih 309 primerov DVCBL in 22 primerov visoko malignih B-celičnih limfomov. 161 (52,1 %) jih je bilo opredeljenih kot DE DVCBL. 16 bolnikov je bilo DHL (4,8 %) ter pet bolnikov THL (1,5 %). Ob upoštevanju zgoraj naštetih izključitvenih kriterijev, smo nadaljnje analizirali 154 bolnikov. Izmed 154 bolnikov jih je bilo 135 DE, 16 DHL in 3 THL. Osemdeset od 135 je imelo ABC podtip in 55 GCB podtip. Mediana starost bolnikov je bila 70 let (razpon 21-91). Mediano število ciklusov zdravljenja je bilo 6. B simptome je imelo 42 % bolnikov, ekstrapnodalno prizadetost pa 48 % bolnikov. Povišano vrednost laktatne dehidrogenaze (LDH) v krvi je imelo 55,8 % bolnikov. Mediana vrednost IPI je znašala 3.

Bolnike smo razdelili v štiri skupine glede na terapijo, ki so jo prejeli. Skupino A so predstavljali bolniki, zdravljeni z R-CHOP (ali R-mini-CHOP pri starejših bolnikih), skupino B bolniki, ki so bili zdravljeni z R-CHOP in srednjo dozo metotreksata ($0,5 \text{ mg/m}^2$), skupino C so predstavljali bolniki, ki so bili zdravljeni z R-DA-EPOCH (rituksimab, doksorubicin, ciklofosfamid, etopozid, vinkristin, prednizolon) in skupino D so predstavljali bolniki, ki niso bili zdravljeni z antraciklini (razlogi za to: kardiološko

obolenje, zdravljenje z antraciklinom v preteklosti zaradi drugega malignoma ali pa relaps DE/DHL/THL in je bil bolnik že v prvem redu zdravljen z antraciklinom zaradi druge vrste limfoma). V skupini A je bilo 109 bolnikov (70,8 %), v skupini B 10 (6,5 %), v skupini C 19 (12,3 %) in v skupini D 16 (10,4 %) bolnikov. Profilakso centralnega živčnega sistema (CŽS) je dobilo 78 bolnikov (50,7 %), večinoma z intratekalno kemoterapijo (75/78), trije pa z visoko dozo metotreksata intravenozno.

Od zajetju podatkov je bilo 105 bolnikov še živih (68,2 %). Izmed 49 umrlih, jih je 37 umrlo zaradi limfoma oziroma vzroka, povezanega z limfomom (75,5 %) in 12 zaradi drugih razlogov (24,5 %). Mediani čas spremljanja je bil 22 mesecev. 118 bolnikov (76,6 %) je po zaključenem prvem zdravljenju doseglo popolno remisijo, 6 bolnikov (3,9 %) delno remisijo, eden je imel stabilno bolezen in 19 bolnikov (12,3 %) je imelo progres bolezni že tekom prvega zdravljenja. 110 bolnikov ni imelo ponovitve bolezni v opazovanem času (71,4 %), 34 jih je imelo progres med ali takoj po zdravljenju DE/DHL/THL (21,1%) in za 10 bolnikov ocena izhoda zdravljenja ni bila možna (razlogi: izgubljeni iz kontrol, zavrnil evaluacijo, odšel v tujino). Izmed 34 bolnikov, ki so imeli napredovanje bolezni, jih je imelo sistemsko ponovitev 26 (76,5 %) in 8 ponovitev v CŽS (23,5 %).

V skupini dvojnih ekspresorjev je bilo 135 bolnikov - 65 moških in 70 žensk. Mediana starost je bila 70 let. Mediana IPI vrednost je bila 3. V terapevtski skupini A je bilo 100 bolnikov (74,1 %), v terapevtski skupini B 8 (5,9 %), v terapevtski skupini C 14 (10,4 %) in v terapevtski skupini D 13 bolnikov (9,6 %). Umrlo je 37 bolnikov, od tega 27 zaradi limfoma ali z limfomom povezanih razlogov (20,9 %). Ocenjeno petletno celokupno preživetje za celotno skupino je znašalo 57,1 % (95 % interval zaupanja (IZ) 45,9 % - 68,3 %) in ocenjeno petletno preživetje brez napredovanja bolezni 76,5 % (95 % IZ 72,6 % - 80,4 %). Analize podskupin podajamo v troletni oceni, saj je petletna ocena skupine D 0 %: triletno celokupno preživetje A skupine je znašalo 71,0 % (95 % IZ 66,0 % - 76,0 %), 70,0 % za terapevtsko skupino B (95 % IZ 51,8 % - 88,2 %), 77,9 % za terapevtsko skupino C (95 % IZ 66,6 % - 89,2 %) in 69,2 % za terapevtsko skupino D (95 % IZ 56,4 % - 82,0 %). Med skupinami ni bilo statistično pomembne razlike v preživetju ($p = 0,712$). Ocenjeno triletno preživetje brez napredovanja bolezni je bilo 71,4 % za skupino A (95 % IZ 66,6 % - 76,2 %), 65,6 % za skupino B (IZ % CI 44,7 % - 86,5 %), 83,9 % za skupino C 95 % IZ 73,5 % - 94,3 %) in 80,8 % za skupino D (95 % IZ 68,6 % - 93,0 %). Tudi tu med skupinami ni bilo statistično pomembne razlike v preživetju ($p = 0,843$).

Pri analizi preživetja glede na celico izvora ni bilo razlik med ABC in GCB podskupinama, ne v celokupnem preživetju ($p = 0,681$), ne v preživetju brez napredovanja bolezni ($p = 0,297$). Ocenjeno triletno celokupno preživetje ABC podskupine je bilo 66,8 % (95 % IZ 60,8 % - 72,8 %) in ocenjeno triletno celokupno preživetje GCB podskupine 77,1 % (95 % IZ 71,2 % - 83,0 %). Ocenjeno triletno preživetje brez napredovanja bolezni pri ABC podskupini je bilo 68,3 % (95 % IZ 62,4 % - 74,2 %) in pri GCB podskupini 79,4 % (95 % IZ 73,5 % - 85,3 %).

Pri analizi preživetja DE bolnikov glede na IPI prognostične skupine, je bila statistično višje tveganje za smrt pri skupini IPI visoko tveganje (razmerje tveganj 7,68, 95 % IZ 2,32 - 25,49, $p = 0,001$), medtem ko v drugih IPI skupinah tveganje ni bilo značilno višje.

Podskupina DHL in THL je štela le 19 bolnikov, 16 od tega jih je imelo DHL. Mediana starost DHL podskupine je bila 69 let in THL skupine 66 let. Osem bolnikov je doseglo popolno remisijo po prvem zdravljenju, pet bolnikov je doživelo ponovitev bolezni in za tri bolnike ocena izhoda po končanem zdravljenju ni bila možna.

Ocenjeno petletno celokupno preživetje za DHL podskupino je bilo 32,4 % (95 % IZ 16,6 % – 48,2 %), vsi trije bolniki z THL pa so pokojni oziroma izgubljeni iz sledenja. Petletno preživetje brez napredovanja bolezni za DHL podskupino je bilo 34,9 % (95 % IZ 18,1 % – 53,0 %). Analize glede na terapevtske podskupine ter IPI kategorije niso bile narejene zaradi majhnosti vzorca.

Razprava

V našo študijo smo zajeli vse bolnike z difuznim velikoceličnim B limfomom, dvojnimi ekspresorjem ter »double-hit« ali »triple-hit« limfomom, zdravljeni v naši ustanovi z različnimi terapevtskimi shemami. Naša skupina se glede na razmerje bolnikov v DEL in DHL ter THL skupini ne razlikuje močno od literature (11). Tudi mediana starost 70 let je enaka kot v predhodnih študijah (9). V naši skupini smo beležili nižje IPI vrednosti, manj bolnikov s povišano koncentracijo LDH ter manj bolnikov z ekstrapodalno manifestacijo bolezni kot v objavljeni literaturi (12), kar so vse znani dejavniki, ki vplivajo na bolnikovo prognozo. To višje razmerje v korist dobrih prognostičnih dejavnikov lahko delno razloži naše dobre rezultate preživetja, vendar ne popolnoma, saj gre za analizo vseh bolnikov, ki so bili zdravljeni na OI in ne študijsko odbrano skupino. Nižje IPI kategorije v naši skupini lahko delno razložijo visok delež popolnih remisij po prvem redu zdravljenja, ki je bil dosežen v naši študiji in je višji kot ga navaja literatura (9).

V naši študiji smo beležili relativno visok delež DE DVCBL bolnikov izmed vseh DVCBL (52,1 %), kar lahko razložimo s striktno natančnostjo naših patologov, ki se držijo priporočil SZO, da je za BCL2 pozitiven izvid potrebno več kot 50 % izražanje proteina v vzorcu. V nedavno objavljeni metaanalizi Hwanga s sodelavci so ugotovili, da se le 51 % objavljenih mednarodnih študij drži meje 50 % za pozitiven izvid BCL2, medtem ko druge študije uporabljajo višjo mejo (največkrat 70 %) (5).

V primerjavi z literaturo je preživetje naših DHL bolnikov relativno nizko (12), vendar je treba poudariti, da gre za zelo majhno skupino bolnikov. Naše preživetje DEL bolnikov pa je zelo visoko, dosega celo preživetja ostalih DVCBL bolnikov (13), ki so bili zdravljeni le z R-CHOP. Razlik med preživetji terapevtskih podskupin nismo našli, vendar gre za neenakomerno porazdeljene skupine, saj bolniki niso bili randomizirani v študijo, ampak zdravljeni po obstoječi doktrini in glede na specialistovo odločitev ter stanje bolnika. Vendar vseeno mislimo, da naši rezultati doprinesejo k znanju v literaturi, da ne potrebujejo vsi DE bolniki intenzivnejšega protokola zdravljenja in so v veliki meri lahko ozdravljeni le z R-CHOP terapijo. Medtem ko so smernice za DHL in THL jasne, da so potrebni intenzivnejši protokoli zdravljenja, pa so manj jasne in z dokazi podprte glede intenzivnejšega zdravljenja DE limfomov. Gre za manjše študije mlajših bolnikov (7,8), ki starostno ne ustrezajo realnim pacientom z DE DVCBL. Nekaj študij je že objavljenih s primerjavo R-DA-EPOCH in R-CHOP pri DE bolnikih (14-16) in niso pokazale razlik v preživetju med R-CHOP in intenzivnejšimi protokoli, tako kot naša analiza. In tudi v naši študiji ponovno potrdimo, da je IPI točkovalnik še vedno eno

najmočnejših orodij za napovedovanje prognoze pri bolnikih z DVCBL.

Glavna prednost naše študije je, da gre za dosedaj največji zajem in analizo zaporednih bolnikov z DE DVCBL, zdravljenih v istem centru, ki so bili deležni enake obravnave s strani istih zdravnikov specialistov glede na njihovo stanje zmogljivosti in pridružene bolezni in zatorej niso izbrana populacija za klinične študije. Druga prednost je gotovo ta, da sta vse vzorce pregledali ločeno dve hematopatologinji. Glavna pomankljivost študije je neenakomerna porazdelitev bolnikov med terapevtskimi skupinami, retrospektivna narava študije in majhen vzorec bolnikov.

Zaključek

Naši podatki kažejo, da je velik del bolnikov z DE, zdravljen z R-CHOP in standardno CZS profilakso, tudi uspešno ozdravljen. Primerjava preživetij različnih terapevtskih skupin ni pokazala razlik med preživetjem glede na uporabljeni protokol zdravljenja. Glede na rezultate naše raziskave vsi DE bolniki verjetno ne potrebujejo intenzivnejšega zdravljenja. Za potrditev naših izsledkov so potrebne večje randomizirane raziskave.

Literatura

1. Swerdlow SH, Campo E, Pileri SA, et al. The 2016 revision of the World Health Organization classification of lymphoid neoplasms. *Blood*. 2016;127(20):2375–2390.
2. Alaggio R, Amador C, Anagnostopoulos I, et al. The 5th edition of the World health organization classification of haematolymphoid tumours: lymphoid neoplasms. *Leukemia*. 2022;36(7):1720–1748.
3. Huang S, Nong L, Wang W, et al. Prognostic impact of diffuse large B-cell lymphoma with extra copies of MYC, BCL2 and/or BCL6: comparison with double/triple hit lymphoma and double expressor lymphoma. *Diagn Pathol*. 2019;14(1):81.
4. Zhiping M, Jing N, Yanzhen C, et al. Clinical significance of 'double-hit' and 'double-expression' lymphomas. *J Clin Pathol*. 2020;73(3):126–138.
5. Jisun H, Chonghyun S, Kyungwon K, et al. The Incidence and treatment response of double expression of MYC and BCL2 in patients with diffuse large B-Cell Lymphoma: a systematic review and meta-analysis. *Cancers (Basel)*. 2021;13(13):3369.
6. Zelenetz AD, Gordon LI, Abramson JS, et al. NCCN guidelines: B-cell lymphomas, version 5.2022. Available at: www.nccn.org, on date 21. July 2022.
7. Pedersen MO, Gang AO, Brown P, et al. Real world data on young patients with high-risk diffuse large B-cell lymphoma treated with R-CHOP or R-CHOEP - MYC, BCL2 and BCL6 as prognostic bio-markers. *PLoS One*. 2017;12(10):e0186983.
8. Doderio A, Guidetti A, Tucci A, et al. Dose-adjusted EPOCH plus rituximab improves the clinical outcome of young patients affected by double expressor diffuse large B-cell lymphoma. *Leukemia*. 2019;33(4):1047–1051.
9. Green TM, Young KH, Visco C, et al. Immunohistochemical double-hit score is a strong predictor of outcome in patients with diffuse large B-cell lymphoma treated with rituximab plus cyclophosphamide, doxorubicin, vincristine, and prednisone. *J*

Clin Oncol. 2012;30:3460–67.

10. Hans CP, Weisenburger DD, Greiner TC, et al. Confirmation of the molecular classification of diffuse large B-cell lymphoma by immunohistochemistry using a tissue microarray. *Blood*. 2004;103:275–282.
11. Landsburg DJ, Petrich AM, Abramson JS, et al. Impact of oncogene rearrangement patterns on outcomes in patients with double-hit non-Hodgkin lymphoma. *Cancer*. 2016;122:559–564.
12. Riedell PA, Smith SM. Double hit and double expressors in lymphoma: Definition and treatment. *Cancer*. 2018;124(24):4622–4632.
13. Horvat M, Zadnik V, Južnič Šetina T, et al. Diffuse large B-cell lymphoma: 10 years' real-world clinical experience with rituximab plus cyclophosphamide, doxorubicin, vincristine and prednisolone. *Oncol Lett*. 2018;15(3):3602–3609.
14. Devi K, Shaikh MU, Bahadur Ali N, et al. Outcomes of patients with double/triple expressor diffuse large B-cell lymphoma (DLBCL) treated with R-DA-EPOCH/R-CHOP: A single-center experience. *Leuk Res Rep*. 2021;16:100284.
15. D'Angelo CR, Hanel W, Chen Y, et al. Impact of initial chemotherapy regimen on outcomes for patients with double-expressor lymphoma: A multi-center analysis. *Hematol Oncol*. 2021;39(4):473–482.
16. Zhang XY, Liang JH, Wang L, et al. DA-EPOCH-R improves the outcome over that of R-CHOP regimen for DLBCL patients below 60 years, GCB phenotype, and those with high-risk IPI, but not for double expressor lymphoma. *J Cancer Res Clin Oncol*. 2019;145(1):117–127.



STEREOTAKTIČNO OBSEVANJE KOT NADOMESTILO BRAHITERAPEVTSKEGA BOOSTA PRI BOLNIKI Z RAKOM PROSTATE

Daša Grabec, Aleš Majdič, Janka Čarman, Borut Kragelj

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

Elektronski naslov: dgrabec@onko-i.si

Izvleček

Aktualna dozimetrična raziskava potrjuje, da bi del bolnikov s karcinomi prostate lahko bil obravnavan s kombinacijo volumetrično modulirane ločne terapije (VMAT) prostate (in medeničnih bezgavk) ter zaporednega stereotaktičnega obsevanja (SBRT) prostate. Cilj raziskave je bil razvoj metode za načrtovanje tovrstnega obsevanja.

Ključne besede: radioterapija, karcinom prostate, SBRT, brahiterapija

Uvod

Priporočen način obsevanja bolnikov z nemetastatskim hormonsko občutljivim rakom prostate srednje rizične skupine z neugodnimi dejavniki in visoko rizične skupine je bodisi zunanje obsevanje (TRT) z ekvivalentnimi dozami med 76 in 80 Gy ali kombinacija zunanjega (TRT) in notranjega (BRT) obsevanja, ki je lahko izpeljano kot obsevanje z visoko (HDR) ali nizko hitrostjo doze (LDR) (1).

Jasno je, da višja doza pomeni boljšo kontrolo, tudi pri dozah nad 80 Gy. Obsevanje katerega doze ali dozni ekvivalenti presegajo sedaj priporočljive doze zunanjega obsevanja nudi boljšo lokalno kot tudi sistemsko kontrolo bolezni (2,3) in verjetno izboljša tudi preživetje bolnikov (4,5).

Zapleti takega zdravljenja, tako akutni kot tudi kronični so sprejemljivi, vendar so lahko izrazitejši kot pri konvencionalnem zunanjem obsevanju in lahko znižajo kvaliteto življenja (3).

V preteklosti, ko je bil cilj obsevanja celotna prostata, so bili dozni ekvivalenti 90 Gy in več varno dosegljivi le s kombinacijo zunanjega in notranjega obsevanja. Kombinacijo zunanjega obsevanja in brahiterapije visoke hitrosti doze (HDRB) odlikuje več kot 95 % lokalna kontrola, približno 90 % dolgoletna biokemična kontrola pacientov s srednje rizičnimi in približno 80 % biokemična kontrola bolnikov z visoko rizičnimi značilnostmi karcinomov (8-9).

HDRB prostate je zaradi nujnega vstavljanja vodil v prostato invaziven poseg, ki je za bolnike neprijeten in tudi ni pri vseh izvedljiv, bodisi zaradi anatomskih ali funkcionalnih značilnosti, lahko pa tudi zaradi tveganj povezanih z anestezijo. Naša želja je, da bi z zunanjim obsevanjem, ki z dozo in frakcionacijo posnema BRT, omogočili učinkovito zdravljenje karcinoma prostate tudi tistim bolnikom, ki niso zdravljeni z

BRT (neizvedljivost posega, zavračanje zaradi invazivnosti, ter pri posameznikih, pri katerih sočasno dodatno obsevanje tumorskih žarišč ni sprejemljivo zaradi obsevanja medeničnih bezgavk).

Pri oblikovanju obsevalnega protokola je bilo v ospredju pet izhodišč:

1) Kombinacija TRT in HDRB s $3 \times 6 - 7$ Gy je učinkovita. V seriji 88 bolnikov, ki so bili na OI zdravljeni med 2006 in 2011 s kombinacijo zunanjega obsevanja (50.4 Gy/28 frakcij) in HDRB obsevanja ($3 \times 6 - 7$ Gy) je bil lokalni recidiv po 8 letih s sistematsko uporabo PET CT slikanja s holinom ob biokemičnem recidivu ugotovljen pri le 3 bolnikih, biokemična kontrola po 5 letih je bila dosežena pri 96 % bolnikov s srednje oz. 84 % bolnikov z visoko rizičnimi značilnostmi karcinomov.

2) Zunanje obsevanje je lahko podobno učinkovito kot BRT, ob uporabi primerljive doze in frakcionacije (10).

3) Pri praviloma multifokalni rasti karcinoma prostate je za vzpostavitev lokalne kontrole ključna kontrola dominantne tumorske lezije. Hkrati s tem se obdrži običajne doze za obsevanje preostale prostate in zagotovi učinkovitost, ki je vsaj primerljiva obsevanju z običajnimi dozami (2,11).

4) Z dvigom doze nad 80 Gy lahko pridejo v ospredje urinarne težave, ki so posledica poobsevalne poškodbe prostatične sečnice in morda tudi uretralnega sfinktra, kar je nujno upoštevati pri opredelitvi rizičnih organov. Za opredelitev dozno-volumskih omejitev smo upoštevali, da je poškodba odvisna tako od maksimalnih doz kot tudi doze na celotno sečnico (12,13).

5) Z upoštevanjem relativnih dozno volumskih omejitev za sečnik in rektum, ki jih uporabljamo za ekstremno hipofrakcionirano obsevanje se zagotovi varnost obsevanja, in prepreči porast poobsevalnih okvar sečnika in rektuma (14).

Cilj in namen raziskave

Cilj raziskave je bil razvoj metode za načrtovanje stereotaktičnega obsevanja (SBRT) prostate kot dodatka (boost) k volumetrično modulirani ločni terapiji (VMAT) prostate (in medeničnih bezgavk). Doseči moramo predpisano dozo tarčnih volumnov, ne da bi presegli dozne omejitve za rizične organe. S tem smo opredelili izvedljivost načrtovanega obsevanja z namenom priprave kliničnega protokola in dejanske izvedbe obsevanja.

Metoda dela in rezultati

Za potrebe raziskave je bila uporabljena slikovna dokumentacija 10 bolnikov z na prostato omejenimi karcinomi, z volumnom prostate pod 50 cm^3 in z jasno dominantno lezijo na magnetno resonančnem slikanju (MR). Izključeni so bili bolniki, pri katerih je dominantna lezija obraščala sečnico v več kot polovici obsega sečnice ali je bila lokalizirana izključno med sečnico in rektumom. Vsi bolniki so imeli na OI Ljubljana standardno pripravo z računalniško tomografijo (CT) in MR, pri vseh so bila vstavljena 3 markirna zlata zrna, dodatno je bil za potrebe raziskave vstavljen urinski kateter Ch12. Nespremenjena je bila opredelitev rizičnih organov zunanje konture sečnika in rektuma (debelina stene sečnika je standardizirana na 3 mm). Dodatno je bila kot rizični organ vrisana sečnica, ki je bila opredeljena z obrisom urinskega katetra od baze prostate do

notranjega uretralnega sfinktra, in PRV (načrtovalni volumen kritičnega organa) sečnice z varnostnim robom 1 – 2 mm oz. 3 mm kranialno ter z vključitvijo notranjega uretralnega sfinktra. Z namenom optimizacije izračuna doz, so bile pri prvih treh pacientih uporabljene različne opredelitve volumnov PTV (planirni tarčni volumen) s končno verzijo, ki je bila nato uporabljena pri vseh začetnih in tudi nadaljnjih sedmih bolnikih. V končni verziji smo predpisali dozo na tri volumne:

- GTVp (tumorski volumen prostate), ki obriše dominantno lezijo kot je prikazana s T2 sekvencami MR iz katerega je izključen PRV sečnice,
- CTVp (klinični tarčni volumen prostate), ki predstavlja zunanjo konturo prostate
- PTVp (planirni tarčni volumen prostate), ki predstavlja prostato z varnostnim robom 5 mm oz. 3 mm dorzalno.

Pri izbranih 10 bolnikih je bila mediana velikosti CTVp $43,3 \text{ cm}^3$ ($15,4 \text{ cm}^3 - 59,0 \text{ cm}^3$). Mediana velikosti dominantne lezije je bila $3,8 \text{ cm}^3$ ($2,0 \text{ cm}^3 - 26,5 \text{ cm}^3$), pri čemer je dominantna lezija predstavljala 10,5 % prostate - mediana, (razpon: 5,5 % – 58,2 %).

Obsevalne načrte za SBRT boost smo pripravili v treh frakcijah kot VMAT obsevalne načrte dveh polnih lokov, 6 MV FFF žarkov.

Iskali smo splošni dozni predpis, kjer bi ob še sprejemljivi toksičnosti na rizične organe, dodali kar se da visoko dozo na prostato in dominantno lezijo. Izdelamo lahko SBRT boost obsevalne načrte (plane) z visokodoznim območjem na dominantno intraprostatično lezijo ob sprejemljivi dozi na sečnico, a moramo zaradi omejitve doze na sečnico omejiti tudi dozo boosta. Ostali rizični organi ne predstavljajo težav. Dozo smo pri SBRT boostu omejili z $D1\% < 18,9 \text{ Gy}$ na PRV sečnice. Izkaže se, da na celotno prostato lahko dodamo še 15 – 16 Gy, na dominantno intraprostatično lezijo pa 18 – 20 Gy.

Oblikovan splošni dozni predpis SBRT boosta je predstavljen v Tabeli 1. Z najvišjo, a navzgor omejeno dozo, obsevamo dominantno lezijo: GTVp: $3 \times 6,5 \text{ Gy}$; $D98\% > 18 \text{ Gy}$; $D1\% < 20 \text{ Gy}$. Doza na celotno prostato CTVp je: $3 \times 6 \text{ Gy}$; $D98\% > 16 \text{ Gy}$; $V_{100} > 70 \%$, na robu prostate pa doza lahko pade do pokritosti PTVp $D98\% > 14 \text{ Gy}$.

Pri začetnih načrtih smo poleg dominantne lezije opredeljevali tudi področje v katerem doza pade od predpisane doze na dominantno lezijo do doze predpisane na celotno prostato. Ta predpis postane pri izvedbi načrtov trivialno izpolnjen in ga zato ni potrebno posebej opredeljevati.



Tabela 1: Dozno volumski predpisi in omejitve za SBRT boost obsevalne načrte (plane) in dosežene vrednosti za 10 SBRT boost načrtov. Omejitve v rdečem so nujne, zelene pa dosegamo opcijsko. GTVp: tumorski volumen prostate, CTVp: klinični tarčni volumen prostate, PTVp: planirni tarčni volumen prostate, PRV: načrtovalni volumen kritičnega organa, D%: doza, ki jo prejme nevedeni odstotek volumna, VGy: volumen, ki prejme navedeno dozo, Dmean: srednja doza, Dmax: maksimalna doza.

TARČNI VOLUMNI IN RIZIČNI ORGANI	DOZNO VOLUMSKE OMEJITVE	REZULTAT SBRT (povprečje $\pm$ stdev)	DELEŽ PLANOV Z DOSEŽENIM CILJEM
GTVp	D98% > 18 Gy	18,9 $\pm$ 0,2 Gy	10/10
	D1% < 20 Gy	19,9 $\pm$ 0,1 Gy	10/10
CTVp	D98% > 16 Gy	17,3 $\pm$ 0,4 Gy	10/10
	V 18 Gy > 70 %	82,9 $\pm$ 8,1 Gy	10/10
PTVp	D98% > 14 Gy	14,5 $\pm$ 0,4 Gy	10/10
rektum	V 15 Gy < 1 ml	0,7 $\pm$ 0,2 ml	10/10
	V 13,5 Gy < 15 %	3,5 $\pm$ 1,0 %	10/10
	V 12,9 Gy < 5 %	4,5 $\pm$ 1,3 %	9/10
	V 11,85 Gy < 14 %	6,7 $\pm$ 1,9 %	10/10
	V 11,25 Gy < 35 %	8,3 $\pm$ 2,3 %	10/10
	V 9,9 Gy < 45 %; < 22 %	13,3 $\pm$ 3,5 %	10/10
	V 7,95 Gy < 35 %	28,0 $\pm$ 9,4 %	10/10
sečni mehur	D1% < 18,75	14,7 $\pm$ 2,3 Gy	10/10
stena mehurja	V 18 Gy < 2 ml	0,04 $\pm$ 0,1 ml	10/10
	V 15,9 Gy < 2 ml	1,0 $\pm$ 0,6 ml	10/10
	V 5,94 Gy < 15 ml	8,1 $\pm$ 2,2 ml	10/10
anus	V 10,8 Gy < 16 %	3,7 $\pm$ 4,3 %	10/10
	Dmean < 7,95 Gy	2,8 $\pm$ 1,2 Gy	10/10
sečnica PRV	D1% < 18,9 Gy	18,4 $\pm$ 0,1 Gy	10/10
	V 18 Gy < 65 %; < 46 %	25,8 $\pm$ 8,7 %	10/10
	V 15,9 Gy < 60 %	58,3 $\pm$ 1,7 %	10/10
bulbus	Dmax < 13,8 Gy	3,7 $\pm$ 4,1 Gy	10/10
kolki	Dmax < 10,8 Gy	5,9 $\pm$ 0,8 Gy	10/10

CTVp: klinični tarčni volumen prostate, PTVp: planirni tarčni volumen prostate, PRV: načrtovalni volumen kritičnega organa, D%: doza, ki jo prejme nevedeni odstotek volumna, VGy: volumen, ki prejme navedeno dozo, Dmean: srednja doza, Dmax: maksimalna doza

Na podlagi doznega predpisa smo izdelali obsevalne načrte za 10 bolnikov raziskave. Pri teh načrtih smo zadostili vsem zastavljenim ciljem: tako pokritosti kot omejitvam na rizične organe, z izjemo ene nenujne omejitve pri enem pacientu. V Tabeli 1 so predstavljeni rezultati doseganja zastavljenih ciljev, v Tabeli 2 pa so predstavljene dosežene doze na tarčne volumne.

