



ONKOLOŠKI INŠTITUT
INSTITUTE OF ONCOLOGY
LJUBLJANA



Slovensko
Zdravniško
Društvo
1861



Organisation of European
Cancer Institute – EEIC

2. SLOVENSKI ZNANSTVENI SIMPOZIJ O RAZISKAVAH RAKA

Tekočinska biopsija v onkologiji

ZBORNİK PRISPEVKOV IN POVZETKOV

10. oktober 2025

Onkološki inštitut Ljubljana

Znanstveni odbor: Maja Čemažar, Onkološki inštitut Ljubljana & Univerza na Primorskem
Tanja Jesenko, Onkološki inštitut Ljubljana
Mateja Krajc, Onkološki inštitut Ljubljana
Simona Kranjc Brezar, Onkološki inštitut Ljubljana
Tanja Marinko, Onkološki inštitut Ljubljana
Erika Matos, Onkološki inštitut Ljubljana
Barbara Perić, Onkološki inštitut Ljubljana
Vesna Zadnik, Onkološki inštitut Ljubljana

Organizacijski odbor: Maja Čemažar, Onkološki inštitut Ljubljana & Univerza na Primorskem
Simona Kranjc Brezar, Onkološki inštitut Ljubljana
Sabina Lovšin, Onkološki inštitut Ljubljana

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

2. SLOVENSKI ZNANSTVENI SIMPOZIJ O RAZISKAVAH RAKA

Tekočinska biopsija v onkologiji

ZBORNİK PRISPEVKOV IN POVZETKOV

Urednice: Simona Kranjc Brezar, Maja Čemažar, Tanja Marinko
Recenzenti: Maja Čemažar, Tanja Jesenko, Mateja Krajc, Simona Kranjc Brezar,
Tanja Marinko, Erika Matos, Barbara Perić
Tehnična urednica: Simona Kranjc Brezar
Oblikovanje: Simona Kranjc Brezar
Izdano pri: Onkološki inštitut Ljubljana
Združenje za radioterapijo in onkologijo pri Slovenskem zdravniškem društvu
Tiskano pri: Fota-Cop d.o.o.
Izdaja: 1. izdaja, 100 izvodov

ISBN 978-961-7248-09-8



CIP - Kataložni zapis o publikaciji
Narodna in univerzitetna knjižnica, Ljubljana
616-006.6:577.21:616-076(082)

SLOVENSKI ZNANSTVENI SIMPOZIJ O RAZISKAVAH RAKA
(2 ; 2025 ; Ljubljana)

2. slovenski znanstveni simpozij o raziskavah raka : Tekočinska biopsija v onkologiji : zbornik prispevkov in povzetkov : 10. oktober 2025, Onkološki inštitut Ljubljana / organizatorji Onkološki inštitut Ljubljana, Združenje za radioterapijo in onkologijo pri Slovenskem zdravniškem društvu & Organisation of European Cancer Institutes (OECI); [urednice Simona Kranjc Brezar, Maja Čemažar, Tanja Marinko]. - 1. izd. - Ljubljana : Onkološki inštitut : Združenje za radioterapijo in onkologijo pri Slovenskem zdravniškem društvu, 2025

ISBN 978-961-7248-09-8 (Onkološki inštitut)
COBISS.SI-ID 251216131

2. SLOVENSKI ZNANSTVENI SIMPOZIJ O RAZISKAVAH RAKA

Tekočinska biopsija v onkologiji

10. oktober 2025

Onkološki inštitut Ljubljana

ZBORNIK PRISPEVKOV IN POVZETKOV

Organizatorji: Onkološki inštitut Ljubljana & Združenje za radioterapijo in onkologijo pri Slovenskem zdravniškem društvu & Organisation of European Cancer Institutes (OEIC)

SPONZORJI

Eli Lilly, farmacevtska družba, d.o.o.

MERCK SHARP & DOHME, inovativna zdravila d.o.o.

Roche farmacevtska družba d.o.o.

Merck, d.o.o.

AstraZeneca UK Limited, Podružnica v Sloveniji

Interexport, d.o.o.

Swixx Biopharma d.o.o.

Ewopharma d.o.o.

Mediline d.o.o.

KAZALO VSEBINE

PROGRAM	5
SEZNAM PRISPEVKOV	9
SEZNAM POVZETKOV	11
PRISPEVKI	17
POVZETKI	61
INDEKS AVTORJEV	113
SPONZORJI	117

PROGRAM

PROGRAM

Petek, 10. oktober 2025

8:00 - 8:25 **Prijava udeležencev**

8:25 - 8:30 **Pozdravni nagovor**
Maja Čemažar, Onkološki inštitut Ljubljana

1. del

Moderator: Cvetka Grašič Kuhar, Tanja Jesenko

8:30 - 9:00 **Circulating tumor DNA as predictive and prognostic markers in breast cancer**
John Martens, Erasmus MC, Nizozemska Vabljeno predavanje

9:00 - 9:15 **Current applications of liquid biopsy in personalized medicine**
Christian Rolfo, The Ohio State University Wexner Medical Center, ZDA

9:15 - 9:45 **Klinični pomen cirkulirajočih tumorskih celic pri raku dojk**
Cvetka Grašič Kuhar, Onkološki inštitut Ljubljana Vabljeno predavanje

9:45 - 10:15 **Odmor, ogled posterjev**

2. del

Moderator: Barbara Perić, Tanja Marinko

10:15 - 10:30 **Vpliv sistemske terapije na cirkulirajoče tumorske celice in skupke cirkulirajočih tumorskih celic**
Klara Grad, Onkološki inštitut Ljubljana

10:30 - 10:45 **Circulating signals as predictive tools in cutaneous squamous cell carcinoma: ready for the clinic?**
Andreja Pagon, Medicinska fakulteta, Univerza v Ljubljani

10:45 - 11:00 **Repozicioniranje zdravil za zdravljenje HER2-pozitivnega raka dojk kot integrativna strategija za inovacije in pospeševanje dostopnosti zdravil**
Luka Irenej Pečan in Marko Jeran, University of Trieste, Department of Life Sciences; Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta

PROGRAM

- 11:00 - 11:15** **DD Cell-Tox cell viability method: Finding a Direct and Dynamic method for a dynamic process**
Eneko Madorran, Univerza v Mariboru, Medicinska Fakulteta
- 11:15 - 11:30** **Bakteriofagi kot nosilci tumorskih antigenov: nova strategija v imunoterapiji raka**
Andrej Cör, Ortopedska bolnišnica Valdoltra, Univerza na Primorskem
- 11:30 - 11:45** **Vpliv membranske filtracije in tekočinske citologije v diagnostiki citopatologije urina**
Damjana Cimerman, Univerza v Ljubljani, Medicinska fakulteta
- 11:45 - 12:30** **Kosilo**

3. del

Moderator: Erika Matos, Simona Kranjc Brezar

- 12:30 - 12:55** **Molekularni in slikovni označevalci kardiotoksičnosti obsevanja pri raku dojk**
Tanja Marinko, Onkološki inštitut Ljubljana Vabljeni predavatelj
- 12:55 - 13:10** **Vnetni dejavniki kot označevalci odgovora na zdravljenje z obsevanjem pri duktalnem karcinomu *in situ***
Katja Goričar, Onkološki inštitut Ljubljana
- 13:10 - 13:25** **Poobsevalna kserostomija in njeno zdravljenje z alogenskimi mezenhimskimi stromalnimi matičnimi celicami: rezultati pilotne študije**
Primož Strojman, Onkološki inštitut Ljubljana
- 13:25 - 13:40** **Serum-based steroid-protein panels for differentiating ovarian cancer from non-malignant adnexal tumors**
Marija Gjorgoska, Univerza v Ljubljani, Univerzitetni klinični center Ljubljana
- 13:40 - 14:10** **Odmor, ogled posterjev**

PROGRAM

4. del

Moderator: Mateja Krajc, Maja Čemažar

- 14:10 - 14:25** **Trendi zbolevanja za rakom med odraslimi mlajšimi od 50 let v obdobju 1961– 2021**
Ana Mihor, Onkološki inštitut Ljubljana
- 14:25 - 14:40** **Vloga dotika v dobi slike: ali ima klinični pregled še mesto pri presejanju visoko ogroženih žensk?**
Luka Marinko, Onkološki inštitut Ljubljana
- 14:40 - 14:55** **Interrogating the tumor microenvironment in renal cell carcinoma: a spatial proteomics study**
Taja Ložar, Onkološki inštitut Ljubljana
- 14:55 - 15:10** **Twinning za odličnost pri raziskavah aktivacije protitumorskega imunskega odziva po elektrokemoterapiji v kombinaciji z genskim elektroprenosom plazmidne DNA, ki kodirajo za ICIs – ZAP Cancer**
Boštjan Markelc, Onkološki inštitut Ljubljana
- 15:10 - 15:20** **Zaključek srečanja**
Tanja Marinko in Maja Čemažar, Onkološki inštitut Ljubljana

SEZNAM PRISPEVKOV

SEZNAM PRISPEVKOV

1	MOLEKULARNI IN SLIKOVNI OZNAČEVALCI KARDIOTOKSIČNOSTI PRI OBSEVANJU RAKA DOJK <i>Katja Goričar</i>	16
2	REPOZICIONIRANJE ZDRAVIL ZA ZDRAVLJENJE HER2-POZITIVNEGA RAKA DOJK KOT INTEGRATIVNA STRATEGIJA ZA INOVACIJE IN POSPEŠEVANJE DOSTOPNOSTI ZDRAVIL <i>Luka Irenej Pečan, Marko Jeran</i>	20
3	VREDNOTENJE RAZLIČNIH METOD EKSTRAKCIJE NUKLEINSKIH KISLIN IZ HUMANE CELIČNE 3D KULTURE RAKA <i>Stefanija Ivanova</i>	27
4	VNETNI DEJAVNIKI KOT OZNAČEVALCI ODGOVORA NA ZDRAVLJENJE Z OBSEVANJEM PRI DUKTALNEM KARCINOMU <i>IN SITU</i> <i>Tanja Marinko</i>	31
5	DD CELL-TOX CELL VIABILITY METHOD: FINDING A DIRECT AND DYNAMIC METHOD FOR A DYNAMIC PROCESS <i>Eneko Madorran</i>	35
6	CIRCULATING SIGNALS AS PREDICTIVE TOOLS IN CUTANEOUS SQUAMOUS CELL CARCINOMA: READY FOR THE CLINIC? <i>Andreja Pagon</i>	40
7	POTENTIAL OF SOLUBLE IMMUNE CHECKPOINTS AS PROGNOSTIC AND PREDICTIVE BIOMARKERS IN ENDOMETRIAL CANCER <i>Boštjan Pirš</i>	45
8	VLOGA IN POMEN mikroRNA V PATOGENEZI, DIAGNOSTIKI IN ZDRAVLJENJU KOŽNEGA MELANOMA – PREGLED LITERATURE <i>Dominik Škrinjar</i>	52

SEZNAM POVZETKOV

SEZNAM POVZETKOV

p1	SEKUNDARNE NAJDBE OB GENETSKEM TESTIRANJU BOLNIC IN BOLNIKOV Z RAKOM DOJK V OBDOBJU 2015-2024	62
	<i>Eva Avsec</i>	
p2	SPREMEMBE V INVAZIVNOSTI GLIOBLASTOMSKIH CELIC PO REVERZIBILNI ELEKTROPORACIJI	64
	<i>Anja Blažič</i>	
p3	UČINKI OBSEVANJA MIŠJIH TUMORJEV NA NAUČENO IMUNOST IN NARAVNE CELICE UBIJALKE	65
	<i>Tim Božič</i>	
p4	VPLIV MEMBRANSKE FILTRACIJE IN TEKOČINSKE CITOLOGIJE V DIAGNOSTIKI CITOPATOLOGIJE URINA	66
	<i>Damjana Cimerman</i>	
p5	BAKTERIOFAGI KOT NOSILCI TUMORSKIH ANTIGENOV: NOVA STRATEGIJA V IMUNOTERAPIJI RAKA	68
	<i>Andrej Cör</i>	
p6	SERUM-BASED STEROID-PROTEIN PANELS FOR DIFFERENTIATING OVARIAN CANCER FROM NON-MALIGNANT ADNEXAL TUMOR	70
	<i>Marija Gjorgoska</i>	
p7	VPLIV SISTEMSKE TERAPIJE NA CIRKULIRAJOČE TUMORSKE CELICE IN SKUPKE CIRKULIRAJOČIH TUMORSKIH CELIC	71
	<i>Klara Grad</i>	
p8	KLINIČNI POMEN CIRKULIRAJOČIH TUMORSKIH CELIC PRI RAKU DOJK	72
	<i>Cvetka Grašič Kuhar</i>	
p9	MORFOLOŠKE ZNAČILNOSTI CIRKULIRAJOČIH TUMORSKIH CELIC IZOLIRANIH IZ CENTRALNE VENSKE KRVI BOLNIC Z ZGODNJIM RAKOM DOJK	73
	<i>Tanja Jesenko</i>	
p10	RADIATION-INDUCED SKELETAL MUSCLE INJURY: MECHANISMS AND THERAPEUTIC PERSPECTIVES	74
	<i>Mihaela Jurdana</i>	
p11	GENSKA MODIFIKACIJA MEZENHIMSKIH MATIČNIH CELIC Z GENSKIM ELEKTROPRENOSOM ZA INTRATUMORSKO DOSTAVO INTERLEVKINA-12	75
	<i>Urška Kamenšek</i>	