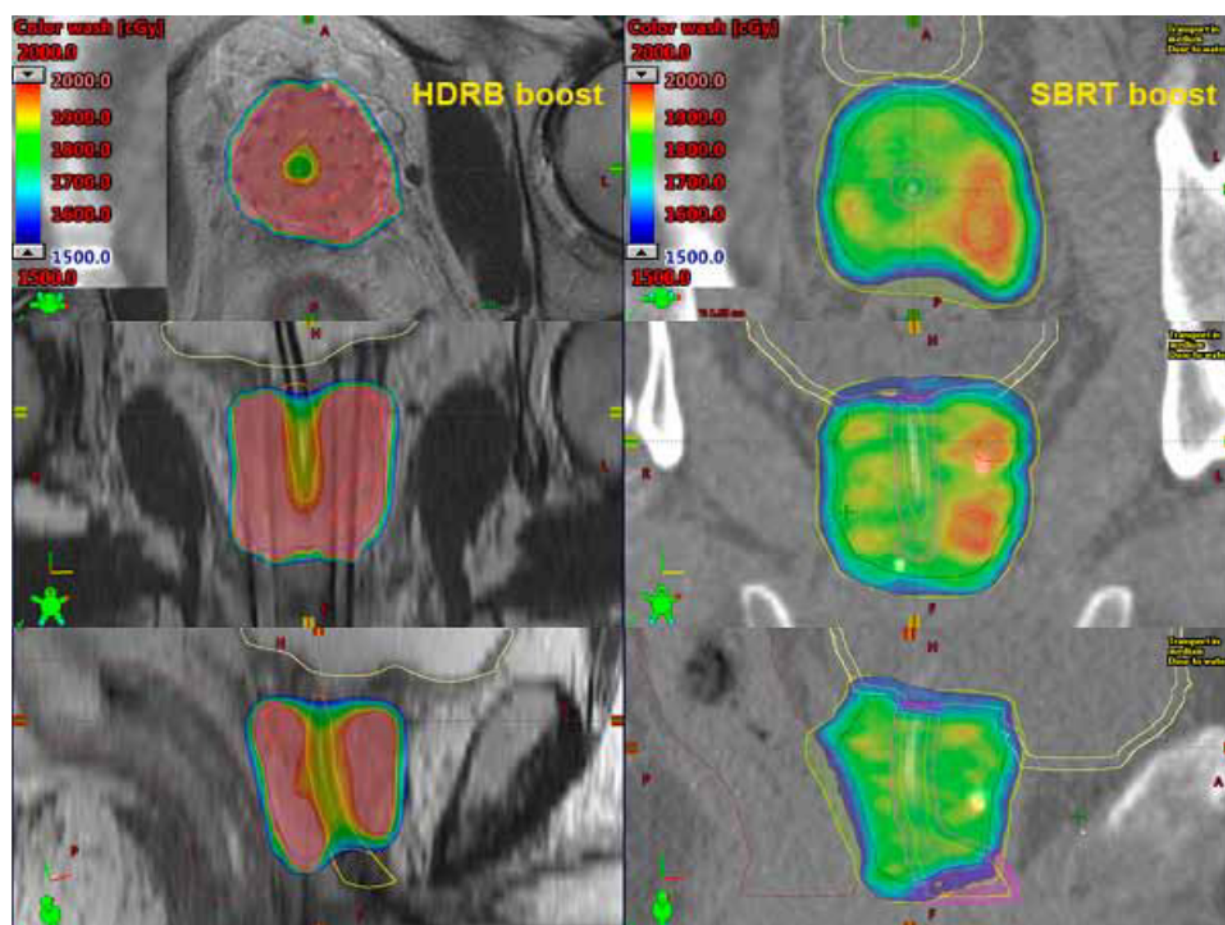
Vsi bolniki za katere smo izdelali SBRT boost obsevalne načrte so predhodno že prejeli visoko dozno hitrostni BRT (HDRB) boost. Primerjali smo dosežene HDRB boost in predvidene SBRT boost dozne porazdelitve, kot je prikazana na Sliki 1. Pri BRT je mesto sečnice stalno, pri SBRT pa moramo sečnico določiti z varnostnim robom, četudi

je prostata markirana in njen položaj med obsevanjem spremljan z metodo sledenja markerjev.

Tabela 2: Dosežene doze na tarčne volumne za 10 SBRT boost obsevalnih načrtov.

TARČNI VOLUMNI	PARAMETER	REZULTAT SBRT (mediana; min-max) [GY]
GTVp	D98%	18,9; 18,6 — 19,2
	D50 %	19,5; 19,4 — 19,6
	D2%	19,8; 19,6 — 20,0
CTVp	D98%	17,5; 16,6 — 17,8
	D50%	18,4; 18,2 — 19,2
	D2%	19,6; 19,5 — 19,7
PTVp	D98%	14,4; 14,1 — 14,9
	D50%	17,8; 17,3 — 18,6
	D2%	19,5; 19,4 — 19,6

GTVp: tumorski volumen prostate, CTVp: klinični tarčni volumen prostate, PTVp: planirni tarčni volumen prostate, D %: doza, ki jo prejme nevedeni odstotek volumna



Slika 1: Primerjava dozne porazdelitve pri izvedenem HDRB boostu in izračunanem SBRT boostu

Maksimalna povprečna doza na sečnico pri tako doseženih obsevalnih načrtih (D1%) je $18,4 \pm 0,1$ Gy pri SBRT boostu in $19,4 \pm 0,1$ Gy pri HDRB boostu.

Povprečno je 18 Gy prejelo $25,8 \pm 8,7$ % sečnice pri SBRT boostu ter $43,9 \pm 13,2$ % sečnice pri HDRB boostu. Dozo 15,9 Gy je povprečno prejelo $58,3 \pm 1,7$ % sečnice pri SBRT boostu ter $62,4 \pm 15,3$ % sečnice pri HDRB boostu.

Zaključek

Različne izvedbe radikalnega obsevanja karcinoma prostate omogočajo individualni pristop k bolniku z rakom prostate. Raziskava kaže, da je SBRT boost lahko alternativa HDRB boostu, s potencialno prednostjo pri obravnavi manjših anteriorno ležečih dominantnih lezij, ki so težje dosegljive z vodili in boljšega prikaza dominantnih lezij v področju apeksa prostate.

Literatura

1. EAU Guidelines on Prostate Cancer - Uroweb. Uroweb - European Association of Urology. Available from: <https://uroweb.org/guidelines/prostate-cancer>
2. Kerkmeijer LGW, Groen VH, Pos FJ, et al. Focal boost to the intraprostatic tumor in external beam radiotherapy for patients with localized prostate cancer: results from the FLAME randomized phase III trial. *J Clin Oncol: Official J Am Soc Clin Oncol*. 2021;39(7):787–796.
3. Morris WJ, Tyldesley S, Rodda S, et al. Androgen Suppression Combined with Elective Nodal and Dose Escalated Radiation Therapy (the ASCENDE-RT Trial): An analysis of survival endpoints for a randomized trial comparing a low-dose-rate brachytherapy boost to a dose-escalated external beam boost for high- and intermediate-risk prostate cancer. *Int J Radiat Oncol Biol Phys*. 2017; 98(2): 275–85.
4. Andruska N, Agabalogun T, Fischer-Valuck BW, et al. Assessing the impact of brachytherapy boost and androgen deprivation therapy on survival outcomes for patients with unfavorable intermediate-risk prostate cancer patients treated with external beam radiotherapy. *Brachytherapy*. 2022;21(5):617–25.
5. Andruska N, Agabalogun T, Fischer-Valuck BW, et al. Assessing the impact of brachytherapy boost and androgen deprivation therapy on survival outcomes for patients with unfavorable intermediate-risk prostate cancer patients treated with external beam radiotherapy. *Brachytherapy*. 2022;21(5):617–25.
6. Mendez LC, Morton GC. High dose-rate brachytherapy in the treatment of prostate cancer. *Transl Androl Urol* 2018;7(3):357–370.
7. Yaxley JW, Lah K, Yaxley JP, et al. Long-term outcomes of high-dose-rate brachytherapy for intermediate- and high-risk prostate cancer with a median follow-up of 10 years. *BJU Int*. 2016;120(1):56–60.
8. Rodríguez Villalba S, Monasor Denia P, Pérez-Calatayud MJ, et al. Low-/high-dose-rate brachytherapy boost in patients with intermediate-risk prostate cancer treated with radiotherapy: long-term results from a single institution team experience. *J Contemp Brachytherapy*. 2021;13(2):135–144.

9. Morton G, Loblaw A, Cheung P, et al. Is single fraction 15 Gy the preferred high dose-rate brachytherapy boost dose for prostate cancer? *Radiother Oncol.* 2011;100(3):463–467.
10. Chen WC, Li Y, Lazar A, et al. Stereotactic body radiation therapy and high-dose-rate brachytherapy boost in combination with intensity modulated radiation therapy for localized prostate cancer: a single-institution propensity score matched analysis. *Int J Radiat Oncol Biol Phys.* 2021;110(2):429–437.
11. Tree AC, Satchwell L, Alexander E, et al. Standard and hypofractionated dose escalation to intraprostatic tumor nodules in localized prostate cancer: 5-year efficacy and toxicity in the DELINEATE trial. *Int J Radiat Oncol Biol Phys.* 2023;115(2):305–316.
12. Panettieri V, Rancati T, Onjukka E, et al. External Validation of a predictive model of urethral strictures for prostate patients treated with HDR brachytherapy boost. *Front Oncol.* 2020 11;10.
13. Groen VH, van Schie M, Zuithoff NPA, et al. Urethral and bladder dose–effect relations for late genitourinary toxicity following external beam radiotherapy for prostate cancer in the FLAME trial. *Radiother Oncol.* 2022;167:127–32.
14. Widmark A, Gunnlaugsson A, Beckman L, et al. Ultra-hypofractionated versus conventionally fractionated radiotherapy for prostate cancer: 5-year outcomes of the HYPO-RT-PC randomised, non-inferiority, phase 3 trial. *Lancet.* 2019;394(10196):385–395.



TERANOSTIČNI PRISTOPI Z ALFA SEVALCI

Luka Ležaić

Klinika za nuklearno medicino, Univerzitetni Klinični Center Ljubljana, Zaloška 7, 1525 Ljubljana, Slovenija

Elektronski naslov: luka.lezaic@kclj.si

Izvleček

Zdravljenje z alfa sevalci je izredno obetavno področje razvoja terapevtske nuklearne medicine oziroma tarčnega radionuklidnega zdravljenja. V rutinski uporabi je trenutno le radij-223 (ena indikacija), številni drugi radionuklidi pa so že bili uporabljeni v predkliniki in prenešeni v klinične raziskave; najbolj obetavne radionuklide in klinične indikacije so predstavljene v prispevku. Glavna omejitev k širši uporabi alfa sevalcev je trenutno njihova omejena dostopnost. Težavo naslavljajo interdisciplinarne iniciative, v katerih sodelujejo tudi inštitucije iz Republike Slovenije.

Ključne besede: alfa sevalci, tarčno radionuklidno zdravljenje

Uvod

Tarčno radionuklidno tarčno zdravljenje (TRNZ) uporabljamo v klinični rutini že desetletja. V čim večji meri se poslužujemo t.i. teranostičnega principa, po katerem potrditvi ustrezne tarče s molekularno slikovno diagnostiko (t.j. diagnostičnim radiofarmakom) sledi uporaba terapevtskega radiofarmaka z vezavo in delovanjem na enako tarčo. Terapevtsko uporabljani radionuklidi so najpogostejše beta sevalci (jod-131, lutecij-177, itrij-90, samarij-153, ...), ki oddajajo elektrone in posledično z ionizacijo povzročajo neposredne (prekinitev dvojne vijačnice, ...) in posredne učinke (nastanek prostih radikalov, ...) na biološke makromolekule (predvsem dezoksiribonukleinsko kislino, DNA), s tem pa odmrtnje tarčnih celic oziroma tkiva.

Neposredni učinek ionizacije s prekinitvijo dvojne vijačnice je najpomembnejši mehanizem delovanja TRNZ. Od gostote ionizacije, ki jo oddani delec povzroča je odvisna poškodba tarčnih makromolekul in s tem učinkovitost TRNZ. Gostoto ionizacije opisujemo z količino LET (linear energy transfer), ki predstavlja količino oddane energije tkivu na enoto razdalje. Pri beta sevalcih ta značilno znaša okoli 0,2 keV/ μ m in zadošča za enojno prekinitev dvojne vijačnice DNA; doseg v tkivu značilno znaša nekaj milimetrov. Učinek TRNZ temelji na zmanjšani učinkovitosti rakavih celic pri popravljanju strukturnih napak DNA v primerjavi z zdravim tkivom. Selektivni pritisk na rakave celice z bolj izraženo tarčo (kljub t.i. "učinku navzkrižnega ognja"), povišana aktivnost mehanizmov za popravljanje strukturnih napak DNA ter dediferenciacija s povišano proliferativno aktivnostjo rakavih celic so verjetni mehanizmi razvoja odpornosti na TRNZ z beta sevalci, kar običajno pomeni potrebo po zamenjavi zdravljenja za drugo modalnost (npr. kemoterapija ali druga oblika tarčnega zdravljenja). V primeru, da je tarča za TRNZ na tarčnem tkivu še ustrezno izražena, pa lahko namesto beta sevalca uporabimo alfa sevalec, če je ta v povezavi z nosilno molekulo na voljo.

Alfa sevalci oddajajo helijeva jedra, ki imajo bistveno manjši doseg v tkivu (značilno

manj kot 100 μm ; nivo celice) in pa bistveno višjo gostoto ionizacije (LET značilno okoli 200 keV/ μm), kar običajno povzroči nepopravljivo dvojno prekinitev dvojne vijačnice DNA in s tem odmrtnje tarčnih rakavih celic, obenem pa zaradi omejenega dosega manj poškoduje priležna zdrava tkiva.

Teoretično obetavna kombinacija lastnosti še ni v široki rutinski uporabi; s strani Uprave za hrano in zdravila (FDA) in Evropske agencije za zdravila (EMA) je za klinično uporabo odobren le radij-223 (^{223}Ra , Xofigo®), ki ga uporabljamo pri napredovalem hormonsko odpornem raku prostate za zdravljenje izključno kostnih metastaz. Vrsta obetavnih radionuklidov in terapevtskih oziroma teranostičnih radiofarmakov pa je bila že uporabljena v predkliničnih raziskavah in prevedena v prve klinične raziskave.

Obetavni alfa sevalci za klinično uporabo

Lastnosti obetavnih, za TRNZ uporabnih alfa sevalcev so primerna dostopnost, razpolovna doba, odsotnost neugodnih hčerinskih radionuklidov in/ali dodatnih emisij. Od vrste alfa sevalcev tovrstne ugodne lastnosti izražajo aktinij-225 (^{225}Ac), astat-211 (^{211}At), bizmut-213 (^{213}Bi), svinec-212 (^{212}Pb) ter terbij-149 (^{149}Tb) in so že bili uporabljeni v kliničnem kontekstu (tarčno radionuklidno zdravljenje z alfa sevalci, TRNZ- α).

^{225}Ac

Nekaj raziskovalnih skupin je TRNZ- α z ^{225}Ac uporabilo pri nevroendokrinih neoplazmah (NEN) z izraženo somatostatinskimi receptorji z izvorom v prebavilih, pljučih ali avtonomnem živčevju v primeru odpovedi TRNZ z beta sevalci, področno (intraarterijsko) za zdravljenje jetrnih metastaz [1] ali sistemsko [1, 2, 3] z dobrim objektivnim odgovorom na zdravljenje. Enak pristop je bil pričakovano uporabljen pri metastatskem kastracijsko odpornem raku prostate (KORP), kjer je bil iz modela NEN uspešno prenešen koncept TRNZ, usmerjen na za prostato specifičen membranski antigen (PSMA). Prve meta-analize potrjujejo uspešnost in varnost koncepta [4] z znižanjem vrednosti za prostato specifičnega antigena (PSA) > 50 % pri več kot dveh tretjinah bolnikov.

Pri starejših bolnikih z akutno mieloično levkemijo (AML), nezmožnih standardne indukcijske kemoterapije je bilo kot monoterapija uporabljeno z ^{225}Ac označeno protitelo proti CD33 (^{225}Ac]Ac-lintuzumab) v dveh aktivnostih (1,5 in 2,0 $\mu\text{Ci/kg}$). Objektivni odgovor je bil dosežen pri več kot tretjini bolnikov s sočasno mielosupresijo v odvisnosti od uporabljene aktivnosti [5]; načrtovana je uporaba ^{225}Ac]Ac-lintuzumaba v kombinaciji z drugimi modalnostmi zdravljanja pri AML, mielodisplastičnem sindromu in kot monoterapija pri refraktarnem difuznem plazmocitomu.

^{211}At

Klinične izkušnje TRNZ- α z ^{211}At so povezane z modelom tarčne imunoradioterapije pri napredovalem raku jajčnika s peritonealnimi metastazami. Fab fragment protitelesa (MX35 F(ab')₂), usmerjenega proti ionsko-odvisnemu membranskemu prenašalcu beljakovin 2b (NaPi2b) in označenega z ^{211}At je bil načrtovan za intraperitonealno aplikacijo [6]. Poročano mediano preživetje je znašalo 35 mesecev (dolgoročno preživetje

nad 10 let okoli 25 %) brez kliničnih znakov dolgoročne toksičnosti [7].

²¹³Bi

Uspešen model TRNZ- α z ²²⁵Ac se je obnesel tudi z uporabo ²¹³Bi: pri NEN v manjši skupini bolnikov [8] in pri napredovalem KORP v poročanih posameznih kliničnih primerih [9]. V nekoliko manj odmevnih raziskavah kljub obetavnim rezultatom so bile tarče radioaktivno označenih protiteles receptorji na površini celic hematoloških malignomov ([²¹³Bi]Bi-HuM195mAb, anti-CD33; AML [10]), malignega melanoma ([²¹³Bi]Bi-9.2.27mAb, z melanomom povezan hondroitin-sulfat proteoglikan [11]) in raka sečnega mehurja ([²¹³Bi]Bi-anti-EGFR-mAb [12]).

²¹²Pb

Trenutne klinične izkušnje temeljijo na uporabi radiooznačenega protitelesa proti človeškemu epidermalnemu rastnemu faktorju ([²¹²Pb]Pb-TCMC-trastuzumab) in peritonealnim metastazam (rak jajčnika, rak debelega črevesa) [13]. Čas do napredovanja bolezni je znašal do 8 mesecev; pomembne (ledvične, hematološke, jetrne) toksičnosti (kljub nadaljevanju zdravljenja z drugimi modalnostmi) niso opazali.

¹⁴⁹Tb

Družina radioaktivnih izotopov Tb je s teranostičnega vidika izjemno zanimiva, saj ponuja tako možnost molekularnega slikanja (¹⁵²Tb, pozitronska emisijska tomografija), zdravljenja (¹⁶¹Tb, beta sevalec) kot tudi sočasnega zdravljenja (¹⁵⁵Tb, Augerjevi elektroni in enofotonska emisijska tomografija; ¹⁴⁹Tb, alfa sevalec in pozitronska emisijska tomografija). Kliničnih izkušenj še ni, kot eden najobetavnejših kandidatov za TRNZ- α pa je bil uspešno uporabljen v vrsti predkliničnih modelov [14] (radioaktivno označena protitelesa proti kadherinu: rak želodca; radioaktivno označeno anti-CD20 protitelo: ne-Hodgkinov limfom, kronična mieloična levkemija; radioaktivno označen folat: rak dojke, debelega črevesa, ledvic, jajčnika, kot tudi teranostično znanih tarč: somatostatinski receptor: NEN; za prostato specifični membranski antigen: rak prostate).

Projekcije in prizadevanja za bodočnost

Predklinične in omejene klinične izkušnje so glede učinkovitosti in sopojavov izjemno obetavne. Težavo predstavlja v prvi vrsti omejena dostopnost terapevtskih radionuklidov, tako uveljavljenih (beta sevalec lutecij-177) kot obetavnih (beta sevalca renij-188 in baker-64, kot tudi že zgoraj opisani alfa in beta sevalci). Težavo naslavlja projekt SECURE (Strengthening the European Chain of sUpply for next generation of medical RadionuclidEs) znotraj EU klica HORIZON-EURATOM-2021-NRT-01-10, katerega cilj je skozi šest delovnih paketov (štirje tehnični, od teh zadnji klinični) vertikalno interdisciplinarno integrirati kvantitativno in kvalitativno ustrezno proizvodnjo ter klinično uporabo novih in obstoječih radionuklidov za teranostične namene, potreba po katerih bo pričakovano eksponentno rasla. Od 17 deležnikov dve inštituciji prihajata iz Republike Slovenije (Inštitut Jožef Stefan, Univerzitetni Klinični Center Ljubljana). Projekt je sinergističen s cilji nekaterih drugih iniciativ EU (SAMIRA) kot tudi nekaterih nacionalnih in internacionalnih projektov.

Zaključek

Predklinične in prve klinične raziskave potrjujejo izredno obetavno prihodnost tarčnega radionuklidnega zdravljenja z alfa sevalci kot tudi z novimi beta sevalci. Ovira do širše uporabe terapevtskih radionuklidov je predvsem njihova dostopnost. Težavo naslavlja interdisciplinarni projekt SECURE, katerega del so tudi slovenske inštitucije.

Literatura

1. Kratochwil C, Bruchertseifer F, Giesel F, et al. Ac-225-DOTATOC—An empiric dose finding for alpha particle emitter based radionuclide therapy of neuroendocrine tumors. *J Nucl Med* 2015;56:1232.
2. Ballal S, Yadav M, Bal C. Early Results of 225 Ac-DOTATATE Targeted alpha therapy in metastatic gastroenteropancreatic neuroendocrine tumors: first clinical experience on safety and efficacy. *J Nucl Med* 2019;60:74.
3. Yadav MP, Ballal S, Sahoo RK, Bal C. Efficacy and safety of 225Ac-DOTATATE targeted alpha therapy in metastatic paragangliomas: a pilot study. *Eur J Nucl Med Mol Imaging* 2022;49:1595-1606.
4. Ma J, Li L, Liao T, et al. Efficacy and Safety of 225Ac-PSMA-617-Targeted alpha therapy in metastatic castration-resistant prostate cancer: a systematic review and meta-analysis. *Front Oncol.* 2022;12:796657.
5. Atallah E, Berger M, Jurcic J, et al. A Phase 2 Study of actinium-225 (²²⁵Ac)-lintuzumab in older patients with untreated acute myeloid leukemia (AML). *J Med Imaging Radiat Sci* 2019;50: S37.
6. Cederkrantz E, Andersson H, Bernhardt P, et al. Absorbed doses and risk estimates of (211)At-MX35 F(ab')₂ in Intraperitoneal therapy of ovarian cancer patients. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 2015;93:569-576.
7. Hallqvist A, Bergmark K, Bäck T, et al. Intraperitoneal α -Emitting Radioimmunotherapy with ²¹¹At in Relapsed ovarian cancer: long-term follow-up with individual absorbed dose estimations. *J Nucl Med* 2019;60:1073-1079.
8. Kratochwil C, Giesel FL, Bruchertseifer F, et al. ²¹³Bi-DOTATOC receptor-targeted alpha-radionuclide therapy induces remission in neuroendocrine tumours refractory to beta radiation: a first-in-human experience. *Eur J Nucl Med Mol Imaging* 2014;41:2106-2119.
9. Sathekge M, Knoesen O, Meckel M, et al. ²¹³Bi-PSMA-617 targeted alpha-radionuclide therapy in metastatic castration-resistant prostate cancer. *Eur J Nucl Med Mol Imaging.* 2017;44:1099-1100.
10. Rosenblat TL, McDevitt MR, Mulford DA, et al. Sequential cytarabine and alpha-particle immunotherapy with bismuth-213-lintuzumab (HuM195) for acute myeloid leukemia. *Clin Cancer Res.* 2010;16:5303-5311.
11. Allen BJ, Singla AA, Rizvi SM, et al. Analysis of patient survival in a Phase I trial of systemic targeted α -therapy for metastatic melanoma. *Immunotherapy.* 2011;3:1041-1050.
12. Autenrieth ME, Seidl C, Bruchertseifer F, et al. Treatment of carcinoma *in situ* of

the urinary bladder with an alpha-emitter immunoconjugate targeting the epidermal growth factor receptor: a pilot study. *Eur J Nucl Med Mol Imaging* 2018;45: 1364-1371.

13. Meredith RF, Torgue JJ, Rozgaja TA, et al. Safety and outcome measures of first-in-human intraperitoneal α radioimmunotherapy with ^{212}Pb -TCMC-Trastuzumab. *Am J Clin Oncol* 2018;41:716-721.
14. Eychenne R, Chérel M, Haddad F, et al. Overview of the most promising radionuclides for targeted alpha therapy: the "hopeful eight". *Pharmaceutics* 2021;13:906.

DINAMIKA DOLŽINE TELOMEROV V LEVKOCITIH PO ZDRAVLJENJU Z OBSEVANJEM PRI RAKU DOJK

Tanja Marinko^{1,2}, Sara Redenšek Trampuž³, Ana Trstenjak⁴, Vita Dolžan³, Katarina Trebušak Podkrajšek³, Katja Goričar³

¹ Onkološki inštitut Ljubljana, Zaloška cesta 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

⁴ Fakulteta za farmacijo, Univerza v Ljubljani, Aškerčeva 7, 1000 Ljubljana, Slovenija

Email: tmarinko@onko-i.si

Izvleček

Obsevanje je del standardnega zdravljenja bolnic z rakom dojk. Odgovor na zdravljenje z obsevanjem je pri vsakem posamezniku drugačen in je odvisen tudi od genetskih dejavnikov. Eden od novejših genetskih označevalcev odgovora na obsevanje je dolžina telomerov. Telomeri ščitijo kromosome pred krajšanjem in vzdržujejo genomsko stabilnost.

Rezultati naše raziskave kažejo, da se dinamika spreminjanja dolžine telomerov takoj po zdravljenju z obsevanjem in v šestih mesecih po obsevanju pri bolnicah z neinvazivnim rakom dojk spreminja in bi lahko služila kot biološki označevalec odgovora na obsevanje. Molekularni mehanizmi, povezani s tem procesom, ostajajo zaenkrat večinoma neraziskani.

Uvod

Rak dojk je najpogostejši rak pri ženskah. Duktalni karcinom *in situ* (DCIS) je neinvazivna oblika raka dojk, ki ga najpogosteje odkrijemo z mamografijo v okviru presejalnih programov (1). Pojavnost DCIS se povečuje in trenutno predstavlja približno 25 % na novo diagnosticiranih rakov dojk in 35 % rakov dojk, odkritih v presejalnih programih (2). Čeprav ima DCIS zelo dobro prognozo, se lahko razvije tudi v invazivno obliko raka dojk, ki lahko pomembno vpliva na preživetje bolnic. Po drugi strani pa pri nekaterih bolnicah bolezen ne bi nikoli napredovala, zato so lahko deležne preveč agresivnega in potencialno nepotrebnega zdravljenja (2).

Standardno zdravljenje DCIS temelji na ohranitveni operaciji dojk in dopolnilnem obsevanju. Obsevanje ne vpliva značilno na preživetje pri DCIS, vendar za 50 % zmanjša število lokalnih ponovitev bolezni, pri čemer se rak v polovici primerov ponovi kot invazivni rak dojk (1-3). Pri velikem deležu bolnic se po obsevanju pojavijo akutni ali pozni neželeni učinki. Akutni neželeni učinki se pojavijo med obsevanjem ali 3 mesece po obsevanju. Večinoma so reverzibilni, a vseeno vplivajo na potek zdravljenja in kakovost življenja. Pozni neželeni učinki se lahko pojavijo več mesecev ali let po obsevanju, so pogosto ireverzibilni ter se s časom stopnjujejo (4). Kljub pomembnemu kliničnemu napredku v diagnostiki in zdravljenju DCIS prilagajanje pooperativnega zdravljenja z obsevanjem posameznim bolnicam z DCIS trenutno še ni mogoče. Novejše raziskave pa so že pokazale, da lahko kombinacija kliničnih in molekularnih parametrov izboljša stratifikacijo bolnic z DCIS (5).

Na molekularni ravni lahko obsevanje neposredno poškoduje različne makromolekule, zlasti DNA. Vpliva na različne procese v celici, na primer na popravljanje napak na DNA in prenos molekularnih signalov ter posledično tudi na celični cikel in apoptozo. Prav tako vpliva na medcelično signalizacijo preko različnih dejavnikov, kot so na primer citokini in nekodirajoče RNA. Nekatere raziskave so že pokazale, da so genetski in epigenetski dejavniki lahko povezani z odzivom tumorja in zdravih tkiv na obsevanje, torej tudi s pojavom neželenih učinkov obsevanja. V naših predhodnih raziskavah so bili tako genetski polimorfizmi v poteh popravljanja napak na DNA in oksidativnega stresa povezani z neželenimi učinki obsevanja na koži in na srcu pri bolnicah z zgodnjim rakom dojke (6,7).

Nov potencialen genetski označevalec odgovora na obsevanje je tudi dolžina telomerov. Telomeri so nukleoproteinski kompleksi na koncih kromosomov, ki ščitijo kromosome pred krajšanjem in vzdržujejo genomsko stabilnost. Z vsako celično delitvijo se telomeri skrajšajo za 20 do 200 baznih parov, kar vodi v celično senescenco ali apoptozo (8). Na krajšanje telomerov lahko vplivajo številni dejavniki, na primer staranje, oksidativni stres, prehrana ter drugi okoljski dejavniki, pa tudi genetski in drugi molekularni dejavniki (9). To krajšanje v določenih celicah upočasni telomeraza, ključni encim za vzdrževanje telomerov (10). Spremembe v dolžini telomerov se odražajo tudi v levkocitih v periferni krvi, zato bi dolžina telomerov v levkocitih lahko predstavljala minimalno invaziven biološki označevalec (11).

Telomeri in mehanizmi, vključeni v njihovo vzdrževanje, imajo pomembno vlogo tudi pri nastanku in napredovanju raka (10). Telomerazna aktivnost je na primer v rakavih celicah pogosto povečana (10).

Pri raku dojke je bilo v predhodnih raziskavah ugotovljeno, da je dolžina telomerov povezana z invazivnostjo in stadijem bolezni (12,13). V edini raziskavi, v katero so bile vključene bolnice z DCIS, so v primerjavi z zdravimi kontrolami pri bolnicah opazili krajše telomere v prostocelični DNA v plazmi (14). Vloga dolžine telomerov pa pri raku dojke še vedno ni povsem pojasnjena, saj nedavne raziskave kažejo, da so lahko tako krajši kot daljši telomeri povezani s povečanim tveganjem za nastanek raka (15). Dolžina telomerov bi lahko predstavljala tudi napovedni dejavnik pri različnih oblikah raka, saj so bili krajši telomeri ob diagnozi večinoma povezani s slabšo prognozo, kljub nekaterim razlikam med posameznimi raziskavami (16,17). Žal večina raziskav ni merila dinamike dolžine telomerov, ki bi lahko bila bolj informativna (17). Kljub temu, da so dosedanje raziskave pokazale, da lahko izpostavljenost sevanju tako zmanjša kot poveča dolžino telomerov (9), raziskav, ki bi preučevale vlogo telomerov pri odzivu na obsevanje, še vedno ni. Celice s krajšimi telomeri pred zdravljenjem bi bile lahko bolj občutljive na obsevanje (9,10).

Na dinamiko dolžine telomerov v rakavih celicah vplivajo različni molekularni mehanizmi. Genetske in epigenetske spremembe lahko privedejo do aktivacije prepisovanja katalitične podenote telomeraze (TERT), ki je v normalnih celicah običajno neaktivna (13). Odkritih je bilo več polimorfizmov, povezanih z dolžino telomerov: v genih, ki kodirajo komponente telomeraze (TERT in TERC), ter genih, ki sodelujejo pri vzdrževanju in regulaciji telomerov (npr. RTEL1, TRF1 in TRF2). V genu TERT je bilo opisanih več pogostih potencialno funkcionalnih polimorfizmov posameznih nukleotidov, kot so rs2736098, rs2736100 in rs10069690.

Cilj naše raziskave je bil določiti dinamiko spreminjanja dolžine telomerov v levkocitih pri bolnicah z DCIS, zdravljenih s pooperativnim obsevanjem, in oceniti povezavo genetskih dejavnikov z dolžino telomerov v levkocitih.

Metode

Klinična raziskava

V prospektivno longitudinalno klinično raziskavo smo vključili bolnice z DCIS, zdravljene na Onkološkem inštitutu Ljubljana med letoma 2019 in 2022 v okviru redne klinične prakse z ohranitveno operacijo in pooperativnim obsevanjem. Vse bolnice so v raziskavo privolile prostovoljno in podale pisno soglasje, načrt raziskave pa je odobrila Komisija Republike Slovenije za medicinsko etiko (KME 0120-54/2015-2 (39/05/15) in 0120-54/2015-11). Pri bolnicah smo opravili klinični pregled ter jim odvzeli vzorce za krvne preiskave pred začetkom obsevanja, ob koncu obsevanja ter ob kontrolnem pregledu šest mesecev po obsevanju.

Molekularno-genetske metode

Genomsko DNA smo izolirali iz vzorcev periferne venske krvi, odvzetih pred začetkom obsevanja, po zaključku obsevanja in šest mesecev po zaključku obsevanja s pomočjo komercialnega kompleta reagentov E.Z.N.A. SQ Blood DNA Kit II (Omega Bio-Tek) in v skladu z navodili proizvajalca.

Za določanje dolžine telomerov v levkocitih smo uporabili monokromatsko multipleksno metodo s kvantitativnim PCR (monochrome multiplex quantitative realtime PCR, MMQPCR), ki so jo razvili Cawthon in sodelavci (18). Relativno dolžino telomerov (T/S) smo izrazili kot razmerje med telomernim PCR produktom (T) in količino referenčnega gena za albumin (S) posameznega vzorca.

Za genotipizacijo polimorfizmov TERT rs2736098 (g.6077C > T, p.Ala305=), rs2736100 (g.13647C > A) in rs10069690 (g.20373C > T) smo uporabili kompetitivni alelni specifični PCR (KASP, LGC Genomics).

Statistična analiza

Za opis kategoričnih spremenljivk smo uporabili frekvence, za opis zveznih spremenljivk pa mediano in interkvartilni razpon (25 %-75 %). Ker spremenljivke niso bile normalno porazdeljene, smo za primerjavo dolžine telomerov v različnih časovnih točkah uporabili Friedmanov in Wilcoxonov test za odvisne vzorce. Za primerjavo dolžine telomerov med različnimi skupinami smo uporabili Mann-Whitneyev in Kruskal-Wallisov test za neodvisne vzorce.

Rezultati

V raziskavo je bilo vključenih 89 bolnic z DCIS, zdravljenih z operacijo in pooperativnim obsevanjem. Mediana starost bolnic je bila 56 let (interkvartilni razpon 50 - 63 let).

Relativna dolžina telomerov v levkocitih je bila 0,47 (0,41 - 0,58) pred obsevanjem, 0,72 (0,63 - 0,88) takoj po obsevanju in 0,68 (0,56 - 0,79) 6 mesecev po obsevanju. Takoj po obsevanju se je dolžina telomerov statistično značilno povišala pri 81 (91,0 %) bolnicah

z DCIS ($P < 0,001$). Po šestih mesecih pa se je v primerjavi z vrednostmi po obsevanju dolžina telomerov statistično značilno znižala pri 52 (58,4 %) bolnicah z DCIS ($P = 0,043$). Vrednosti po 6 mesecih so bile pri 69 (77,5 %) bolnic še vedno višje kot pred obsevanjem ($P < 0,001$).

Frekvenca redkejšega alela je bila 27,0 % za rs2736098, 51,7 % za rs2736100 in 21,3 % za rs10069690. Nosilci vsaj enega polimorfnege alela T TERT rs2736098 so imeli statistično značilno višjo relativno dolžino telomerov v levkocitih pred obsevanjem kot nosilci dveh C alelov ($P = 0,020$). Polimorfizma rs2736100 in rs10069690 nista bila povezana z dolžino telomerov (Tabela 1).

Tabela 1. Vpliv polimorfizmov TERT na relativno dolžino telomerov pred obsevanjem pri bolnicah z DCIS.

Polimorfizem	Genotip	Relativna dolžina telomerov Mediana (25 % - 75 %)	P*
rs2736098	CC	0,44 (0,37 - 0,56)	Padd=0,007
	CT	0,52 (0,46 - 0,63)	
	TT	0,45 (0,38 - 0,47)	
	CT+TT	0,51 (0,44 - 0,6)	
rs2736100	CC	0,47 (0,41 - 0,55)	Padd=0,813
	CA	0,48 (0,41 - 0,61)	
	AA	0,49 (0,36 - 0,59)	
	CA+AA	0,48 (0,40 - 0,59)	
rs10069690	CC	0,50 (0,39 - 0,59)	Pdom=0,594
	CT+TT	0,47 (0,41 - 0,55)	

*P: primerjava dolžine telomerov med različnimi genotipi z Mann-Whitneyevim in Kruskal-Wallisovim testom; Padd: P-vrednost za aditivni model, Pdom: P-vrednost za dominantni model

Razprava in zaključek

Rezultati naše raziskave so pokazali, da se relativna dolžina telomerov v levkocitih poveča takoj po zdravljenju z obsevanjem pri večini bolnic z DCIS, a se po šestih mesecih spet delno zmanjša. Podobne rezultate so opazili v manjši raziskavi pri raku prostate, kjer je bila povprečna dolžina telomerov po obsevanju daljša (9). Po treh mesecih pa je bila povprečna dolžina telomerov ponovno blizu vrednosti pred zdravljenjem (9), česar pa v naši raziskavi na raku dojke nismo opazili, saj je bila pri večini bolnic dolžina telomerov še vedno nekoliko daljša. Predvidevajo, da lahko navidezno podaljšanje telomerov po obsevanju vsaj delno pripišemo celični smrti in spremembam v populacijah limfocitov, medtem ko mehanizmi, ki vplivajo na nadaljnje spremembe dolžine telomerov še niso povsem raziskani (9).

V naši pilotni raziskavi je bil pri bolnicah z DCIS, zdravljenih s pooperativnim obsevanjem, TERT rs2736098 značilno povezan z razlikami v dolžini telomerov v levkocitih pred zdravljenjem z obsevanjem. V predhodni raziskavi na raku dojke so prav

tako pokazali, da je rs2736098 povezan z dolžino telomerov (19). V meta-analizah je bil ta polimorfizem povezan tudi s povečanim tveganjem za razvoj kateregakoli raka, vendar z manjšim tveganjem za razvoj raka dojk (20).

Predpostavlja se, da bi lahko bili bolniki ob povečanem deležu celic s krajšimi telomeri po zdravljenju z obsevanjem bolj ogroženi zaradi poznih neželenih učinkov zdravljenja, bolniki z daljšimi telomeri pa bi lahko imeli povečano tveganje za nastanek sekundarnega raka (9). Za natančnejšo pojasnitev pomena dinamike spreminjanja dolžine telomerov po obsevanju in oceno vloge genetskih in drugih molekularnih dejavnikov na dolžino telomerov, so potrebne dodatne prospektivne raziskave.

Zahvala

Zahvaljujemo se vsem sodelavkam in sodelavcem Onkološkega inštituta Ljubljana, Medicinske fakultete v Ljubljani in Univerzitetnega Kliničnega Centra Ljubljana, ki sodelujejo v raziskavi, ter vsem bolnicam, ki so že ali pa še bodo privolile v sodelovanje v raziskavi.

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

Literatura

1. Solin LJ. Management of ductal carcinoma *in situ* (DCIS) of the breast: present approaches and future directions. *Curr Oncol Rep*. 2019;21(4):33.
2. Farante G, Toesca A, Magnoni F, et al. Advances and controversies in management of breast ductal carcinoma *in situ* (DCIS). *Eur J Surg Oncol*. 2022;48(4):736-41.
3. Rudloff U, Jacks LM, Goldberg JI, et al. Nomogram for predicting the risk of local recurrence after breast-conserving surgery for ductal carcinoma *in situ*. *J Clin Oncol*. 2010;28(23):3762-9.
4. De Ruysscher D, Niedermann G, Burnet NG, et al. Radiotherapy toxicity. *Nat Rev Dis Primers*. 2019;5(1):13.
5. Warnberg F, Karlsson P, Holmberg E, et al. Prognostic risk assessment and prediction of radiotherapy benefit for women with ductal carcinoma *in situ* (DCIS) of the Breast, in a Randomized Clinical Trial (SweDCIS). *Cancers*. 2021;13(23).
6. Goricar K, Dugar F, Dolzan V, Marinko T. NBN, RAD51 and XRCC3 polymorphisms as potential predictive biomarkers of adjuvant radiotherapy toxicity in early HER2-positive breast cancer. *Cancers*. 2022;14(18).
7. Marinko T, Stojanov Konda JT, Dolzan V, Goricar K. Genetic variability of antioxidative mechanisms and cardiotoxicity after adjuvant radiotherapy in HER2-positive breast cancer patients. *Dis Markers*. 2020;2020:6645588.
8. Eckburg A, Dein J, Berei J, et al. Oligonucleotides and microRNAs targeting telomerase subunits in cancer therapy. *Cancers*. 2020;12(9).
9. Luxton JJ, McKenna MJ, Lewis AM, et al. Telomere Length Dynamics and Chromosomal Instability for Predicting Individual Radiosensitivity and Risk via Machine Learning. *J Pers Med*. 2021;11(3).

10. Mirjolet C, Boidot R, Saliques S, et al. The role of telomeres in predicting individual radiosensitivity of patients with cancer in the era of personalized radiotherapy. *Cancer Treat Rev.* 2015;41(4):354-60.
11. Codd V, Nelson CP, Albrecht E, et al. Identification of seven loci affecting mean telomere length and their association with disease. *Nat Genet.* 2013;45(4):422-7, 7e1-2.
12. Barczak W, Rozwadowska N, Romaniuk A, et al. Telomere length assessment in leukocytes presents potential diagnostic value in patients with breast cancer. *Oncology letters.* 2016;11(3):2305-9.
13. Ceja-Rangel HA, Sanchez-Suarez P, Castellanos-Juarez E, et al. Shorter telomeres and high telomerase activity correlate with a highly aggressive phenotype in breast cancer cell lines. *Tumour Biol.* 2016;37(9):11917-26.
14. Wu X, Tanaka H. Aberrant reduction of telomere repetitive sequences in plasma cell-free DNA for early breast cancer detection. *Oncotarget.* 2015;6(30):29795-807.
15. Dratwa M, Wysoczanska B, Brankiewicz W, et al. Relationship between telomere length, TERT genetic variability and TERT, TP53, SP1, MYC gene co-expression in the clinicopathological profile of breast cancer. *Int J Mol Sci.* 2022;23(9).
16. Xu J, Chang WS, Tsai CW, et al. Leukocyte telomere length is associated with aggressive prostate cancer in localized prostate cancer patients. *EBioMedicine.* 2020;52:102616.
17. Ennour-Idrissi K, Maunsell E, Diorio C. Telomere Length and Breast Cancer Prognosis: A Systematic Review. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev.* 2017; 26(1):3-10.
18. Cawthon RM. Telomere length measurement by a novel monochrome multiplex quantitative PCR method. *Nucleic Acids Res.* 2009;37(3):e21.
19. Bojesen SE, Pooley KA, Johnatty SE, et al. Multiple independent variants at the TERT locus are associated with telomere length and risks of breast and ovarian cancer. *Nat Genet.* 2013;45(4):371-84, 84e1-2.
20. Zhang X, Chen Y, Yan D, et al. TERT Gene rs2736100 and rs2736098 Polymorphisms are associated with increased cancer risk: a meta-analysis. *Biochem Genet.* 2022;60(1):241-66.



RIMER PREGLEDA LITERATURE STEREOTAKTIČNEGA OBSEVANJA TREBUŠNE SLINAVKE SKOZI OČI RADIOLOŠKEGA INŽENIRJA

Irena Oblak¹, Nena Galunič², Valerija Žager Marciuš^{1,3}

¹ Oddetek za teleradioterapijo, Onkološki inštitut Ljubljana, Zaloška cesta 2, 1000 Ljubljana, Slovenija

² Oddetek za onkologijo, Enota za radioterapijo, Univerzitetni klinični center Maribor, Ljubljanska ulica 5, 2000 Maribor, Slovenija

³ Oddetek za radiološko tehnologijo, Zdravstvena fakulteta, Univerza v Ljubljani, Zdravstvena pot 5, 1000, Ljubljana, Slovenija

Elektronski naslov: vzager@onko-i.si

Izvleček

Rak trebušne slinavke ali kot mu tudi rečemo »tihi rak«, je bolezen, ki jo praviloma odkrijemo pozno, v bolj napredovali obliki, ko je bolezen običajno že neozdravljiva. Kakovost življenja teh bolnikov je lahko zelo okrnjena. Za raziskovanje pomena uvedbe stereotaktičnega obsevanja pri raku trebušne slinavke smo se odločili, ker smo želeli s pomočjo pregleda literature raziskati dobrobit in smiselnost tovrstnega zdravljenja pri omenjenem raku.

Uporabili smo deskriptivno metodo in sistematični pregled literature, kjer smo si določili namen, izbrali vire znanstvene literature, opredelili ključne iskalne besede, ter izvedli iskanje. Skupno smo identificirali 16536 virov, s presejanjem smo pridobili 134 virov za natančnejšo analizo. Glede na ustreznost celotnega besedila smo v rezultate vključili 22 najustrežnejših virov. Iskanje je potekalo od 10. 1. 2022 do 29. 9. 2022. Za deskriptivni del smo glede na zanesljivost in uporabnost podatkov uporabili skupno 78 virov.

Pri mejno operabilnih bolnikih lahko stereotaktična radioterapija pripomore k zmanjšanju tumorja in zajetega žilja in omogoči popolno kirurško odstranitev bolezni. Pri lokalno napredovalih tumorjih, ki so neresektabilni, pa omogoči visoko stopnjo lokalne kontrole, ki je po uspešnosti primerljiva kirurški resekciji. V večini študij v pregledu literature je delež enoletne lokalne kontrole raka trebušne slinavke med 78 % in vse do 94 %, ob zadovoljivo nizki stopnji toksičnosti.

Glede na to, da je lokalna kontrola po stereotaktični radioterapiji odlična, je v bodoče pričakovana tudi kombinacija tovrstnega pristopa obsevanja z ostalimi metodami zdravljenja, predvsem sistemskim zdravljenjem z novimi citostatiki, tarčnimi zdravili in morebitno imunoterapijo.

Ključne besede: rak trebušne slinavke, radioterapija, stereotaktična radioterapija

Uvod

Rak trebušne slinavke ali kot mu tudi rečemo »tihi rak«, je bolezen, ki jo praviloma odkrijemo pozno, v bolj napredovali obliki in ima velik metastatski potencial raka (1). Bolezenski znaki so praviloma neznačilni, zato bolniki na njih običajno niso pozorni. Pojavijo se šele v bolj napredovali fazi, ko je bolezen običajno že napredovala in je neozdravljiva (2). Kakovost življenja teh bolnikov je lahko zelo okrnjena, saj jih pogosto spremlja izguba telesne teže, anoreksija, hujše bolečine in številne druge težave (3). Odločitev o načinu zdravljenja posameznega bolnika sprejme multidisciplinarni konzilij.

V kolikor je bolezen resektabilna, je bolnik operiran, v nasprotnem primeru pa paliativno zdravljen s specifično onkološkim zdravljenjem (operacija, obsevanje, sistemska terapija) ali pa le z analgetiki ali drugimi metodami, ki mu lajšajo težave, ki mu jih povzroča tumor ali oddaljeni zasevki (4,5).

Stereotaktično radioterapijo, ang. Stereotactic Body Radiotherapy (SBRT), najpogosteje uporabimo kot radikalno metodo zdravljenja pri bolnikih z neresektabilno boleznijo ali v primeru, ko gre za neoperabilnega bolnika, kjer operacijo onemogočajo sočasne bolezni ali bolnik operacijo odkloni. Kot predoperativno (neoadjuvantno) zdravljenje jo običajno uporabljamo v kombinaciji s kemoterapevtskim zdravljenjem (KT) (1,6). SBRT uporabljamo tudi kot reiradiacijo, ponovno obsevanje po konvencionalni radioterapiji (6). Sveže diagnostične preiskave (opravljene znotraj šestih tednov pred načrtovanim začetkom obsevanja) pregledata dva specialista radioterapevta onkologa in ocenita tehnično izvedljivost varne SBRT. Vsaj en teden pred pripravo na obsevanje se lahko ultrazvočno ali endoskopsko vstavijo radiopačni markerji v tumor ali njegovo neposredno okolico, za namen sledenja (slikovna verifikacija) tarčnega volumna pred in/ali med izvedbo obsevanja z računalniško tomografijo s stožčastim snopom, ang. Cone Beam Computed Tomography (CBCT). Bolniku pred obsevanjem uvedejo inhibitor protonske črpalke, ki služi kot zaščita za morebitne kasne gastrointestinalne zaplete, ter mu svetujejo, da ne uživa hrane 3 ure pred izvedbo SBRT (7,8). Na računalniško tomografskem, ang. Computed Tomography (CT) simulatorju bolnika pripravimo na obsevanje z vakuumsko blazino, ter opravimo CT slikanje po protokolu za SBRT v dveh serijah: z abdominalno kompresijo in intravenozno (i.v.) aplikacijo kontrastnega sredstva (KS) v arterijski in venski fazi ter štiri dimenzionalno računalniško tomografijo (4D CT) (7,8) in uporabo sistema sledenja dihanja, ki se imenuje angl. Respiratory Gating System for Scanners - RGSC, (Varian) (9). Pred kompresijskim pasom se je na linearnih pospeševalnikih (Varian) za kompresijo uporabljal nastavek za kompresijo. Nastavek za kompresijo se še vedno uporablja na linearnih pospeševalnikih (Elekta). Pri pripravi bolnika na obsevanje raka trebušne slinavke vedno opravimo še pripravo na MR simulatorju za potrebe načrtovanja obsevanja (7,8). Za raziskovanje pomena uvedbe stereotaktičnega obsevanja pri raku trebušne slinavke smo se odločili, ker smo želeli s pomočjo pregleda literature raziskati dobrobit in smiselnost tovrstnega zdravljenja pri omenjenem raku.

Metode dela

Uporabili smo deskriptivno metodo in sistematični pregled literature. Pred izvedbo sistematičnega pregleda literature smo si določili namen pregleda, izbrali vire znanstvene literature, dostopne preko oddaljenega dostopa tujih strokovnih bibliografskih baz (Science Direct, SpringerLink, PubMed, ResearchGate), opredelili ključne iskalne besede, ter izvedli iskanje. V sklopu identifikacije smo v bazah Sciencedirect, SpringerLink in PubMed skupno našli 16536 virov. Izključili smo vire glede na izključitvene kriterije in ustreznost naslova in/ali izvlečka ter pridobili 134 virov za natančnejšo analizo. Glede na ustreznost celotnega besedila smo v rezultate vključili 22 najustreznejših virov. Iskanje je potekalo od 10. 1. 2022 do 29. 9. 2022. Glede na zanesljivost in uporabnost podatkov smo za deskriptivni del uporabili skupno 78 virov, ki smo jih smo črpali iz znanstvene literature, ki je bila dostopna v knjižnici Univerzitetnega kliničnega centra Maribor, ter preko oddaljenega dostopa iz tujih strokovnih bibliografskih baz (Science Direct,

SpringerLink, PubMed, DiKUL, ResearchGate) ter na strokovnih straneh svetovnega spleta. Uporabili smo tudi interne vire Onkološkega inštituta Ljubljana.

Rezultati

Predstavili smo analizo znanstvene literature na temo stereotaktičnega obsevanja raka trebušne slinavke glede na zastavljen namen in cilje (Tabela 1).

Tabela 1: Analiza rezultatov pregleda znanstvene literature glede uporabe in pomena SBRT pri raku trebušne slinavke

Dokument	N	Najpogostejša skupna doza	Št. frakcij	LK v 1 letu (%)	Akutna toksičnost					Razred AT	Delež AT (%)	Mediana preživetja (v mesecih)
					EORTC/ROG				CT-CAE			
					1	2	3	4	5			
Koong et al., 2004	15	15–25 Gy	1	80	Da	Da	Ne	Ne	-	1–2	33	11 (od diagnoze)
Hoyer et al., 2005	22	45 Gy	3	57	Da	Da	Da	Da	-	≥ 2	79	5,7 (od diagnoze)
										4	4,5	
Koong et al., 2005	19 (16)	25 Gy (boost)	1	94	Da	Da	Da	Ne	-	1–2	69	8,3 (od diagnoze)
										3	12,5	
Chang et al., 2008	77	25 Gy	1	84	/	Da	Da	Ne	-	≥ 2	5	11,4 (od diagnoze)
Murphy et al., 2010	73	25 Gy	1	/	/	Da	Da	Da	-	2	8	/
										3	5	
										4	3	
Mahadevan et al., 2010	36	24–36 Gy	3	78 (v 2 letih)	Da	Da	Da	Ne	-	1–2	33	14,3 (od SBRT)
										3	8	
Polistina et al., 2010	23	30 Gy	3	82,6	Da	Ne	Ne	Ne	-	1	21,7	10,6
Didolkar et al., 2010	85	15–30 Gy	3	91,7	/	/	Da	Da	-	≥ 3	22,3	18,6 (od diagnoze) 8,65 (od SBRT)
Mahadevan et al., 2011	47 (39)	24–36 Gy	3	85 (v 21 mes.)	Da	Da	Ne	Ne	-	1–2	41	20 (od diagnoze)
Schellenberg et al., 2011	20	25 Gy	1	94	/	Da	Ne	Ne	-	2	15	11,8 (od diagnoze)
Goyal et al., 2012	19	22–30 Gy	1–3	65	Da	Da	Da	Ne	Ne	CTCAE v3.0		14,4 (od SBRT)
										1–2	11	
										3	16	
Kim et al., 2012	26	24–36 Gy	1–3	41,2	Da	Da	Ne	Ne	-	/		7,6 (od SBRT)
Chuong et al., 2013	73	35(–50) Gy (na vpleteno žilje) 25(–30) Gy (na tumor)	5	81	Da	Da	Ne	Ne	Ne	CTCAE v 4.0		16,4 (mejno resektabilen)
										/	/	15 (lokalno napredoval)

Gurka et al., 2013	11	25 Gy	5	40	Da	Da	Ne	Ne	Ne	CTCAE v3.0	12,2
										1 60	
Pollom et al., 2014	76	25 Gy	1	/	Da	Da	Da	Da	Ne	CTCAE v4.0	13,6 (od diagnoze)
										≥ 2 16,2	
										≥ 3 8,1	
	91	25–45 Gy	5	/	Da	Da	Da	Da	Ne	7,8	
Comito et al., 2017	31	45 Gy	6	90	Da	Da	Ne	Ne	Ne	CTCAE v4.0	18 (od SBRT) 44 (od diagnoze)
										1–2 57	
Koong et al., 2017	23	25 Gy (reiradiacija)	1 ali 5	/	/	Da	Da	Ne	Ne	2–3 26,1	27,5 (od diagnoze) 8,5 (od SBRT)
Jumeau et al., 2018	21	30–35 Gy	5–6	57	Da	Da	Ne	Ne	Ne	CTCAE v4.0	9 (od SBRT)
										1–2 24	
Toesca et al., 2020	149	20–45 Gy	3 ali 5 ali 6	86	/	Da	Da	Da	Da	CTCAE v4.0	16 (od SBRT)
										≥ 2 10–15	
										≥ 3 6–7	
										4 0,6	
										5 0,6	
Li et al., 2020	27	25–50 Gy	4–7	37	Da	Da	Da	Ne	Ne	CTCAE v4.0	11,3 (od SBRT)
										1–2 77,8	
										3 3,7	
Augustyn et al., 2021	12	25 Gy + boost 33–40 Gy	5	87	/	Da	Ne	Ne	Ne	CTCAE v5.0	13 (od SBRT)
										2 17	
Moningi et al., 2021	96	mediana 36–38 Gy	5	/	Da	/	/	/	Ne	CTCAE v4.0	25–30 (od diagnoze)

Legenda: N - število udeležencev; LK - lokalna kontrola tumorja; AT - akutna toksičnost; / - ta podatek ni podan v študiji; - ni podatkov; EORTC/RTOG - angl. European Organization for Research and Treatment of Cancer/Radiation Therapy Oncology Group; CTCAE - angl. Common Terminology Criteria for Adverse Events

Razprava

Skupna doza se je pri študijah močno razlikovala, saj je znašala od najmanj 15 Gy in do največ 50 Gy. Razlikovalo se je tudi število frakcij, ki jih je bilo od najmanj ene do največ sedem. V večini študij v pregledu literature je delež enoletne lokalne kontrole med 78 % in vse do 94 %, zato lahko trdimo, da SBRT omogoča visoko enoletno kontrolo. V večjem deležu so zaznane le nižje stopnje toksičnosti, in sicer stopnje 1 ali 2. Višje stopnje toksičnosti se pojavijo le izjemoma in v zelo majhnem deležu. Uporaba eno frakcijske SBRT se je izkazala za precej bolj toksično metodo, medtem ko so pri primerih z več frakcijami zaznali sprejemljivejšo toksičnost. Študije potrjujejo, da sta SBRT in KT odlična kombinacija. SBRT izvedemo po KT pri bolnikih, ki so v dobrem stanju in nimajo oddaljene metastatske bolezni. Uporabljamo jo v primerih, ko je pred operacijo potrebno zmanjšanje velikosti tumorja, ter sočasno uničenje mikrozasevkov, z namenom, da se lahko z operacijo doseže popolna kirurška odstranitev. Pri lokalno napredovali bolezni pri bolnikih, ki so neresektibilni, lahko SBRT ohranja visoko stopnjo lokalne kontrole bolezni. V glavnem SBRT ne vpliva bistveno na izboljšanje preživetja bolnikov z rakom trebušne slinavke, najverjetneje zaradi visokega metastatskega potenciala bolezni, a manjše spremembe se nakazujejo.

Zaključek

Tekom pregleda literature je bilo moč zaznati tudi določene omejitve študij. Ena izmed teh je bila kratek čas spremljanja bolnikov, zaradi značilnega hitrega napredovanja bolezni. Zaradi kratke življenjske dobe bolnikov je zelo težko ocenjevati pozno toksičnost. Kot oteževalno okoliščino za primerjave študij zdravljenja raka s SBRT bi izpostavili raznolikost bolnikov, v smislu različnega poteka bolezni in predhodnega zdravljenja. Prav tako je težko ocenjevati vsakršno novonastalo spremembo, ki bi morebiti bila posledica toksičnosti obsevanja s tehniko SBRT, saj se pogosto prepletajo s napredovanjem bolezni. SBRT se raziskuje in množično uporablja z namenom zmanjšanja obremenitev bolnika, povečanja lokalne kontrole bolezni (ob sprejemljivi toksičnosti), povečanja možnosti resektabilnosti tumorjev, ter skrajšanja časa celotnega zdravljenja in s tem izogib zamude sistemske terapije.

Literatura

1. Oblak I, Potrč S. Raki zgornjih prebavil: Rak trebušne slinavke. V: Strojman P, Hočevar M, urednika. Onkologija: Učbenik za študente medicine. Ljubljana: Onkološki inštitut Ljubljana; 2018: 588-591.
2. Ocvirk A. Rak trebušne slinavke: Kaj morate vedeti o bolezni? Ljubljana: Onkološki inštitut Ljubljana; 2008.
3. Partelli S, Sclafani F, Barbu ST, Beishon M, Bonomo P, Braz G, et al. European Cancer Organisation Essential Requirements for Quality Cancer Care (ERQCC): Pancreatic Cancer. Cancer Treat Rev 2021; 99: 102-208.
4. Kovač V. Uvod v onkologijo: Terapevtski algoritmi v onkologiji. V: Strojman P, Hočevar M, urednika. Onkologija: Učbenik za študente medicine. Ljubljana: Onkološki inštitut Ljubljana; 2018: 32-35.
5. NCCN Guidelines for Patients Pancreatic Cancer. National Comprehensive Cancer Network; 2021.
6. Wang K, Wang AZ, Tepper JE. Pancreatic Cancer. V: Kaidar-Person O, Chen R, urednika. Hypofractionated and Stereotactic Radiation Therapy. Springer, Cham. Onkološki inštitut Ljubljana. Protokol za stereotaktično obsevanje tumorjev jeter. Onkološki inštitut Ljubljana; 2019.
7. Onkološki inštitut Ljubljana. Protokol za stereotaktično obsevanje tumorjev trebušne slinavke. Onkološki inštitut Ljubljana; 2019.
8. Schick P, Gottschlag H, Fielitz O, Budach W, Simiantonakis I. Performance evaluation and first clinical experience with the Varian RGSC module for breath detection of 15 lung cancer patients. Int J Radiat Oncol Biol Phys 2019; 29 (3): 229-238.



NOVEJŠI PRISTOPI K ZDRAVLJENJU MEZOTELIOMA PLEVRE

Danijela Štrbac¹, Vita Dolžan²

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

² Inštitut za Biokemijo, Laboratorij za farmakogenetiko, Zemljemerska ulica 12, 1000 Ljubljana, Slovenija

Elektronski naslov: dstrbac@onko-i.si

Izvleček

Pleuralni mezoteliom je redek tumor katerega zdravljenje kljub sodobnemu pristopu z imunoterapijo ne prinaša želenih rezultatov, zaradi slabše imunološke odzivnosti tumorja in njegove genetske raznolikosti. Novejši pristopi k zdravljenju se osredotočajo predvsem na tumorske vakcine, CAR-T terapijo in gensko terapijo. Raziskovanje miRNA pa odkriva tudi nove biološke označevalce pri mezoteliomu.

Uvod

Redki tumorji kot je mezoteliom so že desetletja diagnostičen in terapevtski izziv. Historičen pristop s trimodalnim zdravljenjem (operacija, obsevanje in kemoterapija) se pri mezoteliomu ni izkazal za učinkovitega, posebej pri napredovali bolezni. Tako se je pri mezoteliomu v prvi liniji zdravljenja uveljavila imunoterapija, bodisi z nivolumabom ali pembrolizumabom. Ker pa je mezoteliom molekularno in genetsko heterogena bolezen, ostajajo izzivi za uspešno zdravljenje.

Izzivi imunoterapije pri mezoteliomu

Mikrookolje pri mezoteliomu lahko povzroča imunološko rezistenco, oz. imunološko »hladen« tumor. Vzrok je lahko obilna prisotnost tumorsko povezanih makrofagov (TAM- tumor associated macrophages) in mileoidnih supresorskih celic (MDSC- myeloid derived suppressor cells). Prisotnost TAM povzroči imunosupresiven fenotip, MDSC pa ustavijo proliferacijo T-celic, ki so bistvene za odziv na imunoterapijo (1). Pomemben mehanizem rezistence na imunoterapijo je tudi ekspresija VISTA (V-domain Ig-containing suppressor of T-cell activation), ki je gen imunske regulacije in je močno izražen pri mezoteliomu, predstavlja pa morebitno tarčo za premagovanje imunske rezistence (2). Kot mehanizem premagovanja imunološke rezistence je predlagana tudi terapija z dendritičnimi celicami, ki pa je še v fazi predkliničnih raziskav (3).