p12	UČINEK KOMBINACIJE ELEKTROKEMOTERAPIJE IN anti-PD-1 IMUNOTERAPIJE PRI MIŠJIH MODELIH TUMORJEV Z RAZLIČNIM IMUNSKIM STATUSOM	
	<i>Simona Kranjc Brezar</i>	76
p13	PRILOŽNOSTI, RAZVOJ IN UPORABA UMETNE INTELIGENCE V IMUNOTERAPIJI RAKA	
	<i>Karin Kunstelj</i>	77
p14	ELEKTROKEMOTERAPIJA PRI OSTEOSARKOMU: RAZVOJ PREDKLINIČNIH MODELOV ZA POVEČANJE UČINKOVITOSTI	
	<i>Saša Kupčič</i>	79
p15	MALO-MOLEKULARNI INHIBITORJI 6-FOSFOFRUKTO-1-KINAZE SOČASNO ZATREJO NASTAJANJE LAKTATA IN SUPEROKSIDA PRI RAKAVIH CELICAH	
	<i>Matic Legiša</i>	80
p16	INTERROGATING THE TUMOR MICROENVIRONMENT IN RENAL CELL CARCINOMA: A SPATIAL PROTEOMICS STUDY	
	<i>Taja Ložar</i>	81
p17	VLOGA DOTIKA V DOBI SLIKE: ALI IMA KLINIČNI PREGLED ŠE MESTO PRI PRESEJANJU VISOKO OGROŽENIH ŽENSK?	
	<i>Luka Marinko</i>	82
p18	EVROPSKI PROJEKT TWINNING ZA ODLIČNOST PRI RAZISKAVAH AKTIVACIJE PROTITUMORSKEGA IMUNSKEGA ODZIVA PO ELEKTROKEMOTERAPIJI V KOMBINACIJI Z GENSKIM ELEKTROPRENOSOM PLAZMIDNE DNA, KI KODIRAJO ZA ZAVIRALCE IMUNSKIH KONTROLNIH TOČK – ZAP CANCER	
	<i>Boštjan Markelc</i>	84
p19	REPURPOSING MEDROXYPROGESTERONE ACETATE AND MEFENAMIC ACID FOR PLATINUM-RESISTANT OVARIAN CANCER	
	<i>Nika Marolt</i>	86
p20	CIRCULATING TUMOR DNA AS PREDICTIVE AND PROGNOSTIC MARKERS IN BREAST CANCER	
	<i>John Martens</i>	87
p21	GENSKI ELEKTROPRENOS mRNA Z ZAPISOM ZA IL-12 V CELICAH MELANOMA IN KOLOREKTALNEGA KARCINOMA	
	<i>Ajda Medved</i>	88
p22	OPTIMIZACIJA IN VALIDACIJA PROTOKOLOV ZA DOLOČANJE HORMONSKIH RECEPTORJEV RAKA DOJK NA CITOLOLOŠKIH VZORCIH NA BARVALCU DAKO OMNIS V RUTINSKEM CITOPATOLOŠKEM LABORATORIJU	
	<i>Simona Miceska</i>	89

p23	OVREDNOTENJE CIRKULIRAJOČIH TUMORSKIH CELIC IN CELIČNIH SKUPKOV PRI BOLNICAH S PRIMARNIM, NAPREDOVALNIM SEROZNIM RAKOM JAJČNIKA VISOKEGA GRADUSA PRED NEOADJUVANTNIM SISTEMSKIM ZDRAVLJENJEM	
	<i>Simona Miceska</i>	90
p24	IMPLEMENTACIJA VEČBARVNEGA KRIO-IMUNOFLUORESCENTNEGA BARVANJA CITOSPINOV V RUTINSKEM CITOPATOLOŠKEM LABORATORIJU	
	<i>Simona Miceska</i>	91
p25	TRENDI ZBOLEVANJA ZA RAKOM MED MLAJŠIMI OD 50 LET V OBDOBJU 1961– 2021	
	<i>Ana Mihor</i>	92
p26	MEROSLOVNA PODPORA ZA IZBOLJŠANJE GENOMSKEGA PROFILIRANJA V DIAGNOSTIKI RAKA	
	<i>Mojca Milavec</i>	94
p27	UČINKI ELEKTROKEMOTERAPIJE V KOMBINACIJI S SOTORASIBOM NA HUMANIH RAKAVIH CELICAH TREBUŠNE SLINAVKE	
	<i>Maša Omerzel</i>	96
p28	INTERDISCIPLINARNE POTI RAZVOJA NOVE GENERACIJE FLUORESCENČNIH OZNAČEVALCEV ZA CILJNO DIAGNOSTIKO BURKITTOVEGA LIMFOMA	
	<i>Maša Pelan</i>	97
p29	PRIMERJAVA SKLADNOSTI IN NAPOVEDNE VREDNOSTI NOVEGA PROLIFERACIJSKEGA PODPISA APIS Z ONCOTYPE Dx PODPISOM TER S KLASIČNO IMUNOHISTOKEMIČNO METODO DOLOČANJA KARAKTERISTIK RAKA DOJK	
	<i>Nina Privšek</i>	99
p30	ELEMENTI V SLEDOVIH V SERUMU KOT POTENCIALNI BIOMARKERJI PRI BOLNIKI Z RAKI BILIARNEGA TRAKTA- preliminarni rezultati	
	<i>Martina Reberšek</i>	100
p31	OPREDELITEV MEHANIZMOV CELIČNE SMRTI PO ELEKTROKEMOTERAPIJI V POGOJIH <i>IN VITRO</i>	
	<i>Lara Snoj</i>	102
p32	POOBSEVALNA KSEROSTOMIJA IN NJENO ZDRAVLJENJE Z ALOGENSKIMI MEZENHIMSKIM STROMALNIMI MATIČNIMI CELICAMI: REZULTATI PILOTNE ŠTUDIJE	
	<i>Primož Strojjan</i>	103