Vakcine pri mezoteliomu

Različni tipi vakcin so že desetletja preizkušani pri mezoteliomu, največkrat adenovirusi v kombinaciji s kemoterapijo. Zanimiv je pristop z že znanim adenovirusnim vektorjem in aktivacijo TWIST 1 proteina, ki inducira T-limfocitni celični odgovor in poveča imunske odzivnosti tkiva na imunoterapijo (4).

CAR-T celična terapija pri mezoteliomu

CAR-T celice prepoznajo antigene na celični površini in povzročijo lizo tumorskih celic. Za solidne tumorje je izdelava in učinkovitost CAR-T celic precejšen izziv. Pri mezoteliomu pa so CAR-T celice usmerjene na mezotelin, ki je močno izražen. Študija, ki je bila opravljena pri sicer majhnem številu bolnikov je vključevala tudi pembrolizumab, ki preko inhibicije PD1 spodbudi delovanje CAR-T celic. Vključeni bolniki so imeli napredovalo bolezen, vendar so bili rezultati obetavni z medianim preživetjem 23 mesecev (5).

Genska terapija mezotelioma

Predlagani pristopi h genski terapiji so bodisi pred ali postranskripcijski. Ker so genetske mutacije in okvare pri mezoteliomu zelo heterogene (kromosomske delecije regije 9p, mutacije tumor supresorskih genov in epigenetskih regulatorjev), so raziskovali kromosomske aberacije, ki bi lahko vplivale na imunoterapijo in aplikacijo virusnih vakcin.

Zanimive so predklinične raziskave z interferenčno RNAi in shRNA (short hairpin RNA), ki lahko ustavijo izražanje timidilatne sintaze (TM).

Največ študij pa je bilo usmerjenih v raziskovanje miRNA in sicer miR15/16 in miR-126. MiR15/16 se vežejo na FGF (fibroblast growth factor) receptorje fibroblastov in ustavijo proliferacijo tumorskih celic v celičnih linijah. MiR-126 pa vpliva na angiogenezo. Zanimivo je, da lahko povečano izražanje miR-137 deluje kot slab napovedni dejavnik pri bolnikih z mezoteliomom, vendar v kombinaciji z YBX1 (Y-box binding protein 1) deluje supresivno na rast celičnih linij (6,7).

Novejši genetski markerji

Raziskovanje miRNA ima lahko vlogo tako pri zdravljenju kot pri odkrivanju novih bioloških označevalcev. Goričar et al so raziskali serumske vezikle z miR-103-3p, miR-126-3p in miR-625-3p ter ugotovili, da so bolniki z višjo ekspresijo miR-625-3p in miR-126-3p imeli slabši odgovor na zdravljenje. Relativno zvišanje vrednosti miR-625-3p je prineslo 3,2 % nižje preživetje brez progressa pri raziskani kohorti okoli 200 bolnikov (8).

Zaključki

Novejši pristopi k zdravljenju odpirajo več možnosti za bolnike z redkimi boleznimi kot je plevralni mezoteliom, vendar še vedno ostajajo ovire pri že uveljavljenem zdravljenju z imunoterapijo. V prihodnosti pa se obetajo premiki v genetskih raziskavah, ki bodo pomembne tako za odkrivanje novih terapevtskih tarč kot za odkrivanje bioloških označevalcev.

Literatura

1. Van den Ende T, van den Boorn HG, Hoonhout NM, et al. Priming the tumor immune microenvironment with chemo(radio)therapy: A systematic review across tumor types. *Biochim Biophys Acta Rev Cancer*. 2020;1874:188386

2. Chung YS, Kim M, Cha YJ, et al. Expression of V-set immunoregulatory receptor in malignant mesothelioma. *Mod Pathol*. 2020;33:263–270.
3. Cornelissen R, Hegmans JPJJ, Maat APWM, et al. Extended tumor control after dendritic cell vaccination with low-dose cyclophosphamide as adjuvant treatment in patients with malignant pleural mesothelioma. *Am J Respir Crit Care Med*. 2016;193:1023–1031.
4. Haakensen VD, Nowak AK, Ellingsen EB, et al. NIPU: A randomised, open-label, phase II study evaluating nivolumab and ipilimumab combined with UV1 vaccination as second line treatment in patients with malignant mesothelioma. *J Transl Med*. 2021;19:232.
5. Castelletti L, Yeo D, van Zandwijk N, Rasko JEJ. Anti-mesothelin CAR T cell therapy for malignant mesothelioma. *Biomark Res*. 2021;9:11.
6. Schelch K, Kirschner MB, Williams M, Cheng YY, Zandwijk N, Grusch M, Reid G. A link between the fibroblast growth factor axis and the miR-16 family reveals potential new treatment combinations in mesothelioma. *Mol Oncol*. 2017;12:58–737.
7. Monaco F, Gaetani S, Alessandrini F, et al. Exosomal transfer of miR-126 promotes the anti-tumour response in malignant mesothelioma: Role of miR-126 in cancer-stroma communication. *Cancer Lett*. 2019;463:27–36.
8. Goričar K, Holcar M, Mavec N, et al. Extracellular vesicle enriched miR-625-3p Is associated with survival of malignant mesothelioma patients. *J Pers Med*. 2021;11(10):1014.

FIZIKALNI MODELI IMUNOTERAPIJE IN RADIOTERAPIJE

Damijan Valentinuzzi¹, Martina Vrankar², Katja Uršič Valentinuzzi^{2,3}, Mojca Unk², Olga Gordeeva⁴, Alen Hadžić⁴, Gregor Serša^{2,5}, Maja Čemažar^{2,6}, Robert Jeraj^{1,7}

¹ *Fakulteta za matematiko in fiziko, Univerza v Ljubljani, Jadranska ulica 19, 1000 Ljubljana, Slovenija*

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

³ *Biotehniška fakulteta, Univerza v Ljubljani, Jamnikarjeva ulica 101, 1000 Ljubljana, Slovenija*

⁴ *Medicinska fakulteta, Univerza v Ljubljani, Vrazov trg 2, 1000 Ljubljana, Slovenija*

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

⁶ *Fakulteta za vede o zdravju, Univerza na Primorskem, Polje 42, 6310 Izola, Slovenija*

⁷ *Department of Medical Physics, University of Wisconsin-Madison, 1111 Highland Ave, Madison, WI 53705-2275, ZDA*

Elektronski naslov: damijan.valentinuzzi@fmf.uni-lj.si

Izvleček

V prispevku bomo predstavili rezultate fizikalnih modelov imunoterapije, ki smo jih razvili v programski skupini Medicinska fizika na Fakulteti za matematiko in fiziko Univerze v Ljubljani. Glavni cilj raziskav je bila prepoznavna bioloških značilnosti tumorjev, od katerih je odvisen odziv na zdravljenje s protitelesi receptorja programirane celične smrti 1 (angl. anti-programmed-death-1 (anti-PD-1)). Posebno pozornost smo namenili meritvam modelskih parametrov ter preverbi rezultatov modeliranja, kar je eden izmed predpogojev za uspešno translacijo modeliranja v rutinsko predklinično in klinično prakso. Predstavili bomo tudi načrte za prihodnost, tj. modeliranje kombinacije anti-PD-1 in radioterapije.

Uvod

Imunoterapija z zaviralci imunskih kontrolnih točk je v zadnjem desetletju spremenila način zdravljenja mnogih vrst raka (1). Kljub izjemnim rezultatom – možne so celo popolne ozdravitve nekaterih napredovalih vrst raka, kot sta npr. metastatski melanom in nedrobnocelični rak pljuč – ostaja odprtih še veliko vprašanj. Medtem ko je imunoterapija z anti-PD-1 pri nekaterih vrstah raka izjemno uspešna, so rezultati pri drugih vrstah še vedno slabi (2). Hkrati pa so tudi pri tistih vrstah raka, pri katerih imunoterapija velja za uspešno, bolniki, ki odgovorijo na zdravljenje, še vedno v manjšini. Posledično bi bilo bistvenega pomena odkriti najpomembnejše biološke značilnosti tumorjev, od katerih je odvisen odziv na imunoterapijo, definirati optimalna kombinirana zdravljenja in razviti nove generacije in načine imunoterapij. Vse skupaj pa bo težko uresničljivo z zanašanjem izključno na klinične študije, ki so navadno dizajnirane po principu “poskusov in napak” (angl. trial-and-error) in so večinoma drage ter zamudne. Število različnih imunoterapij (brez upoštevanja vseh možnih kombinacij in načinov doziranja) se je namreč v zadnjih letih izjemno povečalo (3).

Cilji naših raziskav so bili: (1) razviti mehanistični model po načelu od spodaj navzgor (ang. bottom-up) za simulacijo odziva tumorjev na imunoterapijo anti-PD-1, (2) preveriti model na podatkih iz literature, (3) preveriti model z lastnimi eksperimentalnimi podatki in (4) raziskovati, katere biološke značilnosti tumorjev bistveno vplivajo na odziv na imunoterapijo.

Mehanistični model imunoterapije anti-PD-1 po načelu od spodaj navzgor

Osnovni mehanistični model, ki smo ga najprej razvili, je prikazan z enačbami En.1 – En.4 (4).

$$\frac{dC}{dt} = k \cdot C \cdot \ln\left(\frac{C_{max}}{C + C_{dead}}\right) - a \cdot SNV \cdot MHC I \cdot \left(1 - PDL1 \cdot PD1 \cdot \left(1 - PD1_{occup}(D, t)\right)\right) \cdot TIL \cdot C \quad \text{En. 1}$$

$$\frac{dTIL}{dt} = b \cdot SNV \cdot (C + C_{dead})^{\frac{2}{3}} - a \cdot SNV \cdot MHC I \cdot PDL1 \cdot PD1 \cdot \left(1 - PD1_{occup}(D, t)\right) \cdot TIL \cdot C - d \cdot TIL \quad \text{En. 2}$$

$$\frac{dC_{dead}}{dt} = a \cdot SNV \cdot MHC I \cdot \left(1 - PDL1 \cdot PD1 \cdot \left(1 - PD1_{occup}(D, t)\right)\right) \cdot TIL \cdot C - l \cdot C_{dead} \quad \text{En. 3}$$

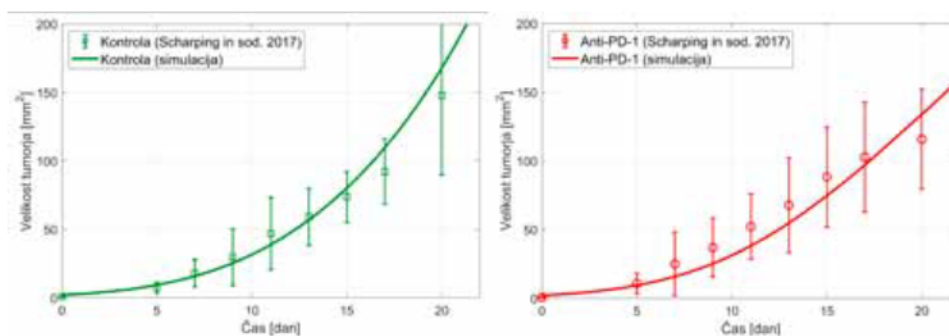
$$V(t) = \frac{4}{3}\pi r_c^3 \cdot (C(t) + C_{dead}(t)) + \frac{4}{3}\pi r_{TIL}^3 \cdot TIL(t) \quad \text{En. 4}$$

Biologija v modelu je poenostavljena. Model namenoma vsebuje le tiste spremenljivke in parametre, ki so bistveniza simulacijo imunoterapije anti-PD-1, saj smo želeli, da model omogoča eksperimentalno preverbo. Opisuje interakcije med dvema bistvenima tipoma celic: tumorskimi celicami (C) in tumor infiltrirajočimi limfociti T (TIL). Poleg tega vsebuje tudi tiste biološke parametre, za katere je znano, da so vpleteni v imunoterapijo anti-PD-1, kot npr. tumorsko mutacijsko breme, ki navadno dobro korelira s številom enojnih nukleotidnih variacij (angl. single nucleotide variations (SNV)), izraženost pglavitnega kompleksa tkivne skladnosti (angl. major histocompatibility complex (MHC)) razreda I na tumorskih celicah ter interakcije med receptorji PD-1 na limfocitih T in njihovimi ligandi na tumorskih celicah (PD-L1), s katerimi tumorske celice lahko omejijo imunski odziv. Večina parametrov v modelu je fiksnih in povzetih iz literature – le štirje parametri so prosti in pridobljeni s prilagajanjem modela eksperimentalnim podatkom iz literature. Zainteresirani bralec lahko njihove definicije, vrednosti in reference najde v (4).

Opis členov v modelskih enačbah:

- En. 1, prvi člen: Gompertzova funkcija – intrinzična rast tumorja v odsotnosti imunskega sistema.
- En. 1, drugi člen: odmiranje tumorskih celic zaradi interakcij z imunskim sistemom.
- En. 2, prvi člen: infiltracija TIL v tumor.
- En. 2, drugi člen: odmiranje TIL zaradi interakcij s tumorskimi celicami.
- En. 2, tretji člen: odmiranje TIL zaradi naravne smrti.
- En. 3, prvi člen: nastajanje mrtvih tumorskih celic (glej En. 1).
- En. 3, drugi člen: odstranjevanje mrtvih tumorskih celic iz tumorja.
- En. 4, prvi člen: celokupen volumen tumorskih celic.
- En. 4, drugi člen: celokupen volumen TIL.

Modelske napovedi smo ovrednotili na dveh neodvisnih predkliničnih študijah z melanomom B16, v katerih so avtorji uporabili drugačno število nasajenih celic, drugačno dozo ali urnik doziranja v primerjavi s študijo, na katero smo prilagajali proste parametre (5,6). Rezultati ujemanja modelskih napovedi z eksperimenti študije, ki so jo izvedli Scharping in sodelavci (6), so predstavljeni na Sliki 1.

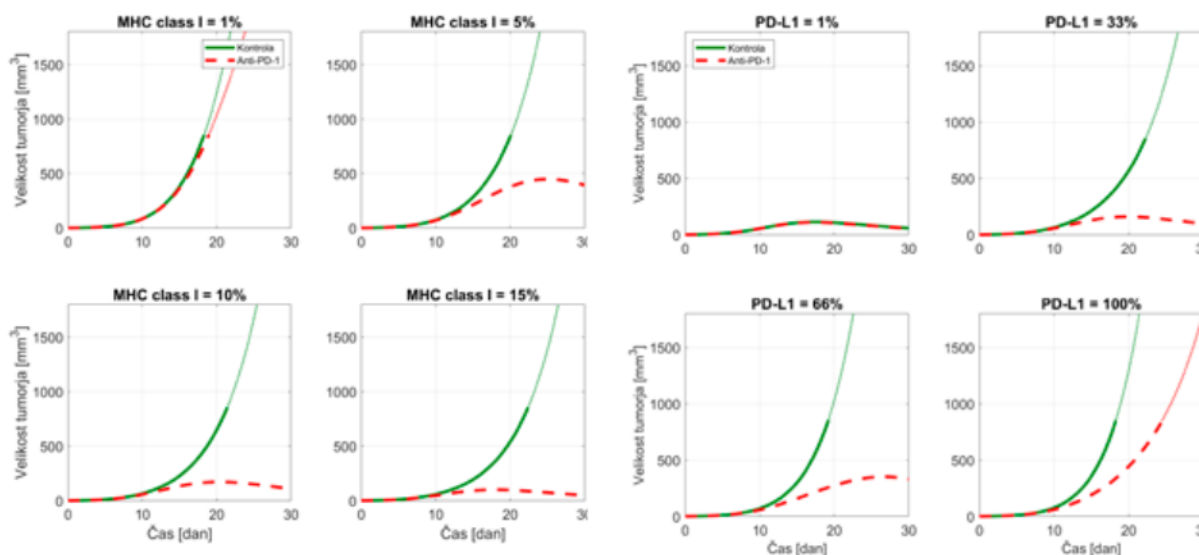


Slika 1. Primerjava modelskih napovedi z eksperimentalnimi podatki (6).

Vidimo lahko, da se simulacije zelo dobro ujemajo s predkliničnimi podatki, saj so povsod znotraj eksperimentalnih napak.

Da bi ugotovili, katere so najpomembnejše biološke značilnosti tumorjev, od katerih je odvisen odziv na imunoterapijo anti-PD-1, smo nato naredili več senzitivnostnih analiz, pri katerih smo po korakih spreminjali vrednosti ključnih bioloških parametrov in opazovali posledične spremembe v simuliranih rezultatih. Rezultati senzitivnostnih analiz so pokazali predvsem dvoje:

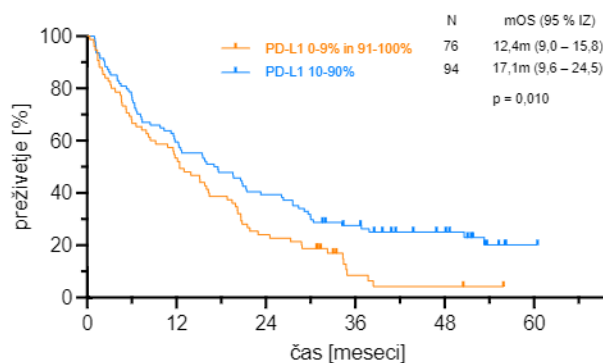
- 1.) Izraženost MHC razreda I na tumorskih celicah se je izkazal kot edini parameter, čigar vrednost nedvoumno definira odziv na zdravljenje (Slika 2, levo).
- 2.) Ob pogoju dovolj velike izraženosti MHC razreda I je model napovedal najboljši odziv na imunoterapijo anti-PD-1 pri tumorjih z zmerno izraženostjo PD-L1 (Slika 2, desno).



Slika 2. Levo: Senzitivnostna analiza izraženosti MHC razreda I, desno: Senzitivnostna analiza PD-L1.

Drugo napoved modela smo preverili tudi na kliničnih podatkih. V retrospektivni študiji smo analizirali podatke 209 bolnikov z razsejanim nedrobnoceličnim rakom pljuč, ki so bili zdravljeni z imunoterapijo anti-PD-1 na Onkološkem inštitutu Ljubljana

v obdobju od 2014 – 2019. Med demografskimi podatki, ki smo jih analizirali, sta bila tudi izraženost PD-L1 na tumorskih celicah ter celokupno preživetje bolnikov. Analiza preživetja s Kaplan-Meier-jevim diagramom (Slika 3) je pokazala, da so imeli bolniki z zmerno izraženostjo PD-L1 (10 % – 90 %) daljše srednje celokupno preživetje kot bolniki s skrajnimi vrednostmi (<10 % ali > 90 %) (17,1 mesec (95 % IZ 9,6 – 24,5) proti 12,4 meseca (95 % IZ 9,0 – 15,8), $p = 0,010$). Znanstveni članek je v pripravi in bo objavljen v kratkem.



Slika 3. Vpliv izraženosti PD-L1 na preživetje bolnikov, zdravljenih z imunoterapijo anti-PD-1.

Razširjeni mehanistični model imunoterapije anti-PD-1 po načelu od spodaj navzgor, podprt z lastnimi eksperimenti

Ker smo hoteli fizikalni model še bolj podpreti in preveriti z lastnimi eksperimenti, smo v sodelovanju z Oddelkom za eksperimentalno onkologijo na Onkološkem inštitutu Ljubljana naredili serijo predkliničnih eksperimentov. Na podlagi predhodnih rezultatov, ki so kazali na pomembno vlogo izraženosti MHC razreda I in PD-L1 na tumorskih celicah, smo se odločili za meritev njune izraženosti s pretočno citometrijo. S tem smo želeli pridobiti oceno o heterogenosti populacije tumorskih celic pred nasaditvijo na miši. Posledično smo razširili prvotni model, da se je bolje skladal s tako pridobljenimi vhodnimi podatki. Razširjeni model je prikazan z En. 5–En. 11.

$$\frac{dC_1}{dt} = k \cdot C_1 \cdot \ln\left(\frac{C_{max}}{\sum_{i=1}^4 C_i}\right) - a \cdot SNV \cdot \left(1 - PD1 \cdot \left(1 - PD1_{occup}(D, t)\right)\right) \cdot TIL \cdot C_1 \quad \text{En. 5}$$

$$\frac{dC_2}{dt} = k \cdot C_2 \cdot \ln\left(\frac{C_{max}}{\sum_{i=1}^4 C_i}\right) - a \cdot SNV \cdot TIL \cdot C_2 \quad \text{En. 6}$$

$$\frac{dC_3}{dt} = k \cdot C_3 \cdot \ln\left(\frac{C_{max}}{\sum_{i=1}^4 C_i}\right) \quad \text{En. 7}$$

$$\frac{dC_4}{dt} = k \cdot C_4 \cdot \ln\left(\frac{C_{max}}{\sum_{i=1}^4 C_i}\right) \quad \text{En. 8}$$

$$\frac{dTIL}{dt} = b \cdot SNV \cdot \left(\sum_{i=1}^4 C_i + C_{dead}\right)^{\frac{2}{3}} - a \cdot SNV \cdot PD1 \cdot \left(1 - PD1_{occup}(D, t)\right) \cdot TIL \cdot (C_1 + C_3) - d \cdot TIL \quad \text{En. 9}$$

$$\frac{dC_{dead}}{dt} = a \cdot SNV \cdot \left(1 - PD1 \cdot \left(1 - PD1_{occup}(D, t)\right)\right) \cdot TIL \cdot C_1 + a \cdot SNV \cdot TIL \cdot C_2 - l \cdot C_{dead} \quad \text{En. 10}$$

$$V(t) = \frac{4}{3} \pi r_c^3 \cdot \left(\sum_{i=1}^4 C_i(t) + C_{dead}(t)\right) + \frac{4}{3} \pi r_{TIL}^3 \cdot TIL(t) \quad \text{En. 11}$$

Zainteresirani bralec lahko definicije, vrednosti in reference modelskih spremenljivk in parametrov najde v (7).

Bistvena razlika v primerjavi z osnovnim modelom so štiri različne podskupine tumorskih celic glede na izražanje MHC razreda I (MHC-I) in PD-L1, in sicer:

- C1 (En. 5): tumorske celice, ki so MHC-I⁺ PD-L1⁺
- C2 (En. 6): tumorske celice, ki so MHC-I⁺ PD-L1⁻
- C3 (En. 7): tumorske celice, ki so MHC-I⁻ PD-L1⁺
- C4 (En. 8): tumorske celice, ki so MHC-I⁻ PD-L1⁻

Meritve izraženosti smo izvedli na dveh predkliničnih celičnih linijah, in sicer:

- Mamarni karcinom 4T1 (iz literature poznan kot neodziven na imunoterapijo anti-PD-1)
- Kolorektalni karcinom CT26 (iz literature poznan kot odziven na imunoterapijo anti-PD-1).

Rezultate meritev s pretočno citometrijo, s katerimi smo ocenili začetne pogoje spremenljivk C1-4, prikazuje Tabela 1. Zanimivo je, da smo tumorske celice brez izražanja MHC razreda I (C3, C4), za katere predpostavljamo, da so odporne na zdravljenje z imunoterapijo, ker ne predstavljajo antigenov, zaznali le ob eni meritvi pri CT26, medtem ko so bile pri liniji 4T1 bolj pogoste.

V nadaljevanju smo na mišjih modelih naredili tri serije eksperimentov, s katerimi smo razklopili posamezne biološke procese, ki jih opisuje fizikalni model:

- 1.) Tumorske celice obeh celičnih linij smo nasadili na gole miši brez priželjca, torej brez limfocitov T. Na tak način smo lahko ocenili parametre intrinzične rasti tumorja k in C_{max} .
- 2.) Tumorske celice smo nasadili na miši divjega tipa s funkcionalnim imunskim sistemom. Ob fiksiranih k in C_{max} (iz točke 1) smo lahko določili še modelska parametra a (stopnja interakcije med tumorskimi celicami in TIL) in b (stopnja infiltriranja TIL v tumor).
- 3.) Tumorske celice smo nasadili na miši divjega tipa, ki smo jih zdravili z imunoterapijo anti-PD-1. Podatke, ki smo jih tako pridobili, smo uporabili za ovrednotenje napovedi modela.

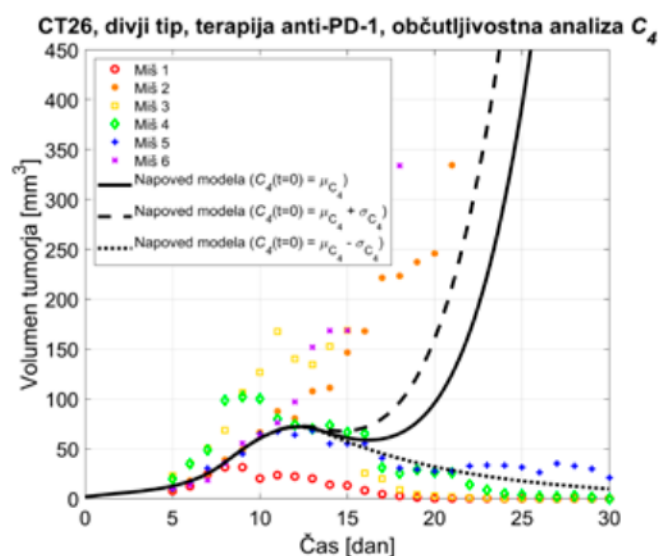
Podobno kot pri osnovnem modelu, smo tudi tokrat naredili serijo senzitivnostnih analiz, da bi ovrednotili, kateri modelski parameter igra največjo vlogo pri odzivu tumorjev na imunoterapijo antiPD-1. Tokrat smo izmerjene povprečne vrednosti modelskih parametrov spreminjali za $\pm$ izmerjeno standardno deviacijo (SD).

Tabela 1: Rezultati meritev izraženosti MHC razreda I in PD-L1 s pretočno citometrijo.

4T1				
Meritev	MHC-I ⁺ PD-L1 ⁺ [%]	MHC-I ⁺ PD-L1 ⁻ [%]	MHC-I ⁻ PD-L1 ⁺ [%]	MHC-I ⁻ PD-L1 ⁻ [%]
1	11,5	86,9	0,4	1,2
2	3,4	96,5	0,1	0,0
3	6,6	93,4	0,0	0,0
4	22,9	77,1	0,0	0,0
5	8,5	90,9	0,3	0,3
povprečje ± standardna deviacija (SD)	10,6 ± 7,5	89,0 ± 7,5	0,2 ± 0,2	0,3 ± 0,5

CT26				
Meritev	MHC-I ⁺ PD-L1 ⁺ [%]	MHC-I ⁺ PD-L1 ⁻ [%]	MHC-I ⁻ PD-L1 ⁺ [%]	MHC-I ⁻ PD-L1 ⁻ [%]
1	29,3	70,5	0,0	0,2
2	15,4	84,6	0,0	0,0
3	5,6	94,4	0,0	0,0
4	9,7	90,3	0,0	0,0
5	26,7	73,3	0,0	0,0
povprečje ± standardna deviacija (SD)	17,3 ± 10,4	82,6 ± 10,4	0,0 ± 0,0	0,04 ± 0,09

Modelske simulacije so dobro napovedale neodzivnost celične linije 4T1 (rezultati niso prikazani). Modulacija modelskih parametrov za $\pm$ SD pa ni prinesla bistvenih sprememb rezultatov – celična linija 4T1 je, tako kot v realnosti, ostala neodzivna na zdravljenje z imunoterapijo anti-PD-1. Rezultate za kolorektalni karcinom CT26 pa prikazuje Slika 4.



Slika 4. Eksperimentalni podatki tumorjev celične linije CT26, ki so bili zdravljeni z imunoterapijo anti-PD-1 ter senzitivnostna analiza parametra C_4 .

Že pogled na eksperimentalne podatke je zelo zanimiv. V treh primerih je tumor po zdravljenju popolnoma izginil, v enem primeru smo dosegli dolgotrajen nadzor nad boleznijo, v dveh primerih pa se tumorja na zdravljenje nista odzvala. Modelske simulacije so po drugi strani napovedale zastoj v rasti tumorja s kasnejšo ponovno rastjo, kar se eksperimentalno ni pokazalo.

Najbolj zanimiva pa je bila senzitivnostna analiza parametra C4 (tumorske celice MHC-I⁺ PD-L1⁺). Pokazala je, da je mogoče popoln odziv na zdravljenje doseči le v primeru homogenih tumorjev, pri katerih popolnoma vse tumorske celice izražajo MHC razreda I. Z zmanjšanjem C4 za eno standardno deviacijo v simulacijah ob nasaditvi tumorjev namreč ni bilo več celic brez izražanja MHC razreda I. Glede na eksperimentalne rezultate pretočne citometrije v Tabeli 1, se pri CT26 tak scenarij najverjetneje pogosto zgodi. Po drugi strani pa simulacije tudi pokažejo, da že majhen delež MHC-I⁺ celic povzroči, da take celice tekom zdravljenja prevladajo, kar vodi v neuspeh zdravljenja z anti-PD-1. Ti rezultati še dodatno potrjujejo in nadgrajujejo ugotovitve osnovnega modela, in sicer o pomembni vlogi izraženosti MHC razreda I na tumorskih celicah pri odzivu na imunoterapijo anti-PD-1, kar bi bilo zanimivo preveriti tudi v klinični praksi.

Načrt za prihodnost: Mehanistični model imunoterapije anti-PD-1 v kombinaciji z radioterapijo

V zadnjih letih je postalo jasno, da radioterapija pri zdravljenju raka ni koristna samo zaradi že dolgo znanega direktnega citotoksičnega efekta, ampak ima tudi imunogeni učinek. Študije kažejo, da radioterapija (med drugim) v tumorju povzroča imunogeno celično smrt (8), poveča tumorsko mutacijsko breme in poveča izražanje MHC razreda I (9). Vsi navedeni efekti pozitivno vplivajo na stimulacijo imunskega sistema, zato se poglobljeno raziskujejo kombinacije imunoterapije in radioterapije v upanju, da bi s tem povečali delež bolnikov, ki bi odgovorili na zdravljenje. Ker pa je večina zgoraj navedenih efektov radioterapije dozno in časovno odvisnih, verjetno ni potrebno posebej poudarjati, da se pri takšni kombinirani terapiji pojavi še veliko več prostostnih stopenj in odprtih vprašanj kot pri imunoterapiji kot monoterapiji. Pomoč podobnih fizikalnih modelov, kot smo jih predstavili v prispevku, bi v takih primerih zagotovo prišla še bolj do izraza. Njihov razvoj je prav gotovo eden izmed ciljev naše skupine v bližnji prihodnosti.

Literatura

1. Wolchok J. Putting the immunologic brakes on cancer. *Cell*. 2018 Nov 29;175(6):1452–1454.
2. Kabacaoglu D, Cicielski KJ, Ruess DA, Algül H. Immune Checkpoint Inhibition for pancreatic ductal adenocarcinoma: current limitations and future options. *Front Immunol*. 2018;9:1878.
3. Tang J, Shalabi A, Hubbard-Lucey VM. Comprehensive analysis of the clinical immuno-oncology landscape. *Ann Oncol*. 2018;29(1):84–91.
4. Valentinuzzi D, Simončič U, Uršič K, et al. Predicting tumour response to anti-PD-1 immunotherapy with computational modelling. *Phys Med Biol*. 2019;64(2):025017.
5. Sanchez-Paulete AR, Cueto FJ, Martinez-Lopez M, et al. Cancer immunotherapy with

immunomodulatory Anti-CD137 and Anti-PD-1 monoclonal antibodies requires BATF3-dependent dendritic cells. *Cancer Discov.* 2016;6(1):71–79.

6. Scharping NE, Menk A V, Whetstone RD, et al. Efficacy of PD-1 blockade is potentiated by metformin-induced reduction of tumor hypoxia. *Cancer Immunol Res.* 2017;5(1):9–16.
7. Valentinuzzi D, Uršič K, Maruna M, et al. Computational modeling and experimental investigations to enhance the successful response of anti-PD-1 cancer immunotherapies. *Phys Cancer, Res Adv.* 2020;145–64.
8. Golden EB, Frances D, Pellicciotta I, et al. Radiation fosters dose-dependent and chemotherapy-induced immunogenic cell death. *Oncoimmunology.* 2014;3(4).
9. Reits EA, Hodge JW, Herberts CA, et al. Radiation modulates the peptide repertoire, enhances MHC class I expression, and induces successful antitumor immunotherapy. *J Exp Med.* 2006;203(5):1259–71.



PALIATIVNO OBSEVANJE ZASEVKOV NEDROBNOCELIČNEGA RAKA PLJUČ PRED PRVIM ZDRAVLJENJEM S KEMOIMUNOTERAPIJO – PRIMM

Tanja Žnidarič¹, Jasna But-Hadžić^{2,3}

¹ Oddelek za onkologijo, Univerzitetni klinični center Maribor, Ljubljanska ulica 5, 2000 Maribor, Slovenija

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

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

Elektronski naslov: jbut@onko-i.si; Vodilni avtor: Jasna But-Hadžić

Izvleček

Bolniki z razsejanim nedrobnoceličnim rakom pljuč (NDRP) in izraženostjo PD-L1 < 50 % slabše odgovorijo na zdravljenje z zaviralci imunskih kontrolnih točk (ZIKT) kljub dodatku kemoterapije. Predklinične in klinične raziskave so pokazale sinergistično delovanje obsevanja in ZIKT. Ni znano katera doza, frakcionacija, časovna umestitev in izbira tarče bi bila najbolj optimalna za imunomodulacijo. Trenutno potekajo raziskave z ablativnim obsevanjem s SBRT tehniko. S PRIMM raziskavo pa želimo izboljšati odgovor na kombinirano sistemsko zdravljenje s paliativnim obsevanjem več metastatskih mest.

V klinično nerandomizirano raziskavo faze II vključujemo bolnike s primarno razsejanim NDRP in izraženostjo PD-L1 < 50 %, ki bodo prejeli sistemsko zdravljenje s kemoterapijo in ZIKT. Pred sistemskim zdravljenjem prejmejo paliativno obsevanje na 2-5 mest. Primarni cilj je izboljšanje preživetja brez bolezni za vsaj 3 mesece v primerjavi s historično kohorto.

Od julija 2022 do marca 2023 smo v raziskavo vključili 14 od predvidenih 50 bolnikov v srednji starosti 66 let (razpon 56 do 75 let). Pri 64% bolnikov je bila histologija adenokarcinom. Vsi so zaključili obsevanje po protokolu, neželeni učinki so bili blagi (dve bolnici G1 in G2). Zaradi poslabšanja splošnega stanja ena bolnica ni prejela sistemskega zdravljenja, pri dveh pa je bilo predčasno prekinjeno. Beležili smo 3 progrese (po 2m, 5m, 5m) in tri oligoprogrese primarnega tumorja. Pri eni bolnici je prišlo do G5 jetrne odpovedi po prvem krogu sistemskega zdravljenja.

Vmesna analiza poteka raziskave PRIMM je pokazala dobro compliance bolnikov v eksperimentalni roki zdravljenja, malo neželenih učinkov in izboljšanje simptomov bolezni po obsevanju. Časovni potek zdravljenja ustreza protokolu. Zaradi G5 jetrne odpovedi po 1 krogu sistemskega zdravljenja je predvidena dodatna analiza in začasno zmanjšanje predvidenega obsevalnega volumna jeter.

Ključne besede: nedrobnocelični rak pljuč, imunomodulacija, obsevanje, kombinirano zdravljenje

Uvod

Rak pljuč je kljub novim uspešnim zdravljenjem (sistemskim in lokalnim) še vedno najpogostejši vzrok smrti zaradi raka na svetu (1). Nedrobnocelični rak pljuč (NDPR) je heterogena bolezen s številnimi genetskimi in epigenetskimi alteracijami. Genetske mutacije vplivajo na aktivacijo onkogenih poti in/ali inhibicijo tumor supresorskih genov, ki vodijo v maligno transformacijo in nastanek prekursorjskih rakavih celic. Patofiziologija in nastanek raka je poleg genetskih sprememb odvisna tudi od tumorskega

mikrookolja in imunskega sistema bolnika. Poznavanje genomskih sprememb, biologije tumorskega mikrookolja in imunskega odziva je vodila v razvoj novejših zdravil, ki so revolucionarizirale sistemsko zdravljenje raka pljuč (2). V to skupino spadajo tarčna zdravila in zaviralci imunskih kontrolnih točk (ZIKT) (2–4).

Imunski pobeg je pogost vzrok za nastanek različnih vrst raka. Večina rakov pljuč pobegne imunskemu nadzoru in to preko različnih mehanizmov. Tumorske celice lahko direktno zavirajo gostiteljev imunski odziv z aktivacijo negativnih regulatornih poti, ki jih poznamo pod imenom imunske kontrolne točke. Dve kontrolni točki, in sicer citotoksični T-limfocit 4 (angl. cytotoxic T-lymphocyte protein-4; CTLA-4) in programirana celična smrt-1 (angl. programmed cell death-1; PD-1), sta trenutno najbolj preučevani in tudi uporabljeni v zdravljenju raka. Pri zdravljenju raka se uporablja protitelesa proti imunskemu regulatorju CTLA-4 in PD-L1/PD-1. V klinični praksi ZIKT pogosto imenujemo imunoterapija, kar je sicer širši izraz za skupino zdravil, ki delujejo na imunski sistem bolnika (2,5).

Sedanji standard zdravljenja bolnikov s primarno razsejanim NDRP je sistemsko zdravljenje. Z izjemo tarčnega zdravljenja pri žlezem raku z znanimi mutacijam, se pri napredovalem NDRP v prvi liniji odločamo za zdravljenje z imunoterapijo z dodatkom kemoterapije ali brez nje. Kombinirano zdravljenje s kemoterapijo je priporočeno pri bolnikih z izraženostjo PD-L1 pod 50 % (2). Veliko bolnikov na omenjeno zdravljenje ne odgovori ali pa je odgovor na terapijo slabši od pričakovanega.

Z namenom izboljšanja odziva na sistemsko zdravljenje z imunoterapijo se v literaturi vedno bolj omenja obsevanje. Obsevanje dobiva vedno več veljave kot modulator imunskega odziva, ki potencialno vpliva na lokalno ter tudi sistemsko kontrolo bolezni. Številne predklinične in klinične študije, ki so primerjale imunoterapijo in kombinirano zdravljenje z obsevanjem, so pokazale sinergističen učinek (6–9). Točni mehanizmi, s katerimi obsevanje sproži imunski odgovor, še vedno niso do potankosti pojasnjeni. Predklinične študije so pokazale, da je imunski odgovor močno odvisen od doze in frakcionacije obsevanja. Še vedno pa ni jasno, katera doza in frakcionacija bi sprožila najbolj optimalen odgovor. Prav tako ni jasno, koliko zasevkov in katere bi bilo najbolj obsevati ter kakšna naj bo časovna umestitev obsevanja (pred, med ali po imunoterapiji) (10). Kombinacija zdravljenja z obsevanjem in imunoterapijo je zaradi verjetnega sinergističnega učinka zelo priljubljena tema raziskovanj. Trenutno je odprtih več študij. Večina študij primerja imunoterapijo in imunoterapijo s sterotaktičnim (ablativnim) obsevanjem (11). Za modulacijo imunskega odziva z obsevanjem bi zelo verjetno bila dovolj nižja paliativna doza, ki je enostavnejša za izvedbo in primerna za skoraj vsa metastatska mesta.

Utemeljitev raziskave

Bolniki z razsejanim NDRP in izraženostjo PD-L1 < 50 % slabše odgovorijo na zdravljenje z ZIKT kljub dodatku kemoterapije v I liniji zdravljenja. Z dodatkom obsevanja pred pričetkom sistemskega zdravljenja, bi z imunomodulacijo lahko vplivali na odgovor na sistemsko zdravljenje in dosegli daljši čas do progressa bolezni.

Trenutno je odprtih več kliničnih raziskav, ki proučujejo kombinirano zdravljenje z ZIKT in obsevanjem. Po do sedaj znanih podatkih nobena ne proučuje obsevanja večih metastatskih mest in/ali primarnega tumorja s paliativno celokupno dozo pred prvim

redom zdravljenja razsejane bolezni.

Metode/Zasnova raziskave/Cilji

Raziskava je zasnovana kot klinična nerandomizirana intervencijska raziskava faze 2 in poteka na Onkološkem inštitutu Ljubljana, Univerzitetnem kliničnem centru Maribor (UKC MB) in Univerzitetni kliniki Golnik. Vključujemo bolnike s histološko ali/in citološko potrjenim razsejanim NDRP, kjer manj kot 50 % tumorskih celic izraža PDL 1 in pri katerih je predvidena sistemska terapija prvega reda s kemoimunoterapijo. Bolniki pred sistemskim zdravljenjem prejmejo obsevanje s paliativno dozo na več metastatskih mest in/ali primarni tumor (2 do 5 mest). Vsi bolniki so obsevani s totalno dozo (TD) 20 Gy v 5 frakcijah.

Primarni cilj je izboljšanje srednjega časa brez progressa bolezni za vsaj 3 mesece.

Rezultati zdravljenja bodo primerjani s historično kohorto bolnikov, zdravljenih le s sistemsko kemoimunoterapijo. Historična skupina bo izbrana z statistično metodo PSM (»ujemanje ocene nagnjenosti«, (ang. Propensity score matching).

V raziskavo bo vključenih 100 bolnikov, 50 v prospektivno in 50 retrospektivno historično skupino (dvostranska alfa 0,05, beta 0,2). Registrirana je na [clinicaltrials.gov - NCT05440916](https://clinicaltrials.gov/NCT05440916).

Vmesna analiza poteka raziskave

Od julija 2022 do marca 2023 smo v raziskavo vključili 14 bolnikov. Šest moških in 8 žensk, v srednji starosti 66 let (razpon 56 do 75 let). Najpogostejša patohistologija je bil adenokarcinom (9 bolnikov), štirje bolniki so imeli ploščatocelični in ena bolnica adenokvamosni rak pljuč. Izraženost PDL-1 je bila 0% pri 10 bolnikih, ostali bolniki so imeli izraženost 5, 10, 30 in 40 %. Zasevki so bili pristni samo na plevri pri dveh bolnikih (M1a), pri ostalih so bili zasevki prisotni v 2 do 5 organih (M1c). Ena bolnica je imela stereotaktično obsevane tri možganske zasevke.

V času vmesne analize (5.5.2023) je bil srednji čas sledenja 4m (razpon 0 – 8m). Trinajst bolnikov je prejelo predvideno zdravljenje, pri eni bolnici je prišlo pred uvedbo do motenj ritma in srčega popuščanja, zato zaradi pridruženih bolezni sistema zdravljenja ni prejela. Štirje bolniki so prejeli vzdrževalno sistemsko zdravljenje, pri treh je bilo kombinirano sistemsko zdravljenje uvedeno. Dve bolnici sta bili na sledenju (predčasno prekinjeno zdravljenje), tri bolnice so umrle. En bolnik je prejemal II linijo sistema zdravljenja in ena bolnica je bila v postopku paliativnega obsevanja progressa v subkarinalne bezgavke. Pri treh bolnikih smo beležili progres 2m, 5m, in 5m, po uvedbi sistema zdravljenja. Pri treh bolnikih je prišlo do oligoprograsa primarnega tumorja. Pri vseh treh je predvidena paliativna reiradiacija primarnega tumorja in nadaljevanje z vzdrževalnim zdravljenjem.

Vsi bolniki so prejeli obsevanje po protokolu. Vsi so imeli obsevan primarni tumor, s skupnim številom tarč 2 pri 3-eh bolnikih, 3 pri 5-ih, 4 pri 4-ih in 5 pri dveh bolnikih. Neželeni učinki obsevanja so se pojavili pri eni bolnici v času obsevanja z G2 drisko in pri drugi bolnici z rdečino kože G1 2 tedna po obsevanju. Povprečni čas od obsevanja do uvedbe sistema zdravljenja je bil 11 dni (razpon 2-18 dni). Toksičnost sistema zdravljenja ni bila povečana, pneumonitisa kljub obsevanju pljuč nismo beležili.

Pri eni bolnici je prišlo po prvem krogu karbo/pemetreksed/pembrolizumab do G5 jetrne odpovedi. Ker gre za morebitno toksičnost kombiniranega zdravljenja z obsevanjem in ZIKT je bila odrejena obdukcija.

Razprava

Vmesna analiza poteka raziskave PRIMM je pokazala dobro complianco bolnikov v eksperimentalni roki zdravljenja in malo neželenih učinkov. Vsi bolniki so prejeli predvideno zdravljenje z obsevanjem z blago akutno toksičnostjo pri dveh bolnicah. Pri šestih bolnikih smo po obsevanju opazovali izboljšanje splošnega stanja z zmanjšanjem simptomov bolečine in kašlja. Tudi pri sistemskem zdravljenju nismo beležili povečane toksičnosti, pri dveh bolnikih je bilo sistemsko zdravljenje predčasno prekinjeno zaradi slabega splošnega stanja.

Časovni potek raziskave je dobro zastavljen in poteka po protokolu. Bolniki pričnejo z obsevanjem povprečno 1 dan po vključitvi in s sistemskim zdravljenjem povprečno 11 dni po zaključku obsevanja. Do zakasnitve nad 2 tedna je prišlo samo pri dveh bolnikih zaradi prebolevanja okužbe.

Učinkovitost zdravljenja tako zgodaj še ne moremo ocenjevati. Srednji čas do progressa pri prvih 11 vključenih bolnikih je 5m v srednjem času sledenja 4m. Pri treh bolnikih je prišlo do progressa bolezni in je bilo zdravljenje prekinjeno. Trije bolniki imajo predvideno obsevanje oligoprogressa lokalno in nadaljevanje vzdrževalnega zdravljenja.

Potencialno neželeni učinek kombiniranega zdravljenja z obsevanjem in ZIKT bi lahko predstavljala G5 jetrna odpoved pri bolnici po 1. ciklusu kemoimunoterapije, ob tem pa je kontrolni CT pokazal regres jetrnih zasevkov. Čeprav je verjetnost neželenih učinkov visokodoznega obsevanja jeter in sočasne terapije s ZIKT zelo nizka (12), je pri bolnici za razjasnitev stanja predvidena obdukcija. Zaradi varnosti bolnikov smo sedaj začasno zmanjšali predviden volumen obsevanih jeter na eventuelno majhne periferno ležeče zasevke.

Literatura

1. Ferlay J, Colombet M, Soerjomataram I, et al. Cancer statistics for the year 2020: An overview. *Int J Cancer*. 2021;149(4):778–789.
2. Planchard D, Popat S, Kerr K, et al. Metastatic non-small cell lung cancer: ESMO Clinical Practice Guidelines for diagnosis, treatment and follow-up. *Ann Oncol*. 2018;29(4):iv192–237.
3. Herbst RS, Morgensztern D, Boshoff C. The biology and management of non-small cell lung cancer. *Nature*. 2018;553:446–454.
4. Salehi-Rad R, Li R, Paul MK, et al. The Biology of lung cancer: development of more effective methods for prevention, diagnosis, and treatment. *Clin Chest Med*. 2020;41(1):25–38.
5. Chen DS, Mellman I. Elements of cancer immunity and the cancer-immune set point. *Nature*. 2017;541:321–330.
6. Darabi S, Braxton D, Eisenberg B, Demeure M. Predictive Biomarkers for Immunotherapy Response Beyond PD-1/PD-L1. *Oncology*. 2020;34(08):321-327.

7. Shaverdian N, Lisberg AE, Bornazyan K, Veruttipong D, Goldman JW, Formenti SC, et al. Previous radiotherapy and the clinical activity and toxicity of pembrolizumab in the treatment of non-small-cell lung cancer: a secondary analysis of the KEYNOTE-001 phase 1 trial. *Lancet Oncol.* 2017;18(7):895–903. /
8. Theelen WSME, Peulen HMU, Lalezari F, Van Der Noort V, De Vries JF, Aerts JGJV, et al. Effect of Pembrolizumab after Stereotactic Body Radiotherapy vs Pembrolizumab Alone on Tumor Response in Patients with Advanced Non-Small Cell Lung Cancer: Results of the PEMBRO-RT Phase 2 Randomized Clinical Trial. *JAMA Oncol.* 2019;5(9):1276–82.
9. Gray JE, Villegas A, Daniel D, et al. Three-Year Overall Survival with Durvalumab after Chemoradiotherapy in Stage III NSCLC—Update from PACIFIC. *J Thorac Oncol.* 2020;15(2):288–93.
10. Brooks ED, Chang JY. Time to abandon single-site irradiation for inducing abscopal effects. *Nature Reviews Clinical Oncology.* 2019;16:123–35.
11. Azghadi S, Daly ME. Radiation and immunotherapy combinations in non-small cell lung cancer. *Cancer Treat Res Commun.* 2021;26:100298.
12. Kroeze SGC, Pavic M, Stellamans K, et al. Metastases-directed stereotactic body radiotherapy in combination with targeted therapy or immunotherapy: systematic review and consensus recommendations by the EORTC–ESTRO OligoCare consortium. *Lancet Oncol.* 2023. 24:e121–32.



POVZETKI

OBSEVANJE IN GENSKA TERAPIJA S KEMOKINOMA CCL5 ALI CCL17 NA MIŠJIH MODELIH KARCINOMA

Tim Božič^{1,2}, Simona Kranjc Brezar^{1,2}, Boštjan Markelc¹, Maja Čemažar^{1,3}

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

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

³Fakulteta za vede o zdravju, Univerza na Primorskem, Polje 42, 6310 Izola, Slovenija

Elektronski naslov: tbozic@onko-i.si

Kemokini so majhni signalni proteini iz družine citokinov, ki inducirajo migracijo imunskih celic. Vrsta in stopnja infiltracije imunskih celic v tumorskem mikrookolju lahko vpliva na potek bolezni in korelira z učinkovitostjo imunoterapij pri bolnikih z rakom. Poleg tega je znano, da z radioterapijo, kot enim od glavnih načinov zdravljenja raka, lahko sprožimo pozitivne imunomodulatorne učinke. Iz navedenih razlogov genski elektroprenos (GET) plazmidne DNA z zapisom za vnetna kemokina CCL5 ali CCL17 v kombinaciji s klasično radioterapijo tako predstavlja enega izmed potencialnih pristopov pri zdravljenju raka.

Vpliv plazmidne DNA z zapisom za kemokina CCL5 ali CCL17 na viabilnost in izražanje vnetnih citokinov smo najprej določevali pri dveh mišjih celičnih linijah raka debelega črevesa CT26 in raka dojke 4T1 *in vitro*. Viabilnost smo določevali s testom PrestoBlue, izražanje pa s qRT-PCR. Kemotaktične lastnosti obeh kemokinov smo določili s testi kemotakse *in vitro* in z modelom dorzalnega okna *in vivo*. Pri tem smo spremljali migracijo imunskih celic proti mišjim tumorskim celicam in tumorjem CT26 in 4T1, transfeciranim s plazmidno DNA z zapisom za posamezni kemokin. Protitumorsko učinkovitost kombinirane terapije GET kemokinov in dveh obsevalnih režimov (enkratna doza 10 Gy ali frakcionirana doza 3 x 5 Gy) smo določevali z določevanjem zaostanka v rasti tumorjev in izražanjem vnesenih kemokinov, ter vnetnih citokinov. Sestavo tumorskega mikrookolja po kombinirani terapiji smo določevali z imunofluorescenčnim označevanjem imunskih celic in žil (CD4, CD8 in CD31).

Viabilnost celic po transfekciji s plazmidno DNA z zapisom za kemokina je bila > 75 %. Poleg tega je transfekcija vodila v povišano izražanje vnesenih kemokinov ter vnetnih citokinov CXCL9, CXCL10 in IL-6, ki sodelujejo pri usmerjanju imunskih celic. Testi kemotakse so pokazali, da kemokina CCL5 in CCL17 lahko inducirata migracijo mišjih makrofagov RAW264.7 *in vitro* in splenocitov v tumorje *in vivo*. Zaostanek v rasti tumorjev CT26 in 4T1 po samostojnem GET je bil zanemarljiv in primerljiv med tretiranimi skupinami. Primerjava stopnje infiltracije posameznih imunskih celic v tumorsko mikrookolje je pokazala, da se število CD4+ celic T pomagalk in citotoksičnih CD8+ celic T ubijalk pri obeh tumorskih modelih poveča po GET kemokinov in zmanjša po samem obsevanju. Zmanjšanje števila imunskih celic je bilo opaženo tudi pri kombinirani terapiji in korelira z zmanjšanjem CD31+ endotelnih celic, ki predstavljajo žilje. Zaostanek v rasti tumorjev CT26 in 4T1 je bil statistično

značilno daljši po kombinirani terapiji tumorjev z GET kemokinov pri obeh obsevalnih režimih, pri čemer smo dosegli tudi popolne odgovore tumorjev na zdravljenje. Pri tumorskem modelu CT26 je bilo v primerjavi s tumorskim modelom 4T1 večje število popolnih odgovorov, vendar pa smo protitumorsko učinkovitost kemokinov dokazali le pri tumorjih 4T1. Rezultati kažejo na potencial kemokinov v imunoterapiji raka, vendar je za njihovo implementacijo potrebna nadaljnja optimizacija kombinirane terapije.

P1

IMUNOTERAPIJA Z BAKTERIOFAGI, KI NA PLAŠČNIH PROTEINIH PREDSTAVLJAJO TUMORSKI PEPTID MAGE-A1 ZA ZDRAVLJENJE MALIGNEGA MELANOMA

Nuša Brišar^{1,2}, Katja Šuster³, Simona Kranjc Brezar^{2,4}, Andrej Cör^{2,3}

¹ Fakulteta za vede o zdravju, Univerza na Primorskem, Polje 42, 6310 Izola, Slovenija

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

³ Ortopedska bolnišnica Valdoltra, Jadranska cesta 31, 6280 Ankarana, Slovenija

⁴ Oddelek za eksperimentalno onkologijo, Onkološki inštitut Ljubljana, Zaloška 2, 1000 Ljubljana, Slovenija

Elektronski naslov: nusa.brisar@fvz.upr.si

Obetavni pristop za izboljšanje uspehov zdravljenja na področju imunoterapije raka predstavlja uvedba nanotehnologije in nanodelcev. Eni od takih nanodelcev so prokariontski virusi bakteriofagi, ki imajo velik potencial za genski inženiring in odpirajo nove možnosti pri razvoju vakcin. Z razvojem tehnologije predstavitve na bakteriofagu (angl. phage display) lahko bakteriofage uporabimo kot ciljne nanonosilce za predstavitev tumorskih antigenov imunskim celicam. Cilj raziskave je bil razvoj gensko spremenjenih nelitičnih filamentoznih bakteriofagov M13, ki na svoji površini izražajo tumorske peptide MAGE-A1 161-169 v fuziji z velikimi pVIII ali malimi pIII plaščnimi proteini bakteriofaga kot potencialno vakcino za zdravljenje malignega melanoma. Za pripravo bakteriofagne vakcine smo uporabili tehnologijo predstavitve na bakteriofagu, in sicer kombinacijo fagemida in pomožnega filamentoznega bakteriofaga. Gostiteljsko bakterijo *Escherichia coli* z uspešno transformiranim rekombinantnim fagemidom pComb8-MAGE-A1 ali pComb3XSS-MAGE-A1 smo okužili s pomožnimi bakteriofagi VCSM13 in po prekonočni inkubaciji novonastale rekombinantne filamentozne bakteriofage očistili s kromatografskimi kolonami. C57BL/6 miši smo intraperitonealno vakcinirali z 10¹² pfu (angl. plaque forming units) rekombinantnih fagov/miš trikrat v zaporednih dvotedenskih intervalih, kot kontrolo smo uporabljali divji tip bakteriofaga M13 in PBS. Sedem dni po vsaki dozi vakcine smo odvzeli serum in ga analizirali z metodo ELISA. Prisotnost proteinske fuzije izražene na rekombinantnih bakteriofagih smo potrdili s prenosom Western (protein pIII-MAGE-A1) in z LC-MS/MS (protein pVIII-MAGE-A1). Dokazali smo, da je intraperitonealna aplikacija bakteriofagne vakcine varna, pri poskusnih živalih ni bilo opaženih stranskih učinkov. Kljub različni gostoti prikaza tumorskega peptida v fuziji s pIII v primerjavi s pVIII sta oba aktivirala humoralno imunost, saj smo dokazali tako prisotnost proti-fagnih in proti-MAGE-A1 protiteles, katerih odziv se je povečeval od prve do tretje doze bakteriofagne vakcine. Dokazali smo, da se proti-MAGE-A1 protitelesa vežejo tudi na naravno izražene epitope na površini tumorskih celic B16F10 *in vitro*. Imunoterapija z gensko spremenjenimi filamentoznimi bakteriofagi, ki na svoji površini izražajo tumorski peptid MAGE-A1 je varna ter pri poskusnih živalih sproži humoralni imunski odziv. Menimo, da bakteriofagne vakcine predstavljajo obetaven način zdravljenja malignega melanoma samostojno ali v kombinaciji z drugimi že obstoječimi pristopi zdravljenja.

STEREOTAKTIČNO OBSEVANJE KOSTNIH ZASEVKOV: REZULTATI ZDRAVLJENJA NA ONKOLOŠKEM INŠTITUTU LJUBLJANA

Alenka Čulk^{1*}, Anja Rankovec^{1*}, Janja Sedlar^{1*}, Ivica Ratoša^{1,2}, Jasna But Hadžić^{1,2}

¹ Medicinska fakulteta, Univerza v Ljubljani, Vrazov trg 2, 1000 Ljubljana, Slovenija

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

Elektronski naslov: iratosa@onko-i.si; * delitev prvega avtorstva

Stereotaktično obsevanje telesa (SBRT) je obsevalna tehnika, ki jo od leta 2016 izvajamo na Onkološkem inštitutu Ljubljana (1,2). Je visoko natančno, neinvazivno in slikovno vodeno hipofrakcionirano obsevanje z nizko stopnjo neželenih učinkov. Omogoča dobro lokalno kontrolo bolezni, kontrolo simptomov bolezni, podaljša čas do menjave sistemskega zdravljenja ter izboljša preživetje z nizko stopnjo neželenih učinkov (3,4). Na izid zdravljenja lahko poleg kliničnih dejavnikov vpliva tudi predpis obsevalnega odmerka in lokacija zasevka. Hipoteza raziskave je bila, da biološka učinkovita doza, volumen obsevanja, lokacija zasevka in histopatološki podtip raka vplivajo na izid zdravljenja s tehniko SBRT. Namen raziskave je bil opredeliti vpliv kliničnih in obsevalnih dejavnikov na izid zdravljenja s SBRT v Sloveniji. V raziskavi smo retrospektivno pregledali podatke bolnikov z metastatskim rakom, zdravljenih na Onkološkem inštitutu Ljubljana od 2016 – 2021 s tehniko SBRT. Zbrali smo osnovne demografske podatke bolnikov, podatke o primarnem tumorju, metastatski bolezni, predpisu obsevalnega zdravljenja, obsevalnega načrta, lokalni kontroli bolezni, zapletih zdravljenja in preživetju. Povezavo med kliničnim izidom zdravljenja (lokalno kontrolo, preživetje) in podatki iz obsevalnih načrtov smo preverili z ustreznimi statističnimi testi. Rezultati raziskave, ki jih bomo predstavili na strokovnem srečanju, bodo pomembni za prilagoditev obstoječega algoritma zdravljenja kostnih zasevkov s tehniko SBRT pri bolnikih z metastatskim rakom v Sloveniji.

Literatura

1. But-Hadžić J, Ratoša I, Jenko A, et al. Protokol za obsevanje vretenc s tehniko SBRT. Ljubljana: Onkološki inštitut, 2019. 1 zv., ilustr. [COBISS.SI-ID 3200891]
2. Ratoša I, But-Hadžić J, Jenko A, et al. Stereotaktično obsevanje telesa : protokol : priporočila za predpis doze, načrtovanje in izvedbo SBRT. Ljubljana: Onkološki inštitut, 2021. 35 str., graf. prikazi. [COBISS.SI-ID 56507651]
3. Harrow S, Palma DA, Olson R, et al. Stereotactic Radiation for the Comprehensive Treatment of Oligometastases (SABR-COMET): extended long-term outcomes. *Int J Radiat Oncol Biol Phys.* 2022;114(4):611–616.
4. Olson R, Jiang W, Liu M, et al. Treatment with stereotactic ablative radiotherapy for up to 5 oligometastases in patients with cancer: primary toxic effect results of the nonrandomized phase 2 SABR-5 Clinical Trial. *JAMA Oncol.* 2022; 8(11):1644-1650.

UNRAVELING THE ROLE OF STAT5 TRANSCRIPTION FACTORS IN LEUKEMIA BY MURINE STEM CELL TRANSPLANTATION

Leo Edlinger

Division of Oncology, Department of Internal Medicine, Medical University of Graz, Graz, Austria

E-mail: leo.edlinger@medunigraz.at

Murine stem cell transplantation is a well-established method for studying leukemia *in vivo*. Lethally irradiated recipient mice reconstituted by leukemic stem cells recapitulate the leukemic course of disease and can be used to investigate the function of candidate oncogenes and tumor suppressor genes.