p33	SPREMEMBE TUMORSKEGA ŽILJA PO RADIOTERAPIJI: AKTIVACIJA TUMORSKEGA ENDOTELIJA POVEČA INFILTRACIJO IMUNSKIH CELIC V TUMOR <i>Iva Šantek</i>	105
p34	VZPOSTAVITEV MIŠJEGA MODELA TROJNO NEGATIVNEGA RAKA DOJK 4T1 ZA PROUČEVANJE CIRKULIRAJOČIH TUMORSKIH CELIC IN PROCESA ZASEVANJA <i>Veronika Škrjanc</i>	106
p35	RECOMBINANT CD30 NANOBODIES AS ROBUST AND COST-EFFECTIVE ALTERNATIVES TO CONVENTIONAL ANTIBODIES FOR DIAGNOSTICS OF HEMATOLOGIC MALIGNANCIES <i>Urša Štrancar</i>	107
p36	ELEKTROKEMOTERAPIJA Z BLEOMICINOM, CISPLATINOM ALI OKSALIPLATINOM NA MIŠJIH TUMORSKIH MODELIH: OD ABLACIJE DO VAKCINACIJE <i>IN SITU</i> <i>Katja Uršič Valentinuzzi</i>	108
p37	VZPOSTAVITEV ELEKTROPRENOSA SISTEMA TRANS-POMNOŽUJOČIH mRNA NA MODELU MIŠJEGA MELANOMA B16-F10 <i>IN VITRO</i> IN <i>IN VIVO</i> <i>Jaka Vrevc Žlajpah</i>	109
p38	PD-L1 BLOCKADE WITH NANOBODY REDUCES SURVIVAL OF GLIOBLASTOMA MODELS IN 2D AND 3D <i>Alja Zottel</i>	111

PRISPEVKI

MOLEKULARNI IN SLIKOVNI OZNAČEVALCI KARDIOTOKSIČNOSTI PRI OBSEVANJU RAKA DOJK

Katja Goričar¹, Jure Dolenc^{2,3}, Tomaž Podlesnikar^{3,4,5}, Tanja Marinko^{2,6}

¹ *Inštitut za biokemijo in molekularno genetiko, Medicinska fakulteta, Univerza v Ljubljani, Ljubljana, Slovenija*

² *Medicinska fakulteta, Univerza v Ljubljani, Ljubljana, Slovenija*

³ *Univerzitetni klinični center Ljubljana, Ljubljana, Slovenija*

⁴ *Univerzitetni klinični center Maribor, Maribor, Slovenija*

⁵ *Medicinska fakulteta Maribor, Univerza v Mariboru, Maribor, Slovenija*

⁶ *Onkološki inštitut Ljubljana, Ljubljana, Slovenija*

Elektronski naslov: tmarinko@onko-i.si

Izvleček

Kardiotoksičnost je neželen učinek zdravljenja raka dojk z obsevanjem, ki lahko pomembno vpliva na kvaliteto in dolžino življenja bolnic. Običajno se klinično izrazi šele mnogo let po obsevanju ter nastane kot rezultat več različnih dejavnikov.

V okviru raziskovalnih projektov, ki potekajo v sodelovanju Onkološkega inštituta Ljubljana, Medicinske fakultete Univerze v Ljubljani in Univerzitetnega kliničnega centra Ljubljana proučujemo klasične laboratorijske, slikovne in novejšje molekularne označevalce kardiotoksičnosti pri bolnicah z neinvazivnim rakom dojk, zdravljenih z operacijo in obsevanjem.

Uvod

Obsevanje je del standardnega zdravljenja tako pri invazivnem kot pri neinvazivnem raku dojk. Najpomembnejši neželeni učinek zdravljenja raka dojk z obsevanjem je kardiotoksičnost, ki lahko pusti trajne okvare na srčnih strukturah in pomembno vpliva na zdravje in kvaliteto življenja bolnic več let po zaključenem zdravljenju raka dojk.¹

Obsevanje v področju srca poveča tveganje za bolezni koronarnih arterij, miokardno disfunkcijo, okvare zaklopk in bolezni perikarda.¹ Ker srce običajni leži neposredno pod levo dojko, je kardiotoksičnost neželeni učinek predvsem obsevanja leve strani prsnega koša. Pri načrtovanju obsevanja leve dojke smo zato posebno pozorni na dozo sevanja, ki jo bo med zdravljenjem prejelo srce in jo kolikor se le da omejimo. Ker srce pogosto leži zelo blizu ležišča tumorja, sevanja namreč ne moremo usmeriti samo na tarčno tkivo, ne da bi pri tem nekaj doze prejelo tudi srce. Raziskave so pokazale, da je okvara na srcu zaradi sevanja povezana z velikostjo prejete doze in se pomembno poveča z vsakim prejetim Gy sevanja.¹

Kardiotoksičnost zdravljenja raka dojk z obsevanjem je zaradi svoje pomembnosti zelo proučevana tema in vezni člen več raziskovalnih projektov, ki trenutno potekajo v sodelovanju Onkološkega inštituta Ljubljana, Medicinske fakultete Univerze v Ljubljani ter Univerzitetnega kliničnega centra Ljubljana (J3-60064, OI-3-24) ali pa so se že zaključili (J3-1753, J3-2527). Ker smo želeli izključiti toksični vpliv sistemskega onkološkega zdravljenja na srce, smo v vseh navedenih projektih raziskovali oziroma raziskujemo kardiotoksičnost pri bolnicah z neinvazivnim rakom dojk (*duktalni karcinom in situ* (DCIS)), ki so v okviru standardne onkološke obravnave zdravljene samo z operacijo in pooperativnim obsevanjem.

Kardiotoksičnost želimo raziskati z več različnih vidikov, saj nanjo lahko poleg prejete doze in klasičnih dejavnikov, kot so kajenje, povišana vrednost maščob v krvi, debelost in sladkorna bolezen, vplivajo še drugi, predvsem genetski in drugi molekularni dejavniki, ki so trenutno v veliki meri še nepojasnjeni.

Klinična raziskava

Cilji

Troponin in NT-proBNP sta klasična označevalca kardiotsičnosti, ki ju uporabljamo v redni klinični praksi. Zanimalo nas je, ali se med obsevanjem vrednost klasičnih označevalcev kardiotsičnosti pri bolnicah z DCIS pomembno spremeni.

Ultrazvočna preiskava (UZ) srca v onkologiji še vedno predstavlja zlati standard za spremljanje kardiotsičnosti sistemskega zdravljenja.² Ker zgodnji učinki sevanja na strukturo in delovanje srca še niso dobro raziskani, smo želeli zgodnjo kardiotsičnost po obsevanju oceniti s pomočjo UZ in magnetno resonančne preiskave (MR) srca.

Epigenetski dejavniki, na primer miRNA, predstavljajo potencialen nov označevalec kardiotsičnosti, saj izpostavljenost sevanju pogosto spremeni njihovo izražanje. MiR-21 in miR-34a sta med najpomembnejšimi miRNA, povezanimi z obsevanjem.³ Raziskati smo želeli tudi, ali se izražanje miR-21 in miR-34a spremeni po obsevanju in ali genetska variabilnost vpliva na njuno izražanje, ter preučiti vpliv izražanja miR-21 in miR-34a ali njune genetske variabilnosti na pojav akutnih neželenih učinkov obsevanja na srcu pri bolnicah z DCIS.