Deregulation of the Janus Kinase/Signal Transducers and Activators of Transcription (JAK/STAT) signaling pathway is found in hematopoietic malignancies with STAT5A/B controlling leukemic cell survival and disease progression. While mutations in STAT5B are frequently present in hematopoietic malignancies, this is not the case for STAT5A. To characterize the individual contributions of both isoforms in leukemogenesis, we isolated bone marrow cells of STAT5A and STAT5B knockout mice and retrovirally transduced them with the BCR/ABL oncogene. Adoptive transfer of STAT5B-deficient leukemic cells led to a significantly longer disease onset compared to STAT5A-deficient leukemic cells, hence defining STAT5B as the major isoform responsible for BCR/ABL+ leukemia.

P4

TRANSFERABILITY OF KNOWLEDGE-BASED PLAN PREDICTION MODELS: TOWARD BENCHMARK AND LARGE-SCALE PLAN AUTOMATION FOR BREAST RADIOTHERAPY

Claudio Fiorino¹ & the MIKAPOCo (Multi-Institution knowledge-based approach plan optimization for the community) Task group

¹ *Medical Physics Department, San Raffaele Scientific Institute, Milano, Italia*

E-mail: fiorino.claudio@hsr.it

Purpose: To quantify inter-institute variability and evaluate plan transferability *via* Knowledge-Based approach in the contest of Right and Left Whole Breast Irradiation (R/L-WBI).

Materials and methods: Ten institutes delivering WBI with TF technique (wedged or FiF) set their KB model (10 for R-WBI and 8 for L-WBI) by using RapidPlan (Varian Inc.) and following the same criteria of contouring and modeling. Two patients from each center out of the training set were tested on models exporting prediction bands of OARs (heart, ipsi/contralateral lung, contralateral breast). SD of mean predicted DVHs among institutes was assessed as inter-institute variability. Estimated Principal component (PC1) was considered for transferability models evaluation, i.e when the OARs PC1's test set was within 10th-90th percentile of the training set.

Results: Inter-institute variability was around 1.8% for ipsilateral lung in R/L-WBI cases and 1.6% for heart in L-WBI (in the 20-80 % dose range) (Figure 1). For R-WBI study: the predicted ipsilateral lung D_{mean} test set patients was correlated with median PTV D99% data set ($R^2 = 0.78$), once excluded INST6; PC1 values were always within the range of applicability for every model (> 94% of patients) excluding INST6. For L-WBI study: high transferability for both ipsilateral lung and heart (> 80% of successes) was found among institutes; D_{mean} heart prediction was consistent among institutes (1.8 Gy) excluding INST1.

Conclusions: Results show a limited inter-institute variability of plan prediction models and a sufficiently inter-institute transferability, excepting one institute differently for R/L-WBI study. These achievements, obtained within a granted multi-institute MIKAPOCo study, pave the way in generating benchmarks for plan prediction in WBI with potentially relevant applications for large-scale KB-driven automatic plan optimization, QA audit and tutoring/education purposes.

PS

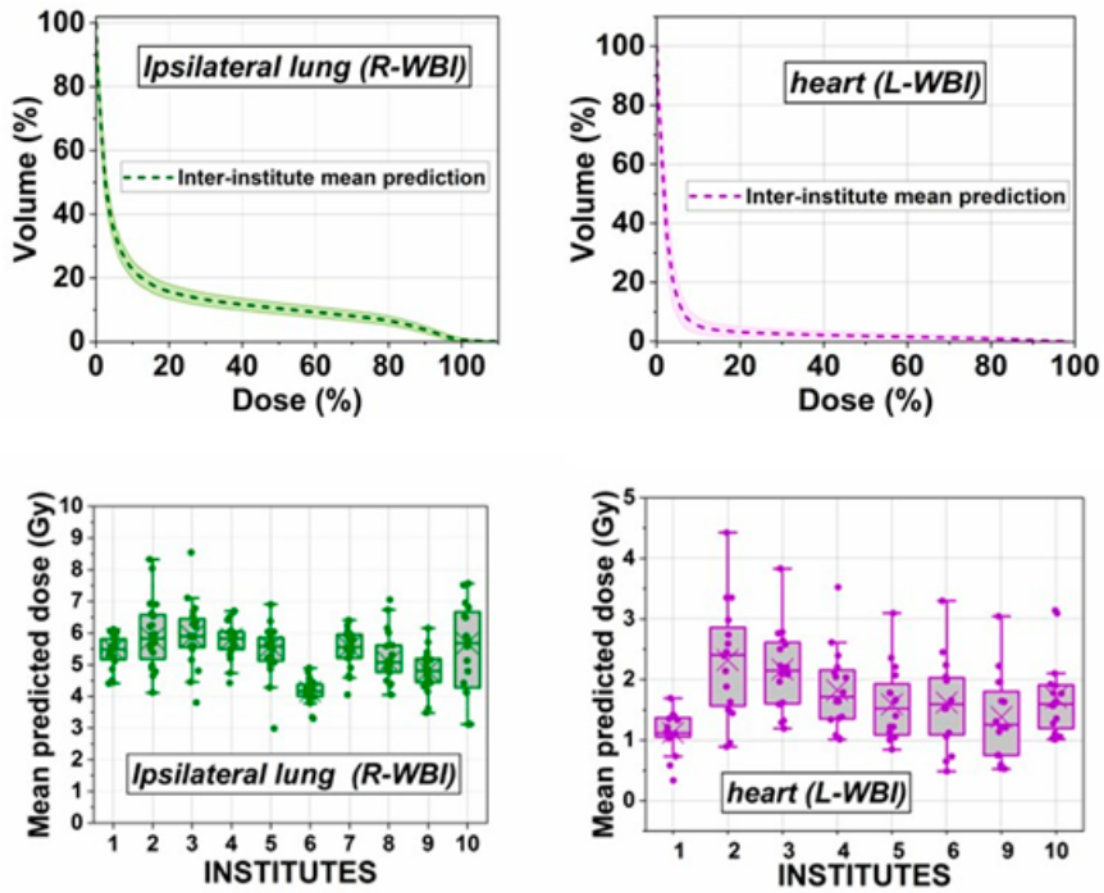


Figure 1. top: mean predicted ipsilateral lung and heart DVH between institutes for R-WBI study (left) and for L-WBI study (right) respectively, filled area represent inter-institute variability; bottom: mean predicted ipsilateral lung and heart data distribution by model institutes on test set patients for R-WBI (left side) and L-WBI (right side) study respectively

PS

AI IN PRECISION MEDICINE: ROLE OF MEDICAL IMAGING

Robert Jeraj^{1,2}

¹ *Department of Medical Physics, University of Wisconsin-Madison, 1111 Highland Ave, Madison, WI 53705-2275, ZDA*

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

Elektronski naslov: robert.jeraj@fmf.uni-lj.si

Artificial Intelligence (AI) is quickly entering many aspects of our lives, including medicine. However, its role and impact is still relatively uncertain. In this lecture, we'll review potential and importance of AI-supported analytics and decision-making based on medical imaging, with specific focus on precision medicine. We will review how the key stakeholders (medicine, imaging and business communities) perceive importance of AI in precision medicine. We will review example of theranostics treatment of gastroenteropancreatic neuroendocrine tumors (GEP-NETs) targeting somatostatin hormone receptors. We will report on how AI-supported image analytics can help with treatment decisions, how it can uncover tremendous heterogeneity of treatment response and complex dynamics of individual-lesion response, which makes it difficult to optimize therapies in the context of precision medicine. Finally, we will briefly review different methods for improving interpretability of AI tools, and regulatory frameworks for enabling adoption of AI-supported tools in medicine.

P6

SPROŠČANJE DEJAVNIKOV IMUNOGENE CELIČNE SMRTI HMGB1 IN ATP IZ CELIČNIH LINIJ SE POVEČUJE S ČASOM PO OBSEVANJU

Urša Kešar^{1,2}, Tanja Jesenko^{1,2}, Boštjan Markelc^{1,3}, Katja Uršič Valentinuzzi^{1,4}, Maja Čemažar^{1,5}, Primož Strojani^{2,6}, Gregor Serša^{1,3}

¹ Odderek 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 Biotehniška fakulteta, Univerza v Ljubljani, Jamnikarjeva 101, 1000 Ljubljana, Slovenija

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

⁶ Sektor radioterapije, Onkološki inštitut Ljubljana, Zaloška cesta 2, 1000 Ljubljana, Slovenija

Elektronski naslov: ukesar@onko-i.si

Ionizirajoče sevanje poškoduje genetski material celic (DNA) s čimer onemogoči njihovo nadaljnje deljenje. Poleg neposrednega citotoksičnega učinka s povzročitvijo apoptoze, pa obsevanje učinkuje tudi preko aktivacije imunskega sistema, tj. s povzročitvijo imunogene celične smrti (ICD) (1). ICD predstavlja način umiranja celic, ki učinkovito spodbudi pridobljeni imunski odziv proti neo-antigenom, ki jih sproščajo umirajoče ali mrtve celice (2). Imunski odziv ojačajo molekule DAMP (ang. damage-associated molecular patterns, oz. s poškodbo povezani molekulski vzorci), ki se sproščajo iz celic in služijo kot signali nevarnosti (3). Dve izmed molekul DAMP sta tudi jedrni protein HMGB1 (ang. high mobility group box 1, oz. protein visoko-mobilne skupine 1) in ATP, ki se ob ICD sprostita iz celic (4). Namen naše raziskave je bil ugotoviti kako doza obsevanja, čas po obsevanju vpliva na sproščanje HMGB1 in ATP iz treh različnih mišjih tumorskih celičnih linij, ki tvorijo različno imunogene tumorske modele. Uporabili smo celično linijo melanoma B16F10, karcinoma dojke 4T1 ter karcinoma debelega črevesa CT26. Obsevali smo jih z dozami pri katerih umre 30, 50 ali 70 % celic (IC_{30} , IC_{50} , IC_{70}), ki smo jih določili s testom klonogenosti, sproščanje HMGB1 in ATP pa spremljali 4, 24 in 48 h po obsevanju. Pokazali smo, da v primerjavi z ostalima linijama, največ proteina HMGB1 (absolutna vrednost) sprosti celična linija 4T1, sproščanje pa se povečuje z daljšanjem intervala od obsevanja. Sproščanje HMGB1 se povečuje tudi z dozo sevanja, ki pa je značilno le 48 ur po obsevanju celične linije CT26 v primerjavi z neobsevanimi kontrolnimi celicami. Največ ATP se v primerjavi z ostalima linijama sprosti pri celični liniji CT26. Koncentracija ATP narašča s časom po obsevanju in doseže maksimum 48 ur po obsevanju pri vseh treh linijah. 48 ur po obsevanju se pri vseh treh linijah začne pojavljati tudi apoptoza. Naši rezultati kažejo, da je sproščanje proteina HMGB1 ter sproščanje ATP odvisno od vrste tumorskih celic, doze obsevanja ter časa po obsevanju. Za nadaljnjeovrednotenjeICDbodopotrebnešedodatneraziskavesproščanjemolekulDAMP.

Literatura

1. Sia J, Szmyd R, Hau E, Gee HE. Molecular mechanisms of radiation-induced cancer cell death: a primer. *Front Cell Dev Biol.* 2020;8:41.
2. Galluzzi L, Vitale I, Warren S, et al. Consensus guidelines for the definition, detection and interpretation of immunogenic cell death. *J Immunother Cancer.* 2020; 8(1):e000337.
3. Kroemer G, Galluzzi L, Kepp O, Zitvogel L. Immunogenic cell death in cancer therapy. *Annual Review of Immunology. Annu Rev Immunol.* 2013;31:51–72.
4. Kepp O, Galluzzi L, Martins I, et al. Molecular determinants of immunogenic cell death elicited by anticancer chemotherapy. *Cancer Metastasis Rev.* 2011;30(1):61–69.

P7

RADIOOZNAČENI LIGANDI CCK2R KOT POTENCIALNI RADIOFARMAKI V TERANOSTIKI BOLNIKOV Z MEDULARNIM RAKOM ŠČITNICE – PRIMER TRANSLACIJSKE ŠTUDIJE (ŠTUDIJA PREDKLINIKE)

Petra Kolenc¹, Renata Mikolajczak², Clemens Decristoforo³, Theodosia Maina⁴, Katja Zaletel¹, Alicja Hubalewska-Dydejczyk⁵

¹ *Klinika za nuklearno medicino, Univerzitetni klinični center Ljubljana, Zaloška 2, 1000 Ljubljana, Slovenija*

² *Radioisotope Centre POLATOM, National Centre for Nuclear Research, Otwock, Poljska*

³ *Department of Nuclear Medicine, Medical University Innsbruck, Innsbruck, Avstrija*

⁴ *Molecular Radiopharmacy, INRASTES, NCSR "Demokritos", Atene, Grčija*

⁵ *Chair and Department of Endocrinology, Jagiellonian University Medical College, Krakow, Poljska*

Elektronski naslov: petra.kolenc@kclj.si

Radiofarmaki so z radionuklidi označene molekule, ki jih uvrščamo med zdravila. Glede na namen uporabe, oziroma uporabljen tip radioizotopa, jih delimo na radiodiagnostike in radioterapevtike. Teranostični pristop v nuklearni medicini vključuje kombinacijo molekularne diagnostike in terapije, in sicer z uporabo iste nosilne molekule, označene z različnimi radionuklidi. Tovrstni radiofarmaki so praviloma sestavljeni iz vektorskega dela, distančnika in bifunkcionalnega kelatorja, ki je izbran na način, da omogoča tvorbo kelata z različnimi radioizotopi. Vektorski del molekule je tisti, ki v osnovi definira vezavo na izbrano tarčo. Ena od takšnih tarč je tudi holecistokinski-2/gastrinski receptor (CCK2R), ki je visoko izražen na membranah različnih tumorjev. Ena od bolezni, za katere je značilno čezmerno izražanje CCK2R, je medularni rak ščitnice. Vezava radiooznačenih analogov (mini)gastrina na receptor povzroči internalizacijo receptorja, ki ji sledi zaželeno zadrževanje radioaktivnosti v tumorski celici.

Razvoj novih, izboljšanih analogov (mini)gastrina smo zasnovali v okviru t.i. COST akcije Targeted Radionuclide Therapy (Ciljana radionuklidna terapija), v kateri smo sodelovali številni evropski laboratoriji. V primerjalni študiji izbora najprimernejše spojine kandidatke za nadaljnji razvoj in translacijo, je bil na osnovi predkliničnih *in vitro* ter *in vivo* testiranj izbran analog minigastrina [¹¹¹In]In-CP04. Predklinična testiranja so v prvi fazi zajemala *in vitro* preverjanja jakosti vezave, obsega internalizacije v izbranih celičnih linijah AR4-2J in/ali A431-CCK2R ter *in vivo* študijo optimalne biodistribucije na živalskem modelu BALB/c miši s subkutanim tumorjem, induciranim z inokulacijo A431-CCK2R celične linije. V nadaljevanju smo z izbranim radiopeptidom izvedli razširjeno študijo biodistribucije za oceno dozimetrije. Z nosilno molekulo (CP04) je bila v skladu z ICH smernicami M3 (R2) izvedena študija toksičnosti na podganah. Na osnovi dobljenih rezultatov (NOAEL, no observed adverse effect level) in dozimetrične ocene smo zasnovali in razvili ustrezno formulacijo, primerno za uporabo v klinični študiji (1, 2).

Rezultati vseh predkliničnih testiranj, vključno s podatki vezanimi na razvoj formulacije, so nam služili za pripravo dosjeja o zdravilu (IMPD). Ključni dokumenti, kot so klinični protokol, IMPD, pozitivna ocena etičnosti raziskave posameznih držav, članic konzorcija, obrazec pisne privolitve preizkušanca in nekatere drugi, so nam omogočili prijavo klinične študije na posamezne nacionalne agencije za zdravila, pod skupno EudraCT številko 2015-000805-38 (3). Po odobritvi študije in iniciaciji posameznih kliničnih centrov smo akademsko klinično študijo faze I izvedli na Poljskem, v Avstriji, na Nizozemskem in v Sloveniji.

Literatura

1. Maina T, Konijnenberg MW, Kolenc Peitl P, et al. Preclinical pharmacokinetics, biodistribution, radiation dosimetry and toxicity studies required for regulatory approval of a phase I clinical trial with (111)In-CP04 in medullary thyroid carcinoma patients. *Eur J Pharm Sci.* 2016;91:236-242.
2. Pawlak D, Rangger C, Kolenc Peitl P, et al. From preclinical development to clinical application: Kit formulation for radiolabelling the minigastrin analogue CP04 with In-¹¹¹ for a first-in-human clinical trial. *Eur J Pharm Sci.* 2016;85:1-9.
3. Kolenc Peitl P, Rangger C, Garnuszek P, et al. Clinical translation of theranostic radiopharmaceuticals: Current regulatory status and recent examples. *Journal of labelled compounds & radiopharmaceuticals.* 2019;62(10):673-683.

KOMBINIRANO ZDRAVLJENJE SOLIDNIH TUMORJEV Z INTRATUMORALNIM GENSKIM ELEKTROPRENOSOM PLAZMIDNE DNA Z ZAPISOM ZA PROTITELESA ANTI-CTLA4 IN OBSEVANJEM

Simona Kranjc Brezar^{1,2}, Boštjan Markelc^{1,3}, Tanja Jesenko^{1,2}, Tim Božič^{1,2}, Paul Declerck^{4,5}, Liesl Jacobs⁵, Maja Čemažar^{1,6}, Kevin Hollevoet^{4,5}, Gregor Serša^{1,3}

¹ Odderek 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 Laboratorij za terapevtska in diagnostična protitelesa, KU Leuven - Univerza v Leuvnu, Leuven, Belgija

⁵ PharmAbs - Center za protitelesa KU Leuven, KU Leuven - Univerza v Leuvnu, Belgija

⁶ Fakulteta za vede o zdravju, Univerza na Primorskem, Polje 42, 6130 Izola, Slovenija

Elektronski naslov: skranjc@onko-i.si

Rekombinantna monoklonska protitelesa (mAbs) so eden izmed najbolj obetavnih imunskih pristopov zdravljenja raka. Po odobritvi protitelesa Ipilimumab anti-CTLA-4 (citotoksični T-limfocitni protein 4) za zdravljenje melanoma s strani FDA se je področje močno razširilo in razvita so bila mAb, usmerjena proti več drugim imunskim kontrolnim točkam (IKT). Zaviralci imunskih kontrolnih točk (ZIKT) se uporabljajo za zdravljenje različnih vrst raka. Vendar imajo mAbs več pomanjkljivosti, vključno z visokimi proizvodnimi stroški, pogostim visokim odmerjanjem, omejeno učinkovitostjo kot posamezna zdravila in sistemsko toksičnostjo po *i.v.* infuziji. Sistemsko toksičnost, povezano z imunskim sistemom, je mogoče zaobiti z intratumoralnim vbrizgavanjem mAb, ki sicer ohranjajo podobno učinkovitost, vendar še vedno zahtevajo pogosto odmerjanje. Po drugi strani pa plazmidna DNK (pDNA), ki kodira protitelesa IKT, predstavlja obetavno alternativo običajnim proteinom mAb. Za dostavo plazmidne DNA, ki nosi zapis za protitelesa IKT v celice in tkiva, vključno s tumorji, lahko uporabimo genski elektroprenos (GEP), ki temelji na elektroporaciji, s katero povečamo vnos v celice. ZIKT so še posebej učinkoviti pri zdravljenju tumorjev z že obstoječo protitumorsko imunostjo ("topli tumorji"), pri tumorjih brez protitumorske imunosti ("hladni tumorji") pa je njihova učinkovitost omejena. Z radioterapijo lahko sprožimo začetek prehoda iz hladnih v vroče tumorje in tako olajšamo delovanje ZIKT. Da bi preučili terapevtski potencial kombinacije intratumoralnega GEP ZIKT in radioterapije, smo izvedli GEP plazmidne DNA, ki kodira mišja protitelesa mAb proti CTLA-4 (p(aCTLA4)), in ga kombinirali z dvema režimoma obsevanja, enkratnim odmerkom 10 Gy in frakcioniranim odmerkom 3×5 Gy, pri mišjem raku debelega črevesa MC38. Najprej smo primerjali dva predhodno določena sklopa parametrov električnih pulzov GEP, in sicer enega za dostavo pDNA v tumorje (8 električnih pulzov, 600 V/cm, 5 ms, 1 Hz) ter drugega za elektrokemoterapijo ((EKT), 8 električnih pulzov, 1300 V/cm, 100 μ s, 1 Hz). Raven anti-CTLA4 mAb v plazmi po GEP p(aCTLA4) v

tumorje je bila podobna ne glede na uporabljene parametre električnih pulzov, vendar pa smo zaradi izrazitega protitumorskega delovanja kontrolne plazmidne DNA (pCtrl) po GEP v tumorje, v preostalih poskusih uporabili parametre sklopa EKT. Pri kombinaciji GEP p(aCTLA4) z obsevanjem je imela kombinacija s frakcioniranim odmerkom 3×5 Gy večji imunostimulacijski in izrazitejši protitumorski učinek kot kombinacija z enkratnim odmerkom obsevanja 10 Gy. Poleg tega je bila le kombinacija frakcioniranega obsevanja z GEP p(aCTLA-4) učinkovitejša od kombinacije s GEP pCtrl.

Potrdili smo, da je intratumorski GEP p(aCTLA4) lahko potencialna alternativa sistemski infuziji ZIKT in da je v kombinaciji z obsevanjem mogoče doseči protitumorski učinek. Prihodnje raziskave se bodo osredotočile na določitev optimalnega režima za "stimulativno" delovanje GEP p(aCTLA4) po obsevanju in tudi na možnost uporabe pDNA, ki bi nosila zapis za druge ZIKT, da bi dosegli boljši protitumorski učinek.

ORGANOIDI GLIOBLASTOMA RAZKRIVAJO ODPORNOST NA STANDARDNO TERAPIJO

Bernarda Majc¹, Anamarija Habič^{1,2}, Marta Malavolta³, Aleksander Sadikov³, Andrej Porčnik⁴, Jernej Mlakar⁵, Tamara Lah Turnšek¹, Barbara Breznik¹, Metka Novak¹

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

² Mednarodna podiplomska šola Jožefa Stefana, Jamova cesta 39, 1000 Ljubljana, Slovenija

³ Fakulteta za računalništvo in informatiko, Večna pot 113, 1000 Ljubljana, Slovenija

⁴ Klinični oddelek za nevrokirurgijo, Univerzitetni klinični center Ljubljana, Zaloška cesta 7, 1000 Ljubljana, Slovenija

⁵ Inštitut za patologijo, Medicinska fakulteta, Univerza v Ljubljani, Korytkova 2, 1000 Ljubljana, Slovenija

Elektronski naslov: bernarda.majc@nib.si

Glioblastom (GB) ostaja zelo agresivna in najsmrtonosnejša oblika možganskega tumorja s slabo prognozo. Standardno zdravljenje vključuje kirurgijo, ki ji sledita, radioterapija in kemoterapija s temozolomidom, vendar se tumor zaradi prisotnosti na terapijo odpornih rakavih celic in podpore tumorskega mikrookolja ponovi. Ovira za razvoj zdravil in preučevanje terapevtskega odziva GB, je pomanjkanje ustreznega predkliničnega modela, ki bi predstavljal kompleksnost tumorja. Vzpostavili smo *ex vivo* model glioblastoma – glioblastomske organoide, pridobljene iz tumorjev bolnikov. Organoide in pripadajoča izvorna tumorska tkiva smo primerjali z imunofluorescenčnim barvanjem označevalcev izbranih celičnih tipov in qPCR analizo izražanja izbranih tarčnih genov. Na ravni izražanja genov smo identificirali štiri različne skupine genov, ki so bile podobne v obeh vzorčnih skupinah, tj. organoidih in izvornih tumorskih tkivih. Skupino 1 sestavljajo geni, povezani z glioblastomskimi matičnimi celicami (GSC), celičnim ciklom in odzivom na poškodbe DNA. Skupino 2 sestavljajo geni, ki določajo pronevralni podtip GB po klasifikaciji programa TCGA (The Cancer Genome Atlas). Skupina 3 vsebuje gene za mezenhimski podtip GB, gene, vključene v signalizacijo citokinov in gene, ki se izražajo v celicah GSC. Skupina 4 vsebuje gene, ki sodelujejo pri signalizaciji citokinov in gene, ki določajo imunske celice tumorskega mikrookolja. Podobni vzorci in korelacije med geni v obeh skupinah (organoidih in izvornih tumorskih tkivih) kažejo, da organoidi ohranjajo enak transkriptomski profil kot tkiva GB. Organoide smo izpostavili enkratnemu obsevanju z dozo 10 Gy, tedensko temozolomidu ali njuni kombinaciji. Obsevanje v kombinaciji s kemoterapijo ni povzročilo sprememb v viabilnosti ter invaziji organoidov, analize qPCR pa so pokazale spremembe v izražanju genov E3 ubikvitin-proteinske ligaze (MDM2), ciklin-odvisne inhibitor kinaze 1A (CDKN1A) in serin/treonin kinaz ATM in ATR.

Organoidi GB, pridobljeni iz tumorjev bolnikov, povzemajo ključne lastnosti in kompleksno sestavo bolnikovih tumorskih tkiv in zagotavljajo klinično pomemben celični model *in vitro* za ocenjevanje specifičnih odzivov bolnikov z GB na terapijo.

SMRT ENDOTELIJSKIH CELIC PO IONIZIRAJOČEM SEVANJU NE VPLIVA NA FUNKCIONALNOST TUMORSKEGA ŽILJA V MIŠJIH TUMORSKIH MODELIH

Boštjan Markelc^{1,2}

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

² *Department of Oncology, Cancer Research UK in MRC Oxford Institute for Radiation Oncology, University of Oxford, Old Road Campus Research Building, Roosevelt Drive, Oxford, OX3 7DQ, Združeno Kraljestvo*

Elektronski naslov: bmarkelc@onko-i.si

Učinek radioterapije na tumorsko žilje je že dolgo predmet raziskav. Dokazano je bilo, da je lahko tekom radioterapije povečana oksigenacija in perfuzija v tumorju. Po drugi strani, pa naj bi z obsevanjem povzročena apoptoza tumorskih endotelijskih celic pomembno doprinesla k odzivu tumorja na obsevanje. Z namenom, da bi preučili ta nasprotja, smo uporabili abdominalno okno in multifotonsko mikroskopijo na dveh modelih mišjih tumorjev: adenokarcinomu debelega črevesa MC38, ki je dobro vaskulariziran, in melanomu B16-F10, ki je zmerno vaskulariziran model. Oba tumorska modela smo nasadili v transgene miši, ki so imele endotelijske celice označene s fluorescenčnim proteinom tdTomato ter jih nato obsevali z enkratno (15 Gy) ali frakcionirano (5 x 3 Gy) dozo sevanja. Nepričakovano so tudi ti visoki odmerki povzročili le malo strukturnih sprememb v funkcionalnem tumorskem žilju, kjer je bil prisoten krvni pretok. Nasprotno pa so bile tumorske žile in slepi konci brez krvnega pretoka po obsevanju bistveno bolj prizadete, kar se je pokazalo v apoptozi in zmanjšani proliferaciji njihovega endotelija. RNAseq analiza tumorskih endotelijskih celic po obsevanju je potrdila spremembe v izražanju genov v apoptotičnih signalnih poteh in signalnih poteh povezanih z regulacijo celičnega cikla. Naši rezultati kažejo, da obsevanje povzroči apoptozo ter zmanjšano proliferacijo tumorskih endotelijskih celic v nefunkcionalnih, nepretočnih tumorskih žilah, kar pa ne vpliva na samo funkcionalnost tumorskega žilja (1).

Literatura

1. Kaeppler JR, Chen J, Buono M, et al. Endothelial cell death after ionizing radiation does not impair vascular structure in mouse tumor models. *EMBO Rep.* 2022;23(9).

P11

AKTIVACIJA VZORČNO PREPOZNAVNIH SENZORJEV PO GENSKEM ELEKTROPRENOSU PLAZMIDA Z ZAPISOM ZA INTERLEVKIN-12

Ajda Medved^{1,2}, Tanja Jesenko¹, Gregor Serša^{1,3}, Maša Bošnjak¹, Maja Čemažar^{1,4}

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

² *Univerza v Ljubljani, Fakulteta za Medicino, Vrazov trg 2, 1000 Ljubljana, Slovenija*

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

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

Elektronski naslov: amedved@onko-i.si

Medtem ko se za zdravljenje bolnikov z rakom že desetletja kombinirajo standardni načini zdravljenja raka, kot so kirurgija, radioterapija in sistemsko zdravljenje, se je zaradi pojava novih področij raziskovanja raka ponovno povečalo zanimanje za kombiniranje standardnih načinov zdravljenja z novejšimi pristopi, kot je genska terapija. Gensko zdravljenje je terapevtska strategija, ki uporablja gene kot terapevtske dejavnike. Med gensko terapijo se terapevtski gen vstavi v ciljne celice z namenom zamenjave mutiranega gena, ki povzroča bolezen z zdravo kopijo tega gena. Ta pristop pa ni edini in predstavlja le eno izmed strategij za zdravljenje različnih bolezni z gensko terapijo. Največkrat uporabljeni vektorji za dostavo nukleinskih kislin so virusni, veliko pozornosti na področju genske terapije pa je usmerjene v razvoj plazmidne DNA. Za take vektorje velja, da so varnejši od virusnih in jih je mogoče dostaviti več kot enkrat. Poleg tega lahko vsebujejo dolg genetski zapis in jih je relativno enostavno in poceni izdelati.

Eksogene nukleinske kisline, kot sta DNA in RNA, ki jih s terapijo vstavimo v celice, jih le-te prepoznajo kot vdor patogenov oz. kot s patogeni povezane molekulske vzorce (PAMPs). PAMPs s svojo prisotnostjo v celicah aktivirajo vzorčno prepoznavne receptorje (PRRs). Signalna transdukcija, ki sledi aktivaciji PRRs inducira proizvodnjo provnetnih citokinov in interferonov tipa I (IFN). IFN tipa I imajo osrednjo vlogo pri protivirusnih odzivih, saj povzročajo prepisovanje genov, stimuliranih z IFN. Aktivacija teh genov vodi v vnetje ali celično smrt; obe posledici pa lahko pomembno vplivata na terapevtsko učinkovitost.

Ena izmed genskih terapij za zdravljenje raka je genski elektroprenos (GET) plazmidne DNA z zapisom za citokin interlevkin-12 (IL-12). Plazmidna DNA, ki jo vnesemo v celice z GET, bi lahko aktivirala različne PRRs, zato je bil cilj naše študije ovrednotiti učinek GET plazmidne DNA z zapisom za IL-12 na nekatere PRRs pri mišji CT26 celični liniji.