Metode

V prospektivno longitudinalno klinično raziskavo smo vključili bolnice z DCIS, zdravljene v okviru redne klinične prakse z ohranitveno operacijo in pooperativnim obsevanjem na Onkološkem inštitutu Ljubljana med letoma 2019 in 2024. Kriteriji za izključitev so bili znana srčna bolezen, predhodna sistemska kemoterapija ali predhodno zdravljenje z obsevanjem. Vse bolnice so v raziskavo privolile prostovoljno in podale pisno soglasje. Lahko so se odločile samo za oddajo vzorcev krvi ali pa privolile tudi v slikovne preiskave. Raziskavo je odobrila Komisija Republike Slovenije za medicinsko etiko (KME 0120-54/2015-2 (39/05/15), 0120-54/2015-11 in 0120-54/2015-14).

Bolnice so bile zdravljene s 3-dimenzionalnim konformnim obsevanjem (3D CRT) ali z intenzitetno modulirajočim obsevanjem (IMRT). Levo dojko smo obsevali v globokem zadržanem vdihu, če je bilo to izvedljivo. Pred in po zdravljenju z obsevanjem so vse bolnice opravile klinični pregled in oddale vzorec krvi. Pred in največ dva tedna po obsevanju so opravile tudi UZ srca in MR srca, v kolikor so v to privolile. Za spremljanje neželenih učinkov na srcu smo poleg omenjenih slikovnih metod uporabili koncentracijo N-konca pro-B-tipa natriuretičnega peptida (NT-proBNP) in troponina v serumu. Prav tako smo iz vzorcev periferne krvi izolirali DNA, iz plazme pa miRNA za molekularne analize. Izražanje miRNA smo določili s PCR v realnem času, izbrane polimorfizme pa smo genotipizirali z alelna specifičnim PCR.

Rezultati

Klasični označevalci kardiotsičnosti

Pri 194 bolnicah (mediana starost 56 (50-63) let) po obsevanju ni bilo pomembnih razlik v klasičnih označevalcih kardiotsičnosti. Mediana vrednost NT-proBNP je bila pred zdravljenjem z obsevanjem 73 (50-116,8) ng/l, po zaključenem zdravljenju z obsevanjem pa 72 (50-112) ng/l ($p = 0,779$). Povišane vrednosti NT-proBNP (>125 ng/l) so bile pred obsevanjem prisotne pri 45 (23,2 %) bolnicah, po obsevanju pa pri 41 (21,1 %) bolnicah. Po obsevanju se je vrednost povežala pri 79 (40,7 %) bolnicah. Mediana vrednost troponina ni niti pred niti po obsevanju dosegla vrednosti nad 10 ng/l (pred obsevanjem 4 (1,5-5) ng/l, po obsevanju 5 (1,5-5) ng/l, $N = 114$). Statistično značilnih razlik v dinamiki NT-proBNP in troponina nismo opazili niti pri ločeni analizi bolnic glede na obsevano stran.

Slikovni označevalci kardiotoksičnosti

Ultrazvočna preiskava srca

V podskupini 124 bolnic, pri katerih smo opravili UZ srca, je bila povprečna doza sevanja na srce $0,92 \pm 0,49$ Gy in je bila značilno večja pri bolnicah, ki so obsevale levo dojko kot pri bolnicah, ki so obsevale desno ($1,10 \pm 0,59$ Gy v primerjavi z $0,72 \pm 0,28$ Gy; $p < 0,001$). Opazili smo šibko korelacijo med povprečno dozo sevanja na srce in kazalcem globalne longitudinalne sistolične deformacije levega prekata (GLS) ($p = 0,001$) ter neinvazivno oceno polnilnega tlaka levega prekata (E/e') ($p = 0,001$). Vendar pa po obsevanju ni bilo pomembnih sprememb parametrov sistolične in diastolične funkcije, ne glede na stran obsevanja.

Magnetna resonanca srca

1 MR srca pred in po obsevanju je opravilo 40 bolnic. Pri tistih, ki so obsevale levo dojko, je prišlo do statistično značilnega povišanja vrednosti T2 ($p = 0,044$), kar najverjetneje predstavlja prisotnost edema miokarda. Pri drugih preiskovanih parametrih ni bilo značilnih razlik. Pri nobeni bolnici se ni razvil perikardialni izliv.⁴

Novejši molekularni označevalci kardiotoksičnosti

Po obsevanju je bilo pri bolnicah ($N = 119$) povišano izražanje miR-21 ($p = 0,001$) in miR-34a ($p < 0,001$) v plazmi. Povišano izražanje miR-21 po obsevanju je bilo povezano z višjo vrednostjo NT-proBNP ($p = 0,044$) po zaključku obsevanja. Polimorfizmi v genih za miR-21 in miR-34a v naši raziskavi niso vplivali na proučevane parametre⁵.

Razprava in zaključek

Kardiotoksičnost obsevanja je dobro znan neželeni učinek zdravljenja raka dojk z obsevanjem, a ga v standardni klinični praksi zaenkrat še ne znamo diagnosticirati v zgodnji, predklinični fazi, ko nastajajoče obolenje srca še ne dela težav in ne ogroža bolnice ter bi lahko z zgodnjim ukrepanjem morda zavrla nadaljnji razvoj bolezni. Standardna označevalca kardiotoksičnosti, troponin in NT-proBNP, se uporabljata v klinični praksi, ko ima bolnica že težave, za ugotavljanje predkliničnih sprememb na srcu po obsevanju pa se zaenkrat nista pokazala kot ustrezna označevalca, ker sta premalo občutljiva, kar smo potrdili tudi v naši raziskavi.

Slikovne metode, kot sta UZ srca in MR srca prav tako predstavljajo pomembno diagnostično orodje pri že znani bolezni srca. Dinamika parametrov UZ srca, ki smo ga izvedli pred in po obsevanju, kaže, da sodobno obsevanje raka dojk ne povzroča pomembnih zgodnjih škodljivih učinkov na delovanje levega ali desnega srca. Zdi se, da je sodobna radioterapija varna v smislu zgodnjih kardiotoksičnih učinkov, vendar je potrebno nadaljnje UZ spremljanje srca za oceno morebitnih dolgoročnih neželenih učinkov.

Kot je pokazala naša raziskava, bi morda lahko MR srca uporabljali za odkrivanje zgodnjih morfoloških sprememb srčne mišice po obsevanju, saj povišane vrednosti T2 po obsevanju najverjetneje predstavljajo edem miokarda, vendar pa je potrebno naše rezultate validirati še na večjem številu preiskovank ter po daljšem časovnem obdobju po obsevanju.⁴

Obetavno je tudi področje modernih molekularnih označevalcev, ki spremenijo svoje izražanje med obsevanjem, kot smo na primer v naši raziskavi prikazali za miR-21 in miR-34a⁵, saj cirkulirajoči označevalci omogočajo longitudinalno spremljanje bolnic z minimalno invazivnimi metodami. Morda bomo nekoč na podlagi dinamike molekularnih označevalcev v vzorcih krvi, odvzetih pred in po obsevanju, lahko pri posameznih bolnicah napovedali večjo ogroženost za razvoj obolenja srca ter z nadaljnjimi preventivnimi ukrepi preprečili nastanek bolezni ali jo vsaj omejili.