Za GET v celice CT26 smo uporabili plazmidno DNA z zapisom za mišji IL-12 (1 mg/ml), nekodirajočo plazmidno DNA (1 mg/ml, pScramble) in plazmid z zapisom za zeleno fluorescirajoč protein (pEGFP). Za prenos plazmidov smo uporabili elektrode z 2-mm razdaljo in 8 električnih pulzov, s trajanjem 100 μ s in frekvenco 5 Hz in napetosti

240 V. Viabilnost celic smo določili 3 dni po terapiji, učinkovitost transfekcije 2 dni po GET pEGFP, izražanje različnih PRRs, ter izražanje IL-12 pa je bilo določeno s qRT-PCR 4, 24, 48 ur po terapiji. Transfecirali smo približno 6 % celic. Viabilnost celic se je znatno zmanjšala po GET. Nivo izražanja IL-12 je začel padati po 24 urah in pri 48 urah padel pod nivo zaznave. GET IL-12 in GET pSCRLsta povzročila povišano izražanje dveh DNA vezavnih receptorjev DDX60, DAI pri vseh časovnih točkah, med tem ko se je nivo izražanja LGP2, RNA vezavnega receptorja, povišal samo po 24 urah, po GET IL-12.

Če povzamemo, je GET plazmidne DNA z zapisom za IL-12, povzročil aktivacijo tako DNA kot RNA PRRs, kar je najverjetneje posledica uspešno transfecirane DNA in prepisane mRNA za IL-12. Za pridobitev globljega vpogleda na povezavo med aktivacijo PRRs in protitumorskega učinka na CT26 celično linijo bomo izvedli dodatne poskuse.

P12

RAZVOJ IN KARAKTERIZACIJA MIŠJEGA MODELA ZA ŠTUDIJE HPV-POZITIVNEGA RAKA GLAVE IN VRATU

Živa Modic^{1,2}, Maja Čemažar^{1,3}, Boštjan Markelc¹, Andrej Cör^{4,5}, Gregor Serša^{1,6},
Simona Kranjc Brezar^{1,2}, Tanja Jesenko^{1,2}

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

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

³ Fakulteta za vede o zdravju, Univerza na Primorskem, Polje 42, 6130 Izola, Slovenija

⁴ Ortopedska bolnišnica Valdoltra, Jadranska cesta 31, 6280 Ankaran, Slovenija

⁵ Pedagoška fakulteta, Univerza na Primorskem, Cankarjeva pot 5, 6000 Koper, Slovenija

⁶ Zdravstvena fakulteta, Univerza v Ljubljani, Zdravstvena pot 5, 1000 Ljubljana, Slovenija

Elektronski naslov: zmodic@onko-i.si

Ploščatocelični karcinom ustnega predela (PKU) vključuje raka ustne votline, ustnic ter ustnega dela žrela. Eden od dejavnikov tveganja za razvoj PKU je tudi dolgotrajna okužba z visoko rizičnimi podtipi humanega papilomavirusa (HPV). Nekateri bolniki s HPV-pozitivnim PKU se bolje odzovejo na zdravljenje z radioterapijo. Zaradi vrstne specifičnosti HPV so imunokompetentni modeli HPV-pozitivnega PKU redki, zato je predklinično preučevanje teh vrst tumorjev oteženo. Namen naše raziskave je bil vzpostaviti in okarakterizirati HPV-pozitivni mišji model PKU s stabilnim izražanjem onkogenov E6 in E7 HPV-16. Z retrovirusno transdukcijo smo iz mišje celične linije PKU MOC1 vzpostavili monoklonski HPV-pozitivni celični liniji (MOC1-HPV K1 in MOC1-HPV K3), v katerih smo potrdili stabilno izražanje E6 in E7 na RNA in proteinskem nivoju. *In vitro* karakterizacija vzpostavljenih celičnih linij je pokazala, da se celični liniji razlikujeta v morfologiji ter hitrosti celične migracije, ki smo jo določali s testom celjenja raze. Tako *in vitro* kot *in vivo* smo določili radioobčutljivost ter z imunofluorescenčnim barvanjem zaledenelih tumorskih rezin opredelili razlike v tumorskem mikrookolju. Določali smo prisotnost hipoksije (EF5), proliferacije (EdU), ožiljenosti (CD31) ter infiltracijo CD4 in CD8 celic T in makrofagov (F4/80). S testom klonogenosti po obsevanju z naraščajočimi dozami nismo zaznali statistično značilnih razlik v radioobčutljivosti HPV-pozitivnih celičnih linij v primerjavi s starševsko linijo. *In vivo* pa je bila po obsevanju z enkratno dozo 15 Gy radioobčutljivost tumorskega modela MOC1-HPV K1 večja, kar se je odražalo v daljšem zaostanku v rasti tumorjev v primerjavi z modeloma MOC1 in MOC1-HPV K3. Z imunofluorescenčnim barvanjem smo v tumorjih MOC1-HPV K1 smo zaznali nižjo raven hipoksije ter večji delež proliferajočih celic, kar nakazuje na možen mehanizem povečane radioobčutljivosti tumorskega modela MOC1-HPV K1. Tako *in vitro* kot *in vivo* rezultati sovpadajo z rezultati analize transkriptoma celičnih linij, kjer 20 najbolj obogatenih pojmov genske ontologije vključuje procese, povezane s celično migracijo in angiogenezo. Z raziskavo smo vzpostavili in okarakterizirali nov mišji tumorski model HPV-pozitivnega PKU, ki omogoča raziskave HPV-pozitivnih PKU na imunokompetentnih miših.

SURGICAL WOUND FLUIDS FROM PATIENTS TREATED WITH INTRAOPERATIVE RADIOTHERAPY CHANGES THE PHENOTYPE OF NORMAL AND MALIGNANT FIBROBLASTS

Oliwia Piwócka^{1,2}, Katarzyna Kulcenty², Wiktoria Suchorska^{1,2}

¹ *Department of Electroradiology, Poznan University of Medical Sciences, Poznań, Polska*

² *Radiobiology Laboratory, Department of Medical Physics, Greater Poland Cancer Centre, Poznań, Polska*

E-mail: oliwia.piwocka@wco.pl

Breast-conserving surgery (BCS) and radiotherapy are the standard treatments for breast cancer (BC). Local recurrences are the biggest challenge in conservative treatment. One of the concepts explaining this phenomenon is the induction of the wound healing process by fibroblasts. The presence of inflammatory factors after surgery was confirmed in the surgical wound fluid (SWF) in patients with BC. The study's objective is to assess the impact of SWF on cells present in the tumour microenvironment - cancer-associated fibroblasts (CAFs) and normal fibroblasts (NFs). To accomplish that, primary cell lines of CAFs from Luminal A and B BC subtypes and cell lines of NFs isolated from patients corresponding to CAF cells were used. Primary cells were supplemented with 10% SWF from patients with Luminal A or B tumours after BCS alone, or BCS followed by intraoperative radiotherapy. The effects were assessed with immunofluorescence, flow cytometry and PCR by analysis of the biomarkers specific to CAF phenotype and epithelial-to-mesenchymal transition (EMT). Immunofluorescence revealed that SWF alters fibroblast phenotype by inducing fibroblast activation protein (FAP) expression and enhancing alpha-smooth muscle actin (α SMA) expression. Moreover, flow cytometry and PCR results suggest a high contribution of SWF to EMT. Cytokines and growth factors present in SWF can potentially change cells' phenotype and alter their differentiation by contributing to EMT.

P14

RADIOSENZIBILIZACIJA TUMORJEV Z ELEKTROPRENOSOM PLAZMIDA ZA DVE ANTIANGIOGENI TARČI

Monika Savarin^{1,2}, Katarina Žnidar¹, Gregor Serša^{1,3}, Tilen Komel^{1,4}, Maja Čemazar^{1,2},
Urška Kamensek^{1,5*}

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

² Fakulteta za zdravstvene vede, Univerza na Primorskem, Polje 42, 6310 Izola, Slovenija

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

⁴ Medicinska fakulteta, Univerza v Ljubljani, Vrazov trg 2, Ljubljana, 1000 Ljubljana, Slovenija

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

Elektronski naslov: ukamensek@onko-i.si

Ciljanje tumorskega žilja preko specifičnih označevalcev endotelijskih celic, vključenih v različne signalne poti, predstavlja obetaven pristop za radiosenzibilizacijo tumorjev. Dve pomembni tarči sta endoglin (CD105), ko-receptor za transformirajoči rastni dejavnik β in adhezijska molekula melanomskih celic (CD146), ki je prisotna na številnih tumorjih. V naši nedavni študiji *in vitro* smo pripravili in ovrednotili plazmid za sočasno utišanje teh dveh tarč (1). V tej študiji pa smo želeli raziskati terapevtski potencial tega novega plazmida po genskem elektroprenosu *in vivo* ter pojasniti učinke kombiniranega zdravljenja z radioterapijo. Protitumorski učinek smo ocenili z določitvijo zaostanka v rasti eksperimentalnih tumorjev in deleža ozdravljanjih na singenem tumorskem modelu adenokarcinoma mlečne žleze TS/A. Za določitev mehanizmov odgovornih za terapevtski učinek smo naredili histološko analizo tumorjev, kjer smo ocenjevali vaskularizacijo, proliferacijo, hipoksijo, nekrozo, apoptozo in infiltracijo imunskih celic. Poleg tega smo ocenjevali tudi morebitno aktivacijo imunskega odziva z določanjem indukcije DNA senzorja STING in izbranih pro-vnetnih citokinov z metodo qRT-PCR. Rezultati so potrdili radiosenzibilizacijo in aktivacijo imunskega odziva ter nakazali dober terapevtski potencial tega pristopa genskega zdravljenja in to na sicer radiorezistentnem in imunološko hladnem tumorskem modelu TS/A. Pristop torej predstavlja obetaven nov način zdravljenja za širok spekter tumorjev (2).

Literatura

1. Savarin M, Kamensek U, Žnidar K, Todorovic V, Sersa G, Cemazar M. Evaluation of a novel plasmid for simultaneous gene electrotransfer-mediated silencing of cd105 and cd146 in combination with irradiation. *Int J Mol Sci.* 2021;22(6):1–18.
2. Savarin M, Žnidar K, Sersa G, Komel T, Cemazar M, Kamensek U. Tumor radiosensitization by gene electrotransfer-mediated double targeting of tumor vasculature. *Int J Mol Sci.* 2023;24(3).

INFRASTRUKTURA NIX ZA UPORABO METOD STROJNEGA UČENJA NA MEDICINSKIH SLIKAH

Andrej Studen^{1,2}

¹ *Fakulteta za matematiko in fiziko, Univerza v Ljubljani, Jadranska 19, 1000 Ljubljana, Slovenija*

² *Institut Jožef Stefan, Jamova 39, 1000 Ljubljana, Slovenija*

Elektronski naslov: andrej.studen@ijs.si

Kvantitativni slikovni biomarkerji (QIB) so kvantitativne mere pridobljene iz medicinskih slik, povezane z diagnozo, potekom bolezni ali uspešnostjo zdravljenja (1). Strojno učenje in metode umetne inteligence so orodja za identifikacijo, kalibracijo in validacijo QIB (2). Zanesljivost in robustnost QIB se bistveno poveča z izboljšanjem kvalitete in obširnostjo nabora kliničnih podatkov, ki jih metode uporabljajo med učenjem (3).

Vzvod za doseganje ciljne kvalitete je uporaba robustnih orodij pri zbiranju, urejanju in analizi podatkov, npr. s standardiziranimi podatkovnimi bazami, validiranimi analitskimi orodji in upoštevanjem dobre klinične raziskovalne prakse (4). Zaradi kompleksnosti implementacije, težav pri uporabi ter pomanjkljive infrastrukture je, kljub jasni strategiji, sistem uporabe orodij redko vzpostavljen v celoti, kar vodi v omejeno uporabnost podatkov za iskanje QIB zaradi nepopolnosti, nestandardiziranih spremenljivk in slabe poveztljivosti s podatki iz drugih raziskovalnih okolij in organizacij.

Zaveza NIX (angleško Network of imaging excellence) oz. mreža odličnosti pri slikanju je mednarodna iniciativa, ki stremi k identifikaciji zanesljivih QIB. Jerdo NIX je nabor infrastrukturnih orodij, ki služijo izboljšanju zanesljivosti zbranih podatkov in standardizirani uporabi algoritmov kvantitativne analize medicinskih slik. Bistvene komponente infrastrukture so robustna podatkovna baza s spremljajočimi orodji za vnos in pregled podatkov, skladišče standardizirane programske opreme za robustno identifikacijo in uporabo QIB, ter nabor priporočil in primerov kliničnih študij s spremljajočo uporabo slikovnih informacij. Implementacija infrastrukture je modularna, s centralnim vzorčnim strežnikom in vozlišči pri kliničnih partnerjih. V fazi implementacije o njeni uporabnosti sodimo glede na odzive uporabnikov, uporabnosti pri študijah ter publikacijah, povezanih z uporabo infrastrukture.

Vzorčna infrastruktura NIX je sestavljena iz podatkovnega strežnika na Fakulteti za matematiko in fiziko Univerze v Ljubljani(FMF), programskega skladišča na FMF in računalnika z grafično procesno enoto, GPU na FMF. Zrcalna postavitev je bila vzpostavljena na Onkološkem institutu Ljubljana (OIL) ter Univerzitetnemu kliničnemu centru Ljubljana(UKC). Metodologija je bila uporabljena pri številnih slovenskih in mednarodnih študijah: študiji uspešnosti prepoznavanja resnosti obolenj pri COVID-19, zgodnjemu odkrivanju stranskih učinkov pri zdravljenju metastatskega melanoma z imunoterapijo, napovedovanju ogroženosti za obolenje z rakom dojke, spremljanju toksičnosti zdravljenja raka glave in vratu z obsevanjem, študiji

hipofrakcionacije raka prostate ter raziskavi novih radiofarmakov za nevroendokrine tumorje (5-10). Infrastruktura je omogočala izvedbo mednarodnih farmakoloških študij v skladu z dobro klinično prakso ter rutinsko sprotno uporabo metod globokih mrež kot del prospektivne študije. Študije, ki so uporabljale infrastrukturo, so prestale etično, strokovno in pravno presojo na domačih in tujih strokovnih telesih.

Vzpostavitev infrastrukture in modela NIX je bistveno pripomogla k uporabi metod strojnega učenja v kliničnem raziskovanju in hitrem prenosu raziskovalnih metod analize slike iz akademskega okolja (FMF) v kliniko (OIL, UKC in drugi centri po svetu). Infrastruktura je bila dobro sprejeta pri raziskovalcih in ni zahtevala nesorazmerne količine časa za uvajanje v raziskovalno delo. V naslednjih letih bomo infrastrukturo širili k novim sodelujočim partnerjem in implementirali metode razpršene obdelave slik, ki omogočajo združevanje osebnih podatkov iz različnih institucij brez deljenja samih podatkov.

Literatura

1. O'Connor JPB, Aboagye EO, Adams JE, et al. Imaging biomarker roadmap for cancer studies. *Nat Rev Clin Oncol*. 2017; 14: 169–186.
2. Tharmaseelan H, Hertel A, Rennebaum S, et al. The Potential and Emerging Role of Quantitative Imaging Biomarkers for Cancer Characterization. *Cancers (Basel)*. 2022; 14: 3349.
3. Abramson RG, Burton KR, Yu JP, et al. Methods and challenges in quantitative imaging biomarker development. *Acad Radiol*. 2015; 22(1): 25-32.
4. Willemink MJ, Koszek WA, Hardell C, et al. Preparing Medical Imaging Data for Machine Learning. *Radiology* 2020; 295(1): 4-15
5. Studen, A, Klaneček Ž, Krajc M, et al. Improvement of a radiomics based automated breast density algorithm evaluated on a time series of mammogram. APS March Meeting 2022.
6. Jeraj R, Klaneček Ž, Studen A, Yip SSF. What can imaging tell us about SARS-Cov-2 infection. APS March Meeting 2021.
7. Hribernik N, Huff DT, Studen A, et al. Quantitative imaging biomarkers of immune-related adverse events in immune-checkpoint blockade-treated metastatic melanoma patients: a pilot study. *Eur J Nucl Med Mol Imaging*. 2022; 49(6): 1857-1869.
8. Hachadorian R. Sharma M., Jeraj R, et al. Constructing a Database Infrastructure for the organization of Head and Neck Toxicity Clinical Trial Data in India and Beyond. Submitted to AAPM 2023.
9. Olatunji E, Swanson W, Patel S, et al. Challenges and opportunities for implementing hypofractionated radiotherapy in Africa: lessons from the HypoAfrica clinical trial. *ecancer*. 2023; 17: 1508.
10. Hubalewska-Dydejczyk A, Decristoforo C, Mikolajczak R, et al. Novel ^{99m}Tc-labeled somatostatin receptor antagonists in the diagnostic algorithm of neuroendocrine neoplasms - study design of clinical part of a multicenter first phase TECANT study. EANM 2022.

MOLEKULARNE IN TRANSKRIPCijske SPREMEMBE TUMORSKIH ENDOTELIJSKIH CELIC PO OBSEVANJU PRI MIŠIH

Iva Šantek^{1,2}, Tim Božič¹, Gregor Serša^{1,3}, Boštjan Markelc^{1,3}

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

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

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

Elektronski naslov: isantek@onko-i.si

Rak debelega črevesa in danke je drugi najpogostejši rak pri ženskah in tretji pri moških. Običajni načini zdravljenja raka debelega črevesa so kirurgija, kemoterapija in radioterapija, ki pa so pogosto neučinkoviti. Znano je, da radioterapija ne vpliva le na tumorske celice, temveč tudi na tumorsko mikrookolje, vključno z endotelijskimi celicami (EC), ki se lahko glede na prejeto dozo aktivirajo ali poškodujejo (1). Po aktivaciji z odmerki, višjimi od 2 Gy, se EC spremenijo in preidejo v pro-vnetno stanje. Pomembno je, da EC v pro-vnetnem stanju povečajo izražanje kemokinov, citokinov in adhezijskih molekul, ki povečajo infiltracijo imunskih celic v tumorje, s tem pa okrepijo imunski odziv in povzročijo zmanjšanje tumorja. Nasprotno pa so pri obsevanju (engl. irradiation, IR) z odmerki, višjimi od 15 Gy, poročali o smrti tumorskih EC (2,3). Zato smo želeli *in vitro* ter *in vivo* oceniti učinek različnih odmerkov IR na transkripcijski ravni, s poudarkom na aktivaciji EC in infiltraciji imunskih celic. Najprej smo obsevali humane endotelijske linije EA.hy926 in Hulec5a ter mišje endotelijske linije bEnd.3, 2H11 in SVEC-4-10 z enkratnim odmerkom 0, 2, 4, 6, 8 in 10 Gy. Rezultati so pokazali, da so vsi uporabljeni odmerki IR zmanjšali proliferacijo EC in povečali odstotek mrtvih celic, pri čemer so imeli večji odmerki večji učinek. Preživele EC pa so bile še vedno sposobne proliferacije. Da bi ugotovili učinek IR na ravni *in vivo*, smo spremljali rast podkožno nasajenih mišjih tumorjev adenokarcinoma debelega črevesa MC38 in CT26 v miših C57BL/6 ali Balb/c, po enkratnem obsevanju z dozo 15 Gy ali frakcionirano dozo 5 x 5 Gy. Obe shemi IR sta upočasnili rast tumorjev v primerjavi s kontrolnimi, neobsevanimi tumorji. Nazadnje smo želeli obravnavati učinek IR z enkratnim odmerkom 15 Gy na tumorske EC na transkripcijski ravni, s poudarkom na genih in signalnih poteh, povezanih z aktivacijo endotelija in imunskim odzivom. Da bi odgovorili na to vprašanje, smo naredili RNAseq analizo tumorskih EC, izoliranih iz obsevanih in kontrolnih tumorjev MC38. Z uporabo programske opreme R in diferencialne analize izražanja genov smo v obsevanih vzorcih odkrili 533 genov z značilno povečanim izražanjem (P vrednost < 0,05) in 236 genov z značilno zmanjšanim izražanjem. Naši rezultati kažejo, da IR neposredno vpliva na globalno izražanje genov v tumorskih EC pri miših. Nato smo se osredotočili na gene, povezane z aktivacijo EC in imunskim odzivom. Analiza diferencialnega izražanja genov je pokazala bistveno večje izražanje genov Vcam-1, Vwf, Cd47, Il6, Irf7 in drugih genov pomembnih pri aktivaciji EC. Nato smo z analizo obogatitve genskih nizov

opredelili odvisnosti biološko pomembnih signalnih poti od IR. Med 145 signalnimi potmi, pomembno obogatenimi v obsevanih vzorcih, so bile poti, kot so angiogeneza, preoblikovanje zunajceličnega matriksa, signalizacija interferonov in interleukinov, ki so vse povezane z aktivacijo EC in imunskim odzivom. V naši raziskavi smo potrdili, da IR zmanjšuje proliferacijo in preživetje EC. Poleg tega enkratno obsevanje tumorjev z dozo 15 Gy spremeni izražanje genov, povezanih z aktivacijo EC, te spremembe pa vplivajo na signalne poti, ki lahko podpirajo aktivacijo EC in okrepijo protitumorski imunski odziv.

Literatura

1. Guipaud O, Jaillet C, Clément-Colmou K, François A, Milliat F. The importance of the vascular endothelial barrier in the immune-inflammatory response induced by radiotherapy. *Br J Radiol.* 2018;91(1089):20170762.
2. Jarosz-Biej M, Smolarczyk R, Cichoń T, Kułach N. Tumor microenvironment as a “game changer” in cancer radiotherapy. *Int J Mol Sci.* 2019;20(13):3212.
3. Kozin S V., Duda DG, Munn LL, Jain RK. Neovascularization after irradiation: What is the source of newly formed vessels in recurring tumors? *J Natl Cancer Inst.* 2012;104(12):899-905.

P17

PILOTNA ŠTUDIJA ZDRAVLJENJA POOBESEVALNE KSEROSTOMIJE Z ALOGENSKIMI MEZENHIMSKIMI STROMALNIMI MATIČNIMI CELICAMI – ŠTUDIJSKI PROTOKOL

Urban Švajger^{1,2} in Primož Strojan³

¹ Oddelek za terapevtske storitve, Zavod RS za transfuzijsko medicino, Šlajmerjeva c. 6, 1000 Ljubljana, Slovenija

² Fakulteta za farmacijo, Univerza v Ljubljani, Aškerčeva cesta 7, 1000 Ljubljana, Slovenija

³ Sektor radioterapije, Onkološki Inštitut Ljubljana, Zaloška cesta 2, 1000 Ljubljana, Slovenija

Elektronski naslov: pstrojan@onko-i.si; Vodilni avtor: Primož Strojan

Radioterapija je eden izmed treh temeljnih terapevtskih načinov zdravljenja v onkologiji. V skupini bolnikov z rakom glave in vratu, ki v Sloveniji predstavljajo 3% vseh malignih tumorjev, je z radioterapijo zdravljenih okoli 80% vseh, ki zbolijo za tem rakom (1, 2). Žal radioterapija povzroča akutne in kasne stranske učinke. Do poškodb pride zaradi z obsevanjem povzročene poškodbe DNA, porasta reaktivnih kisikovih spojin in posledične smrti različnih tipov celic, vključno z matičnimi celicami (MC) (3, 4). Ti bolniki pogosto razvijejo kserostomijo (občutek suhih ust zaradi hipofunkcije žlez slinavk) (5, 6). Obstoječi terapevtski pristopi pri teh bolnikih so zelo omejeni in neučinkoviti. Prav tako ne vplivajo na izboljšanje funkcije žlez v smislu njihove regeneracije.

Mezenhimske stromalne matične celice (MSC) so heterogena celična populacija s številnimi terapevtskimi lastnostmi (7). Njihovi učinki so povezani z imunomodulacijo in regeneracijo, ki jih večinoma izražajo preko topnih dejavnikov (npr. citokini ali trofični dejavniki) (8). Del populacije MSC predstavljajo tudi multipotentne MC, ki so sposobne nadomeščanja poškodovanih tkiv. MSC za klinično rabo pridobivamo iz različnih bioloških virov (npr. kostni mozeg, adipozno tkivo, tkivo popkovnice). Tako pridobljene MSC odlikuje nizko izražanje molekul poglobitve tkivne skladnosti, zaradi česar so uporabne tudi v alogenskem kontekstu.

Zaradi kompleksne patologije z obsevanjem povzročene kserostomije in dejstva, da gre lahko tudi za imunsko posredovano bolezen, predstavlja napredno zdravljenje z MSC inovativen terapevtski pristop. Kliničnih dokazov o učinkovitosti tovrstne terapije je manj kot pri drugih indikacijah. Leta 2018 so objavili prve rezultate klinične raziskave, ki je preučevala varnost in učinkovitost avtolognih MSC za zdravljenje kserostomije (9). Leta 2022 so raziskavo nadgradili z objavo rezultatov zdravljenja kserostomije z alogenskimi MSC (10). V obeh primerih so kot vir MSC uporabili maščobno tkivo in potrdili varnost in preliminarno učinkovitost takega zdravljenja.

Namen naše raziskave je, da prvič na ljudeh ocenimo varnost in preliminarno učinkovitost uporabe alogenskih MSC pridobljenih iz tkiva popkovnice za zdravljenje z obsevanjem povzročene kserostomije. Te MSC odlikuje visoka stopnja matičnosti

in izrazito imunomodulatorno delovanje. Raziskavo bomo izvedli na Onkološkem Inštitutu Ljubljana v sodelovanju z Zavodom RS za transfuzijsko medicino, Klinikom za nuklearno medicino UKC Ljubljana in Inštitutom za biokemijo in molekularno genetiko Medicinske fakultete Univerze v Ljubljani. Izvedli bomo nerandomizirano, enocentrično in odprto raziskavo faze I. V raziskavo bomo vključili 10 bolnikov (intervencijska skupina) in 10 zdravih prostovoljcev (kontrolna skupina). Bolniki v intervencijski skupini bodo prejeli ultrazvočno vodenno aplikacijo 50×10^6 MSC v vsako parotidno žlezo in 25×10^6 MSC v vsako submandibularno žlezo. Naš primarni cilj bo spremljanje varnosti intervencije. Naši sekundarni cilji bodo:

- (i) učinkovitost intervencije, ki jo bomo dokazovali z merjenjem nestimuliranega in stimuliranega pretoka in sestave sline, s stopnjo kserostomije, scintigrafsko oceno presaditve/retence/migracije alogenskih MSC, označenih s [^{99m}Tc]Tc-exametazime in s kakovostjo življenja bolnikov;
- (ii) kakovost sline po intervenciji;
- (iii) radiološke spremembe po intervenciji;
- (iv) scintigrafske spremembe po intervenciji;
- (v) in morfološke spremembe žleznega tkiva po intervenciji.

Po zdajšnjih podatkih terapija kserostomije z MSC domnevno pozitivno vpliva na regeneracijo poškodovanih žlez in posledično na izboljšanje njihove funkcije. Za bolnike s kserostomijo predstavlja obetavno novo terapijo, ki lahko pomembno izboljša njihovo kakovost življenja. Pričakujemo, da bodo rezultati naše raziskave pomembno prispevali k razumevanju tovrstnega zdravljenja in njegove uporabnosti ter možnosti njegove optimizacije v prihodnosti.

Literatura

1. Sung H, Ferlay J, Siegel RL, et al. Global Cancer Statistics 2020: GLOBOCAN Estimates of Incidence and Mortality Worldwide for 36 Cancers in 185 Countries. *CA Cancer J Clin.* 2021;71(3):209-249.
2. Rak v Sloveniji 2019. Ljubljana: Onkološki inštitut Ljubljana, Epidemiologija in register raka, Register raka Republike Slovenije, 2022.
3. Peng X, Wu Y, Brouwer U, et al. Cellular senescence contributes to radiation-induced hyposalivation by affecting the stem/progenitor cell niche. *Cell Death Dis.* 2020;11(10):854.
4. Hubenak JR, Zhang Q, Branch CD, Kronowitz SJ. Mechanisms of injury to normal tissue after radiotherapy: a review. *Plast Reconstr Surg.* 2014;133(1):49e-56e.
5. Singh M, Alavi A, Wong R, Akita S. Radiodermatitis: a review of our current understanding. *Am J Clin Dermatol.* 2016;17(3):277-292.
6. Siddiqui F, Movsas B. Management of Radiation Toxicity in Head and Neck Cancers. *Semin Radiat Oncol.* 2017;27(4):340-9.
7. Uccelli A, Moretta L, Pistoia V. Mesenchymal stem cells in health and disease. *Nat Rev Immunol.* 2008;8(9):726-736.

8. Primorac D, Molnar V, Maticic V, et al. Comprehensive review of knee osteoarthritis pharmacological treatment and the latest professional societies' guidelines. *Pharmaceuticals (Basel)*. 2021;14(3):205.
9. Grønhøj C, Jensen DH, Vester-Glowinski P, et al. Safety and efficacy of mesenchymal stem cells for radiation-induced xerostomia: a randomized, placebo-controlled phase 1/2 Trial (MESRIX). *Int J Radiat Oncol Biol Phys*. 2018;101(3):581-592.
10. Lynggaard CD, Gronhoj C, Christensen R, et al. Intraglandular off-the-shelf allogeneic mesenchymal stem cell treatment in patients with radiation-induced xerostomia: A safety study (MESRIX-II). *Stem Cells Transl Med*. 2022;11(5):478-489.