Slikovni in moderni molekularni označevalci bi torej lahko prispevali k bolj prilagojenemu in usmerjenemu kardiološkemu nadzoru bolnic po zdravljenju raka dojk, vendar pa so za natančnejšo

pojasnitev njihovih vlog potrebne dodatne prospektivne raziskave.

Zahvala

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

Raziskovalna sredstva: ARIS J3-60064, J3-1753, J3-2527 ,OI-3-24, UKC LJ terciarni projekt 20210086 in 20240198.

Literatura

1. Meattini I, et al. Association of Breast Cancer Irradiation With Cardiac Toxic Effects: A Narrative Review. *JAMA Oncol.* 2021;7(6):924-932.
2. Podlesnikar T, et al. Radiotherapy-Induced Cardiotoxicity: The Role of Multimodality Cardiovascular Imaging. *Front Cardiovasc Med.* 2022;28(9):887705.
3. Petrović N, et al. MicroRNAs in Prostate Cancer Following Radiotherapy: Towards Predicting Response to Radiation Treatment. *Curr Med Chem.* 2022;29(9):1543-1560.
4. Podlesnikar T, et al. Early effect of contemporary radiotherapy protocol on myocardium in patients with breast cancer assessed with cardiac magnetic resonance. *European Heart Journal - Cardiovascular Imaging.* 2023; 24(1).
5. Redenšek Trampuž S, et al. Genetic variability and expression of miR-21 and miR-34a as biomarkers of cardiotoxicity after radiotherapy in breast cancer. *ESHG Pharmacogenetics Course: book of abstracts: Portorož, Slovenija, 22.-24. Sept 2022.*

REPOZICIONIRANJE ZDRAVIL ZA ZDRAVLJENJE HER2-POZITIVNEGA RAKA DOJK KOT INTEGRATIVNA STRATEGIJA ZA INOVACIJE IN POSPEŠEVANJE DOSTOPNOSTI ZDRAVIL

Luka Irenej Pečan¹, Anja Tanšek², Nuša Gorišek³, Stela Maček³, Minja Zorc²,
Marko Jeran³

¹ *University of Trieste, Department of Life Sciences, Trieste, Italy*

² *Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Oddelek za zootehniko, Katedra za genetiko, animalno biotehnologijo in imunologijo, Domžale, Slovenija*

³ *Institut "Jožef Stefan", Odsek za anorgansko kemijo in tehnologijo, Ljubljana, Slovenija*

Elektronski naslov: marko.jeran@ijs.si

Izvleček

Pričujoča raziskava predstavlja odziv na biološko kompleksnost, terapevtske omejitve in javnozdravstveno breme, povezano z zdravljenjem HER2-pozitivnega raka dojke.

Osrednji cilj je bil poiskati kanidatne učinkovine za repozicioniranje in ovrednotiti potencial repozicioniranja kot racionalne in stroškovno učinkovite strategije za premagovanje odpornosti na terapijo, zmanjšanje časovnih in sistemskih ovir pri dostopu do zdravil ter razširitev terapevtskih možnosti. Pri tem je raziskava pokazala, da lahko z združevanjem različnih znanstvenih disciplin oblikujemo hiter in učinkovit raziskovalni model, ki poleg znanstvenih rezultatov poudarja tudi pomen interdisciplinarnega sodelovanja in novih načinov povezovanja v boju proti raku.

Takšen okvir presega zgolj biološko razumevanje bolezni, saj hkrati naslavlja vprašanja učinkovitosti zdravljenja, ekonomske trajnosti in dostopnosti terapij. Pomen za klinično prakso je v tem, da odpira pot k cenejšim in hitreje dostopnim terapevtskim možnostim, kar je še posebej relevantno v kontekstu odpornosti na standardne tarčne terapije in omejenih zdravstvenih virov.

Uvod

Pričujoča raziskava predstavlja odziv na biološko kompleksnost, terapevtske omejitve in javnozdravstveno breme, povezano z zdravljenjem HER2-pozitivnega raka dojke. Osrednji cilj je bil poiskati kanidatne učinkovine za repozicioniranje in ovrednotiti potencial repozicioniranja kot racionalne in stroškovno učinkovite strategije za premagovanje odpornosti na terapijo, zmanjšanje časovnih in sistemskih ovir pri dostopu do zdravil ter razširitev terapevtskih možnosti. Pri tem je raziskava pokazala, da lahko z združevanjem različnih znanstvenih disciplin oblikujemo hiter in učinkovit raziskovalni model, ki poleg znanstvenih rezultatov poudarja tudi pomen interdisciplinarnega sodelovanja in novih načinov povezovanja v boju proti raku. Takšen okvir presega zgolj biološko razumevanje bolezni, saj hkrati naslavlja vprašanja učinkovitosti zdravljenja, ekonomske trajnosti in dostopnosti terapij. Pomen za klinično prakso je v tem, da odpira pot k cenejšim in hitreje dostopnim terapevtskim možnostim, kar je še posebej relevantno v kontekstu odpornosti na standardne tarčne terapije in omejenih zdravstvenih virov.

Zakaj preučevati HER2-pozitivni rak dojke?

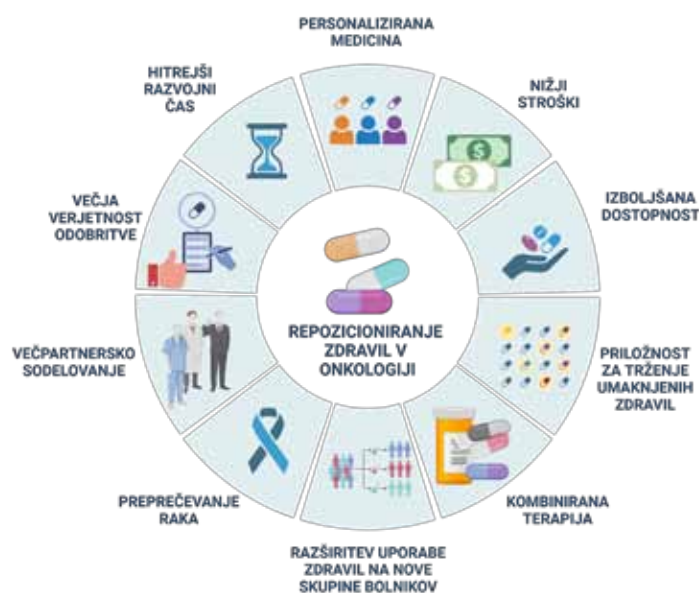
HER2-pozitiven rak dojke predstavlja približno 15 % vseh primerov raka dojke in je povezan z agresivnejšim potekom bolezni ter slabšo prognozo.¹ Humani receptor za epidermalni rastni faktor 2 (HER2) je transmembranski receptor tirozin-kinaze, ki ga kodira gen *ERBB2*. HER2 spada v družino receptorjev HER/EGFR, v katero sodijo še HER1 (EGFR, kodiran z genom *ERBB1*), HER3 (kodiran