VASKULARIZACIJA IN VASKULARNI UČINKI KOT PROGNOSTIČNI DEJAVNIKI ZA ZDRAVLJENJE TUMORJEV Z LOKALNIMI ABLACIJSKIMI TEHNIKAMI

Tadej Tomanic¹, Črt Keber¹, Jošt Stergar^{1,2}, Boštjan Markelc^{3,4}, Tim Božič^{3,5}, Simona Kranjc Brezar^{3,5}, Gregor Serša^{3,4}, Matija Milanič^{1,2}

¹ *Fakulteta za matematiko in fiziko, Univerza v Ljubljani, Jadranska 19, 1000 Ljubljana, Slovenija*

² *Institut "Jožef Stefan", Jamova 39, 1000 Ljubljana, Slovenija*

³ *Oddelek za eksperimentalno onkologijo, Onkološki inštitut Ljubljana, 1000 Ljubljana, Slovenija*

⁴ *Zdravstvena fakulteta, Univerza v Ljubljani, 1000 Ljubljana, Slovenija*

⁵ *Medicinska fakulteta, Univerza v Ljubljani, 1000 Ljubljana, Slovenija*

Elektronski naslov: Tadej.Tomanic@fmf.uni-lj.si

Spremljanje krvnih žil med rastjo tumorjev, napredovanjem bolezni in po zdravljenju bi lahko zagotovilo dragocene diagnostične informacije ter izboljšalo znanje o tumorjih in njihovem mikrookolju. Tumorji za uspešno rast potrebujejo hranila in kisik, te potrebe pa zadovoljujejo s spodbujanjem angiogeneze - nastajanjem novih krvnih žil. Tako nastale krvne žile v tumorjih so na splošno neorganizirane, nepravilno oblikovane in puščajoče, kar lahko povzroči pomanjkanje kisika. Nenormalno ožilje posredno vpliva na terapevtski uspeh različnih načinov zdravljenja raka, kot sta radioterapija in elektrokemoterapija. Cilj tega projekta je neinvazivno spremljanje različnih modelov mišjih tumorjev med rastjo in po zdravljenju z uporabo optičnih slikovnih in spektroskopskih tehnik, vključno s hiperspektralnim slikanjem (HSI), optično profilometrijo (OP), laserskim slikanjem s pegami (LSCI) in optično koherentno tomografijo z varianco peg (SV-OCT).

HSI je obetavna optična tehnika, ki združuje slikanje in spektroskopijo v vidnem in bližnjem infrardečem (NIR) spektralnem pasu za zajemanje hiperspektralnih slik (kock), ki vsebujejo spektralne informacije v vseh slikovnih elementih (pikslih). HSI lahko zagotovi prostorske informacije o fiziologiji tumorskega tkiva (npr. oksigenaciji tkiva), patologiji (npr. spremenjeni presnovni aktivnosti) in morfologiji (npr. velikosti sipalcev v tkivu).

S pomočjo OP lahko zajamemo obliko površine tkiva in zaznamo spremembe morfologije tumorja ter izračunamo njegovo prostornino. Prav tako lahko z OP popravimo izgubo signala pri HSI zaradi močno nagnjenih površin tumorskega tkiva.

Po drugi strani je LSCI neinvazivna brezkontaktna optična slikovna tehnika, ki se široko uporablja v biomedicinskih aplikacijah za vizualizacijo pretoka krvi v realnem času. Temelji na analizi vzorca peg (ang. speckle), ki nastane zaradi naključne interference koherentne laserske svetlobe, ki jo razpršijo delci v biološkem tkivu, kot so rdeče krvničke (RBC). Gibanje delcev povzroči časovno spreminjanje jakosti odbite svetlobe, kar pri snemanju s kamero povzroči zameglitev vzorca peg, le-ta pa je neposredno povezana s pretokom krvi.

Podobno je SV-OCT slikovna metoda za funkcionalno optično slikanje, ki uporablja

nizkokoherenčno interferometrijo za pridobivanje volumetričnih slik pretoka krvi z visoko prostorsko in globinsko ločljivostjo. Tako kot pri LSCI se SV-OCT zanaša na večjo variabilnost vzorca peg na območju krvnih žil v primerjavi z okoliškim statičnim tkivom. Pegasti vzorec pri OCT nastane zaradi nihanja jakosti svetlobe od voksla do voksla, ki je posledica faznih razlik v polju povratnega sipanja zaradi prostorske porazdelitve sipajočih delcev v vzorcu.

S kombiniranjem različnih optičnih slikovnih tehnik lahko pridobimo pomembne informacije o tumorjih in njihovem mikrookolju, zlasti o krvnih žilah. Med drugim lahko kvantificiramo morfološke in fiziološke spremembe v tumorjih ter potencialno zagotovimo napovedne informacije za zdravljenje tumorjev in omogočimo spremljanje zdravljenja. Optične slikovne tehnike lahko omogočijo razvoj hitrih in cenovno ugodnih diagnostičnih naprav brez uporabe ionizirajočega sevanja za diagnosticiranje bolezni in ocenjevanje uspešnosti zdravljenja človeških tumorjev kože in podkožja.

RADIOOZNAČENI LIGANDI CCK2R KOT POTENCIALNI RADIOFARMAKI V TERANOSTIKI BOLNIKOV Z MEDULARNIM RAKOM ŠČITNICE – PRIMER TRANSLACIJSKE ŠTUDIJE (KLINIČNA ŠTUDIJA)

Katja Zaletel^{1,2}, Luka Ležaić^{1,2}, Petra Kolenc¹, Irene Virgolini³, Marion de Jong⁴, Paola Anna Erba⁵, Alicja Hubalewska-Dydejczyk⁶

¹ *Klinika za nuklearno medicino, Univerzitetni klinični center Ljubljana, Zaloška 2, 1000 Ljubljana, Slovenija*

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

³ *Department of Nuclear Medicine, Medical University Innsbruck, Innsbruck, Avstrija*

⁴ *Erasmus MC, Rotterdam, Nizozemska*

⁵ *Regional Center of Nuclear Medicine, Department of Translational Research and New Technology in Medicine, University of Pisa, Pisa, Italija*

⁶ *Department of Endocrinology, Jagiellonian University Medical College, Krakow, Poljska*

Elektronski naslov: katja.zaletel@kclj.si

Obravnava medularnega raka ščitnice predstavlja izziv, saj trenutno razpoložljive metode diagnosticiranja ne zagotavljajo zgodnje lokalizacije bolezni, možnosti zdravljenja pa so predvsem pri napredovali bolezni omejene. Obetavna možnost, ki jo nudi sodobna nuklearna medicina, so z radionuklidi označene molekule (radiofarmaki), ki se z visoko afiniteto vežejo na holecistokinski-2/gastrinski receptor (CCK2R). Glede na vrsto vezanega radionuklida radiofarmak lahko uporabimo za namen nuklearno-medicinskega diagnosticiranja ali ciljanega radionuklidnega zdravljenja, kar imenujemo teranostični pristop.

Klinični del naše translacijske raziskave GRAN-T-MTC (faza 1 kliničnega preskušanja) je bil namenjen predvsem oceni varnosti intravenskega dajanja analoga gastrina CP04 v količini, ki bi v prihodnje lahko omogočila ciljano radionuklidno zdravljenje bolnikov z napredovalim medularnim rakom ščitnice. V nadaljevanju smo želeli preveriti tudi biodistribucijo in dozimetrične lastnosti z indijem-111 označenega CP04 (¹¹¹In]In-CP04).

V raziskavo smo vključili bolnike z dokazanim napredovalim medularnim rakom ščitnice ali kratkim časom podvojitve kalcitonina. V fazi 1A raziskave smo prvim 4 bolnikom dali 185 MBq [¹¹¹In]In-CP04 in sicer pri 2 masnih odmerkih (10 in 50 µg) CP04: najprej varnejši nizek odmerek 10 µg, nato pa odmerek 50 µg, ki bi bil primernejši za teranostični pristop. Po potrditvi varnosti višjega odmerka so v nadaljevanju, v fazi 1B, vsi bolniki prejeli 50 µg [¹¹¹In]In-CP04. Te bolnike smo randomizirali v 2 skupini: eno s sočasno uporabo gelofuzina za zaščito ledvic in drugo brez. Protokol je vključeval klinično, biokemično, dozimetrično in slikovno (scintigrafsko) oceno bolnika z opredelitvijo biodistribucije v tumorskih celicah in zdravih tkivih oziroma kritičnih organih (1).

Vključili smo skupno 16 bolnikov. Potrdili smo varnost molekule CP04, saj resnih

stranskih učinkov nismo ugotavljali, blaga stranska učinka pri 2 bolnikih pa sta vključevala prehodno tahikardijo in rdečico. Dozimetrična ocena je pokazala, da med kritičnimi organi največjo dozo prejme sečni mehur, sledijo ledvice in želodec. Dajanje gelofuzina je zmanjšalo prejeto dozo ledvic za 53 %. Scintigrafsko smo potrdili nakopičenje radiofarmaka v tumorskem tkivu pri 13/16 (81 %) bolnikov, kar kaže na boljšo diagnostično učinkovitost v primerjavi s konvencionalnim slikanjem (2).

Z našo translacijsko raziskavo smo torej potrdili, da je radiofarmak [^{111}In]In-CP04 varen, občutljiv in visoko specifičen biomarker za slikovno diagnosticiranje medularnega raka ščitnice, ki ima obetavne teranostične karakteristike in bi v prihodnosti lahko nudil nove možnosti pri klinični obravnavi bolnikov.

Literatura

1. Erba PA, Maecke H, Mikolajczak R, et al. A novel CCK2/gastrin receptor-localizing radiolabeled peptide probe for personalized diagnosis and therapy of patients with progressive or metastatic medullary thyroid carcinoma: a multicenter phase I GRAN-T-MTC study. *Pol Arch Intern Med.* 2018;128:791-795.
2. Lezaic L, Erba PA, Decristoforo C, et al. [^{111}In]In-CP04 as a novel cholecystokinin-2 receptor ligand with theranostic potential in patients with progressive or metastatic medullary thyroid cancer: final results of a GRAN-T-MTC Phase I clinical trial. *Eur J Nucl Med Mol Imaging.* 2023;50:892-907.

INDEKS AVTORJEV

INDEKS AVTORJEV

B

Boltežar Lučka 14
Bošnjak Maša 76
Božič Tim 60, 72, 83, 88
Breznik Barbara 74
Brišar Nuša 62
But Hadžić Jasna 54, 63

C

Cör Andrej 62, 78

Č

Čarman Janka 20
Čemažar Maja 46, 60, 68, 72, 76, 78, 80
Čulk Alenka 63

D

Declerck Paul 72
Decristoforo Clemens 70
de Jong Marion 90
Dolžan Vita 32, 43

E

Edlinger Leo 64
Erba Paola Anna 90

F

Fiorino Claudio 65

G

Galunič Nena 38
Gašljević Gorana 14
Gordeeva Olga 46
Goričar Katja 32
Grabec Daša 20
Grčar Kuzmanov Biljana 14

H

Habič Anamarija 74
Hadžić Alen 46
Hollevoet Kevin 72
Hubalewska-Dydejczyk Alicja 70, 90

J

Jacobs Liesl 72
Jeraj Robert 46, 67
Jesenko Tanja 68, 72, 76, 78
Jezeršek Novaković Barbara 14

K

Kamenšek Urška 80
Keber Črt 88
Kešar Urša 68
Kolenc Petra 70, 90
Komel Tilen 80
Kragelj Borut 20
Kranjc Brezar Simona 60, 62, 72, 78, 88
Kulcenty Katarzyna 79

L

Lah Turnšek Tamara 74
Ležaić Luka 27, 90

M

Maina Theodosia 70
Maja Čemažar 68
Majc Bernarda 74
Majdič Aleš 20
Malavolta Marta 74
Marinko Tanja 32
Markelc Boštjan 60, 68, 72, 75, 78, 83, 88
Medved Ajda 76
Mikolajczak Renata 70
Milanič Matija 88
Mlakar Jernej 74
Modić Živa 78

N

Novak Metka 74

INDEKS AVTORJEV

O

Oblak Irena 38

P

Piwócka Oliwia 79

Porčnik Andrej 74

R

Rankovec Anja 63

Ratoša Ivica 63

Redenšek Trampuž Sara 32

Rožman Samo 14

S

Sadikov Aleksander 74

Savarin Monika 80

Sedlar Janja 63

Serša Gregor 46, 68, 72, 76, 78, 80, 83, 88

Stergar Jošt 88

Strojan Primož 68, 85

Studen Andrej 81

Suchorska Wiktoria 79

Š

Šantek Iva 83

Štrbac Danijela 43

Šuster Katja 62

Švajger Urban 85

T

Tomanič Tadej 88

Trebušak Podkrajšek Katarina 32

Trstenjak Ana 32

U

Unk Mojca 46

Uršič Valentinuzzi Katja 46, 68

V

Valentinuzzi Damijan 46

Virgolini Irene 90

Vrankar Martina 46

Z

Zaletel Katja 70, 90

Ž

Žager Marciuš Valerija 38

Žnidarič Tanja 54

Žnidar Katarina 80

SPONZORJI

SPONZORJI



KLJUČ ZA VEČ PRILOŽNOSTI PRI ZDRAVLJENJU VAŠIH BOLNIKOV



KEYTRUDA®

(pembrolizumab, MSD)

KEYTRUDA je odobrena za zdravljenje 21 indikacij rakavih obolenj¹

Referenca: 1. Keytruda EU SmPC

Ime zdravila: KEYTRUDA 25 mg/ml koncentrat za raztopino za infundiranje vsebuje pembrolizumab. **Terapevtske indikacije:** Zdravilo KEYTRUDA je kot samostojno zdravljenje indicirano za zdravljenje odraslih mladostnikov, starih 12 let ali več, z napredovalno (neoperabilnim ali metastatskim) melanomom; za adjuvantno zdravljenje odraslih in mladostnikov, starih 12 let ali več, z melanomom v stadiju IIB, IIC ali III, in sicer po popolni kirurški odstranitvi; metastatskega nedrobnoceličnega pljučnega raka (NSCLC) v prvi liniji zdravljenja pri odraslih, ki imajo tumorje z $\geq 50\%$ izraženošjo PD-L1 (TPS) in brez pozitivnih tumorskih mutacij EGFR ali ALK; lokalno napredovalega ali metastatskega NSCLC pri odraslih, ki imajo tumorje z $\geq 1\%$ izraženošjo PD-L1 (TPS) in so bili predhodno zdravljeni z vsaj eno shemo kemoterapije, bolniki s pozitivnimi tumorskimi mutacijami EGFR ali ALK so pred prejemom zdravila KEYTRUDA morali prejeti tudi tarčno zdravljenje; odraslih in pediatričnih bolnikov, starih 3 leta ali več, s ponovljenim ali neodzivnim klasičnim Hodgkinovim limfomom (cHL), pri katerih avtologna presaditev matičnih celic (ASCT) ni bila uspešna, ali po najmanj dveh predhodnih zdravljenjih kadar ASCT ne pride v poštev kot možnost zdravljenja; lokalno napredovalega ali metastatskega urološkega raka pri odraslih, predhodno zdravljenih s kemoterapijo, ki je vključevala platino; lokalno napredovalega ali metastatskega urološkega raka pri odraslih, ki niso primerni za zdravljenje s kemoterapijo, ki vsebuje cisplatin in imajo tumorje z izraženošjo PD-L1 ≥ 10 , ocenjeno s kombinirano pozitivno oceno (CPS); ponovljenega ali metastatskega ploščatoceličnega raka glave in vratu (HNSCC) pri odraslih, ki imajo tumorje z $\geq 50\%$ izraženošjo PD-L1 (TPS), in pri katerih je bolezen napredovala med zdravljenjem ali po zdravljenju s kemoterapijo, ki je vključevala platino; za adjuvantno zdravljenje odraslih z rakom ledvičnih celic s povišanim tveganjem za ponovitev bolezni po nefrektomiji, ali po nefrektomiji in kirurški odstranitvi metastatskih lezij, za zdravljenje odraslih z MSI-H (microsatellite instability-high) ali dMMR (mismatch repair deficient) kolorektalnim rakom v naslednjih terapevtskih okoliščinah: prva linija zdravljenja metastatskega kolorektalnega raka; zdravljenje neoperabilnega ali metastatskega kolorektalnega raka po predhodnem kombiniranem zdravljenju, ki je temeljilo na fluoropirimidinu; in za zdravljenje MSI-H ali dMMR tumorjev pri odraslih z napredovalim ali ponovljenim rakom endometrija, pri katerih je bolezen napredovala med ali po predhodnem zdravljenju, ki je vključevalo platino, v katerih koli terapevtskih okoliščinah, in ki niso kandidati za kurativno operacijo ali obsevanje; neoperabilnim ali metastatskim rakom želodca, tankega črevesa ali žolčnika in žolčnih vodov, pri katerih je bolezen napredovala med ali po vsaj enem predhodnem zdravljenju. Zdravilo KEYTRUDA je kot samostojno zdravljenje ali v kombinaciji s kemoterapijo s platino in 5-fluorouracilom (5-FU) indicirano za prvo linijo zdravljenja metastatskega ali neoperabilnega ponovljenega ploščatoceličnega raka glave in vratu pri odraslih, ki imajo tumorje z izraženošjo PD-L1 s CPS ≥ 1 . Zdravilo KEYTRUDA je v kombinaciji s pemetreksedom in kemoterapijo na osnovi platine indicirano za prvo linijo zdravljenja metastatskega neploščatoceličnega NSCLC pri odraslih, pri katerih tumorji nimajo pozitivnih mutacij EGFR ali ALK; v kombinaciji s karboplatinom in bodisi paklitakselom bodisi nab-paklitakselom je indicirano za prvo linijo zdravljenja metastatskega ploščatoceličnega NSCLC pri odraslih; v kombinaciji z akitinibom ali v kombinaciji z lenvatinibom je indicirano za prvo linijo zdravljenja napredovalega raka ledvičnih celic (RCC) pri odraslih; v kombinaciji s kemoterapijo s platino in fluoropirimidinom je indicirano za prvo linijo zdravljenja lokalno napredovalega neoperabilnega ali metastatskega raka požiralnika ali HER-2 negativnega adenokarcinoma gastroezofagealnega prehoda pri odraslih, ki imajo tumorje z izraženošjo PD-L1 s CPS ≥ 10 ; v kombinaciji s kemoterapijo za neoadjuvantno zdravljenje, in v nadaljevanju kot samostojno adjuvantno zdravljenje po kirurškem posegu, je indicirano za zdravljenje odraslih z lokalno napredovalno trojno negativnim rakom dojke ali trojno negativnim rakom dojke v zgodnjem stadiju z visokim tveganjem za ponovitev bolezni; v kombinaciji s kemoterapijo je indicirano za zdravljenje lokalno ponovljenega neoperabilnega ali metastatskega trojno negativnega raka dojke pri odraslih, ki imajo tumorje z izraženošjo PD-L1 s CPS ≥ 10 in predhodno niso prešli kemoterapije za metastatsko bolezen; v kombinaciji z lenvatinibom je indicirano za zdravljenje napredovalega ali ponovljenega raka endometrija (EC) pri odraslih z napredovalo boleznijo med ali po predhodnem zdravljenju s kemoterapijo, ki je vključevala platino, v katerih koli terapevtskih okoliščinah, in ki niso kandidati za kurativno operacijo ali obsevanje; v kombinaciji s kemoterapijo z bevacizumabom ali brez njega, je indicirano za zdravljenje persistentnega, ponovljenega ali metastatskega raka materničnega vratu pri odraslih bolnikih, ki imajo tumorje z izraženošjo PD-L1 s CPS ≥ 1 . **Odmerjanje in način uporabe:** **Testiranje PD-L1:** Če je navedeno v indikaciji, je treba izbrati bolnika za zdravljenje z zdravilom KEYTRUDA na podlagi izraženošji PD-L1 tumorja potrjeni z validirano preiskavo. **Testiranje MSI/MMR:** Če je navedeno v indikaciji, je treba izbrati bolnika za zdravljenje z zdravilom KEYTRUDA na podlagi MSI-H/dMMR statusa tumorja potrjeni z validirano preiskavo. **Odmerjanje:** Priporočeni odmerki zdravila KEYTRUDA pri odraslih je bodisi 200 mg na 3 tedne ali 400 mg na 6 tednov, apliciran z intravensko infuzijo v 30 minutah. Priporočeni odmerki zdravila KEYTRUDA za samostojno zdravljenje pri pediatričnih bolnikih s cHL, starih 3 leta ali več, ali bolnikih z melanomom, starih 12 let ali več, je 2 mg/kg telesne mase (do največ 200 mg) na 3 tedne, apliciran z intravensko infuzijo v 30 minutah. Za uporabo v kombinaciji glejte povzetke glavnih značilnosti zdravil sočasno uporabljenih zdravil. Če se uporablja kot del kombiniranega zdravljenja skupaj z intravensko kemoterapijo, je treba zdravilo KEYTRUDA aplicirati prvo. Bolnike je treba zdraviti do napredovanja bolezni ali nesprejemljivih toksičnih učinkov (in do maksimalnega trajanja zdravljenja, če je le to določeno za indikacijo). Pri adjuvantnem zdravljenju melanoma ali RCC je treba zdravilo uporabljati do ponovitve bolezni, pojava nesprejemljivih toksičnih učinkov oziroma mora zdravljenje trajati do enega leta. Za neoadjuvantno in adjuvantno zdravljenje TNBC morajo bolniki neoadjuvantno prejeti zdravilo KEYTRUDA v kombinaciji s kemoterapijo, in sicer 9 odmerkov po 200 mg na 3 tedne ali 4 odmerke po 400 mg na 6 tednov, ali do napredovanja bolezni, ki izključuje definitivni kirurški poseg, ali do pojava nesprejemljivih toksičnih učinkov, čemur sledi adjuvantno zdravljenje z zdravilom KEYTRUDA kot samostojnim zdravljenjem, in sicer 9 odmerkov po 200 mg na 3 tedne ali 5 odmerkov po 400 mg na 6 tednov ali do ponovitve bolezni ali pojava nesprejemljivih toksičnih učinkov. Bolniki, pri katerih pride do napredovanja bolezni, ki izključuje definitivni kirurški poseg, ali do nesprejemljivih toksičnih učinkov povezanih z zdravilom KEYTRUDA kot neoadjuvantnim zdravljenjem v kombinaciji s kemoterapijo, ne smejo prejeti zdravila KEYTRUDA kot samostojnega zdravljenja za adjuvantno zdravljenje. Če je akitinib uporabljen v kombinaciji s pembrolizumabom, se lahko razmisli o povečanju odmerka akitiniba nad začetnih 5 mg v presledkih šest tednov ali več. V primeru uporabe v kombinaciji z lenvatinibom je treba zdravljenje z enim ali obema zdraviloma prekiniti, kot je primerno. Uporabo

lenvatiniba je treba zadržati, odmerke zmanjšati ali prenehati z uporabo, v skladu z navodili v povzetku glavnih značilnosti zdravila z lenvatinibom, in sicer za kombinacijo s pembrolizumabom. Pri bolnikih starih ≥ 65 let, bolnikih z blago do zmerno okvaro ledvic, bolnikih z blago ali zmerno okvaro jeter prilagoditev odmerka ni potrebna. Odločitev odmerka ali ukinitve zdravljenja: Zmanjšanje odmerka zdravila KEYTRUDA ni priporočljivo. Za obvladovanje neželenih učinkov je treba uporabo zdravila KEYTRUDA zadržati ali ukiniti, prosimo, glejte celoten Povzetek glavnih značilnosti zdravila. **Kontraindikacije:** Preobčutljivost na učinkovino ali katero koli pomožno snov. **Povzetek posebnih opozoril, previdnostnih ukrepov, interakcij in neželenih učinkov:** Imunsko pogojeni neželeni učinki (pneumonitis, kolitis, hepatitis, nefritis, endokrinopatije, neželeni učinki na kožo in drugi): Pri bolnikih, ki so prejeli pembrolizumab, so se pojavili imunsko pogojeni neželeni učinki, vključno s hudimi in smrtnimi primeri. Večina imunsko pogojenih neželenih učinkov, ki so se pojavili med zdravljenjem s pembrolizumabom, je bila reverzibilnih in so jih obvladali s prekinitvami uporabe pembrolizumaba, uporabo kortikosteroidov in/ali podporno oskrbo. Pojavilo se lahko tudi po zadnjem odmerku pembrolizumaba in hkrati prizadenejo več organskih sistemov. V primeru suma na imunsko pogojene neželene učinke je treba poskrbeti za ustrezno oceno za potrditev etiologije oziroma izključitev drugih vzrokov. Glede na izrazitost neželene učinke je treba zadržati uporabo pembrolizumaba in uporabiti kortikosteroide – za natančna navodila, prosimo, glejte Povzetek glavnih značilnosti zdravila Keytruda. Zdravljenje s pembrolizumabom lahko poveča tveganje za zavrnitev pri prejemnikih presadkov čvrstih organov. Pri bolnikih, ki so prejeli pembrolizumab, so poročali o hudih z infuzijo povezanih reakcijah, vključno s preobčutljivostjo in anafilaksijo. Pembrolizumab se iz obtoka odstrani s katabolizmom, zato presnovnih medsebojnih delovanj zdravil ni pričakovati. Uporabi sistemskih kortikosteroidov ali imunosupresivov pred uvedbo pembrolizumaba se je treba izogibati, ker lahko vplivajo na farmakodinamično aktivnost in učinkovitost pembrolizumaba. Vendar pa je kortikosteroid ali druge imunosupresive mogoče uporabiti za zdravljenje imunsko pogojenih neželenih učinkov. Kortikosteroide je mogoče uporabiti tudi kot premedikacijo, če je pembrolizumab uporabljen v kombinaciji s kemoterapijo, kot antiemetično profilakso in/ali za ublažitev neželenih učinkov, povezanih s kemoterapijo. Zenske v rodni dobi morajo med zdravljenjem s pembrolizumabom in vsaj še 4 mesece po zadnjem odmerku pembrolizumaba uporabljati učinkovito kontracepcijo, med nosečnostjo in dojenjem se ga ne sme uporabljati. Varnost pembrolizumaba pri samostojnem zdravljenju so v kliničnih študijah ocenili pri 7.631 bolnikih, ki so imeli različne vrste raka, s štiri odmerki (2 mg/kg telesne mase na 3 tedne, 200 mg na 3 tedne in 10 mg/kg telesne mase na 2 ali 3 tedne). V tej populaciji bolnikov je mediana čas opazovanja znašal 8,5 meseca (v razponu od 1 dneva do 39 mesecev), najpogostejši neželeni učinki zdravljenja s pembrolizumabom pa so bili utrujenost (31 %), diareja (22 %) in navzea (20 %). Večina poročanih neželenih učinkov pri samostojnem zdravljenju je bila po izrazitosti 1. ali 2. stopnje. Najresnejši neželeni učinki so bili imunsko pogojeni neželeni učinki in hude z infuzijo povezane reakcije. Pojavnost imunsko pogojenih neželenih učinkov pri uporabi pembrolizumaba samega za adjuvantno zdravljenje (n = 1.480) je znašala 36,1 % za vse stopnje in 8,9 % od 3. do 5. stopnje, pri metastatski bolezni (n = 5.375) pa 24,2 % za vse stopnje in 6,4 % od 3. do 5. stopnje. Pri adjuvantnem zdravljenju niso zaznali nobenih novih imunsko pogojenih neželenih učinkov. Varnost pembrolizumaba pri kombiniranem zdravljenju s kemoterapijo so ocenili pri 3.123 bolnikih z različnimi vrstami raka, ki so v kliničnih študijah prejeli pembrolizumab v odmerkih 200 mg, 2 mg/kg telesne mase ali 10 mg/kg telesne mase na vsake 3 tedne. V tej populaciji bolnikov so bili najpogostejši neželeni učinki naslednji: anemija (55 %), navzea (54 %), utrujenost (50 %), nevtropenija (36 %), zaprtost (35 %), alopecija (35 %), diareja (34 %), bruhanje (28 %) in zmanjšanje apetita (27 %). Pojavnost neželenih učinkov 3. do 5. stopnje je pri bolnikih z NSCLC pri kombiniranem zdravljenju s pembrolizumabom znašala 67 % in pri zdravljenju samo s kemoterapijo 66 %, pri bolnikih s HNSCC pri kombiniranem zdravljenju s pembrolizumabom 85 % in pri zdravljenju s kemoterapijo v kombinaciji s cetuximabom 84 %, pri bolnikih z rakom požiralnika pri kombiniranem zdravljenju s pembrolizumabom 86 % in pri zdravljenju samo s kemoterapijo 83 %, pri bolnikih s TNBC pri kombiniranem zdravljenju s pembrolizumabom 80 % in pri zdravljenju samo s kemoterapijo 77 % in pri bolnikih z rakom materničnega vratu pri kombiniranem zdravljenju s pembrolizumabom 82 % in pri zdravljenju samo s kemoterapijo 75 %. Varnost pembrolizumaba v kombinaciji z akitinibom ali lenvatinibom pri napredovalnem RCC in v kombinaciji z lenvatinibom pri napredovalnem EC so ocenili pri skupno 1.456 bolnikih z napredovalnim RCC ali napredovalnim EC, ki so v kliničnih študijah prejeli 200 mg pembrolizumaba na 3 tedne skupaj s 5 mg akitinibom dvakrat na dan ali z 20 mg lenvatinibom enkrat na dan, kot je bilo ustrezno. V teh populacijah bolnikov so bili najpogostejši neželeni učinki diareja (58 %), hipertenzija (54 %), hipotroidizem (46 %), utrujenost (41 %), zmanjšan apetit (40 %), navzea (40 %), artralgija (30 %), bruhanje (28 %), zmanjšanje telesne mase (28 %), disfonija (28 %), bolečine v trebuhu (28 %), proteinurija (27 %), sindrom palmarno-planarne eritrodizestezije (26 %), izpuščaj (26 %), stomatitis (25 %), zaprtost (25 %), mišično-skeletna bolečina (23 %), glavobol (23 %) in kašelj (21 %). Neželenih učinkov od 3. do 5. stopnje je bilo pri bolnikih z RCC med uporabo pembrolizumaba v kombinaciji z akitinibom ali lenvatinibom 80 % in med uporabo sunitiniba samega 71 %. Pri bolnikih z EC je bilo neželenih učinkov od 3. do 5. stopnje med uporabo pembrolizumaba v kombinaciji z lenvatinibom 89 % in med uporabo kemoterapije same 73 %. Za celoten seznam neželenih učinkov, prosimo, glejte celoten Povzetek glavnih značilnosti zdravila. Za dodatne informacije o varnosti v primeru uporabe pembrolizumaba v kombinaciji glejte povzetke glavnih značilnosti zdravila za posamezne komponente kombiniranega zdravljenja. **Način in režim izdaje zdravila:** H – Predpisovanje in izdaja zdravila je le na recept, zdravilo se uporablja samo v bolnišnicah. **Imetnik dovoljenja za promet z zdravilom:** Merck Sharp & Dohme B.V., Waarderweg 39, 2031 BN Haarlem, Nizozems



Merck Sharp & Dohme Inovativna zdravila d.o.o.,
Ameriška ulica 2, 1000 Ljubljana,
tel: +386 1 520 42 01, fax: +386 1 520 43 50;
Pripravljen v Sloveniji, 11/2022; SL-KEY-00492 EXP: 11/2024

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

SPONZORJI



25
LET

*kliničnih
raziskav
v Sloveniji*

V 25 letih smo sponzorirali ali podprli 57 intervencijskih kliničnih raziskav, ki so gonilo razvoja in napredka v medicini, in s tem je več kot 780 bolnikov dobilo možnost inovativnega zdravljenja.

M-SI-00000814 (V2.0)
Informacija pripravljena v marcu 2023.



MSD



Labena



NOVARTIS | Reimagining Medicine



MERCK

ZAPISKI