z genom *ERBB3*) in HER4 (kodiran z genom *ERBB4*). Za razliko od drugih članov te družine, HER2 nima znanega liganda in ostaja v konstitutivno aktivni konformaciji, v kateri tvori homo- in heterodimere ter sproža signalne kaskade, ki spodbujajo celično proliferacijo, preživetje, angiogenezo in invazijo tumorja.^{1,2} Amplifikacija gena *ERBB2* vodi v prekomerno izraženo proteina HER2, kar lahko pri tumorskih celicah pomeni tudi do 1–2 milijona kopij receptorja na površini posamezne celice.² Tako povečano izražanje povzroči hiperaktivacijo proliferativnih in antiapoptotskih signalnih poti, zlasti kaskad PI3K/AKT/mTOR in MAPK.^{1,2}

HER2-pozitivni tumorji se klinično pogosto odlikujejo po hitri rasti in večji verjetnosti prizadetosti regionalnih bezgavk že ob postavitvi diagnoze. Poleg tega je pri teh bolnicah pogostejša pojavnost oddaljenih zasevkov.³ V primerjavi z drugimi podtipi raka dojke so HER2-pozitivni tumorji manj odzivni na standardne kemoterapije. Čeprav so zdravila proti HER2, kot so trastuzumab, lapatinib ali T-DM1, bistveno izboljšala preživetje, se pri številnih bolnicah sčasoma razvije pridobljena odpornost na ta zdravila.⁴ Na primer, skrajšane variante, kot je p95HER2, ali mutacije, kot je HER2-L755S, zmanjšajo vezavo trastuzumaba ali občutljivost na zaviralce kinaz.⁴ Poleg tega standardne terapije, usmerjene proti HER2, morda niso dostopne v vseh zdravstvenih sistemih zaradi visoke cene in zapletenih regulatornih postopkov, kar še dodatno povečuje globalne neenakosti zdravljenja raka.^{5,6}

Znanstveni okvir: repozicioniranje zdravil kot racionalna strategija

Repozicioniranje zdravil, pri katerem se obstoječa, že odobrena zdravila uporabijo za nove terapevtske indikacije, predstavlja strateško alternativo konvencionalnemu razvoju zdravil (Slika 1). V primerjavi z 10–15 leti in milijardnimi investicijami, potrebnimi za razvoj novih učinkovin, je prednost repozicioniranih zdravil v tem, da so njihova farmakokinetika, varnostni profil in proizvodni procesi že znani, kar bistveno skrajša čas do klinične uporabe pri novi indikaciji ter zmanjša stroške in tveganja, povezana z razvojem novih učinkovin.^{7,8} Ta strategija je še posebej pomembna v onkologiji, kjer zaradi visoke stopnje odpadlih kandidatov pri razvoju novih zdravil obstaja nujna potreba po hitrejših in stroškovno ugodnejših rešitvah.⁹



Slika 1: Priložnosti in možnosti repozicioniranja zdravil v onkologiji.

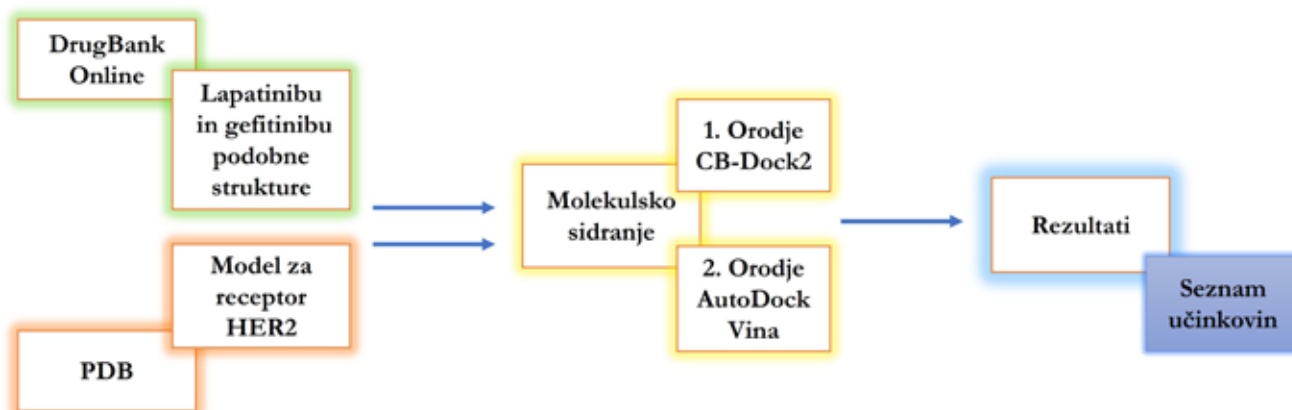
V tej raziskavi smo koncept repozicioniranja ponazorili z *in silico* pristopom, pri katerem smo uporabili molekularno sidranje na tarčo HER2 kot modelni primer. Namen ni bil le podrobna analiza posameznih učinkovin, temveč vzpostavitev raziskovalnega okvira, ki omogoča hitro prednostno razvrščanje potencialnih kandidatov za nadaljnjo validacijo. Takšen pristop združuje metodologije molekularne biologije in bioinformatike ter se smiselno povezuje s farmakoekonomskimi vidiki

izvedljivosti in dostopnosti zdravljenja. Na ta način raziskava služi kot dokaz koncepta, saj omogoča prehod od teoretičnih izhodišč do preverljivih hipotez, ki jih je mogoče nadgraditi z eksperimentalnimi in kliničnimi raziskavami.

Bioinformacijska analiza – metodologija in rezultati

Cilj raziskave je bil s pomočjo bioinformacijskih pristopov identificirati potencialne kandidate za repozicioniranje zdravil pri zdravljenju HER2-pozitivnega raka dojke. Naše hipoteze so temeljile na predpostavki, da med izbranimi ligandi obstajajo spojine s primerljivo ali višjo vezavno afiniteto kot jo izkazuje referenčni zdravili lapatinib (-11 kcal/mol) in gefitinib (-8 kcal/mol), zaradi česar bi bile primerne za nadaljnjo obravnavo. Prav tako smo predvidevali, da se določene spojine v vezavni žep HER2 receptorja ne umeščajo zaradi njihove prevelike molekulske mase ali nezmožnosti vzpostavitve zadostnega števila stabilnih interakcij z aminokislinami v vezavnem mestu.

Za metodološki okvir (Slika 2) smo uporabili pristop molekulskega sidranja, ki predstavlja uveljavljeno računalniško orodje za oceno interakcij med ligandi in proteinskimi tarčami.¹⁰ Kot referenčno zdravilo smo uporabili lapatinib, klinično potrjen inhibitor HER2, ki je ustrezna primerjalna kontrola za validacijo rezultatov. Poleg njega je bil vključen tudi gefitinib, inhibitor EGFR in soroden član družine HER receptorjev, ki je služil kot dodatna kontrola zaradi strukturne sorodnosti. Tukatinib, odobren za zdravljenje HER2-pozitivnega raka dojke, je bil uporabljen izključno kot validacijska točka in zato ni obravnavan kot kandidat za repozicioniranje.

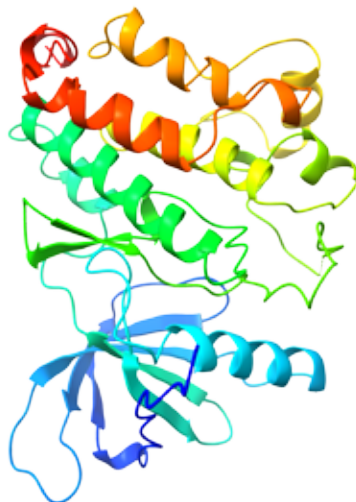


Slika 2: Shematski prikaz poteka raziskovalnega dela.

Identifikacijo strukturno podobnih spojin lapatinibu in gefitinibu smo izvedli v zbirki *DrugBank Online*¹¹, kjer smo uporabili prag podobnosti 0,5 in iskanje omejili na odobrene učinkovine. Pridobljene zapise molekul v formatu SMILES smo nato prenesli v zbirko *PubChem*¹² ter poiskali njihove tridimenzionalne strukture. Molekule, za katere tridimenzionalni model ni bil na voljo, zaradi prevelike kompleksnosti niso bile vključene v nadaljnje analize.

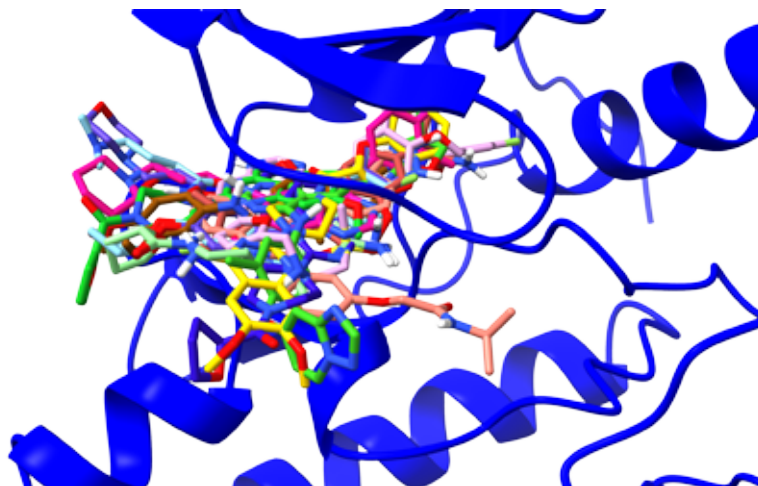
Kristalografsko strukturo receptorja HER2 smo pridobili iz zbirke *Protein Data Bank*¹³ in izbrali model 3PP0¹⁴, ki predstavlja neaktivno konformacijo proteina z ločljivostjo 2,80 Å. Strukturo smo pripravili z odstranitvijo odvečnih verig, ligandov in molekul vode ter dodajanjem polarnih vodikov in Kollmanovih nabojev, kar je omogočilo pripravo za molekulske sidranje.

Molekulske sidranje smo izvedli z dvema programoma, *CB-Dock2*¹⁵ in *AutoDock Vina*.¹⁶ Prvi je spletno orodje, ki omogoča hitro in uporabniku prijazno izvedbo, medtem ko je *AutoDock Vina* naprednejše in zanesljivejše orodje, primerno za natančno kvantitativno oceno vezavne afinitete. Vrednotenje rezultatov smo zato oprli predvsem na analize pridobljene z *AutoDock Vina*, medtem ko so bili rezultati *CB-Dock2* uporabljeni za okvirno primerjavo. Pri določanju vezavnega mesta smo se oprli na predhodne raziskave¹⁰, kjer so bile opredeljene ključne aminokisliline v interakciji z ligandom (Slika 3).



Slika 3: Kristalografska struktura receptorja HER2 v neaktivni obliki (3PP0).¹³

Rezultati analize so pokazali, da se je od 28 testiranih učinkovin le 14 ligandov umeščalo v vezavni žep receptorja HER2 (Slika 4). Najvišjo afiniteto je izkazal lapatinib (-11 kcal/mol), kar je skladno z njegovo znano farmakološko aktivnostjo. Med spojinami, ki so se vezale na ustrezno mesto, so se posebej izkazali inavolisib (-9,9 kcal/mol), belumosudil (-9,8 kcal/mol), doxazosin (-9,6 kcal/mol), dacomitinib (-9,5 kcal/mol), terazosin (-8,4 kcal/mol), prazosin (-8,2 kcal/mol), afatinib (-8,1 kcal/mol) in trimetreksat (-8 kcal/mol). Na podlagi primerjave z referenčnima zdraviloma lapatinib in gefitinib so navedene spojine opredeljene kot potencialni kandidati za nadaljnjo validacijo. Posebej velja izpostaviti belumosudil, ki je inhibitor ROCK-kinaze in že odobren za zdravljenje boleznih presadka proti gostitelju (*angl.* graft-versus-host) (GVHD)¹¹, kar dodatno potrjuje njegovo farmakološko relevantnost.



Slika 4: Uspešne vezave vseh ligandov v žep receptorja 3PP0 v programu AutoDock Vina.

Kljub obetavnim rezultatom je potrebno poudariti, da računalniško napovedane afinitete ne zadoščajo za neposredno klinično aplikacijo. Molekularno sidranje je izjemno uporabno kot orodje za prednostno razvrščanje spojin in oblikovanje testabilnih hipotez, vendar zahteva eksperimentalno validacijo z *in vitro* in *in vivo* študijami, preden lahko vodi do kliničnih preiskovanj.^{17,18} Nadaljnja integracija proteomskih in metabolomskih podatkov bi lahko v prihodnje dodatno izboljšala natančnost in zanesljivost bioinformacijskih napovedi.^{19,20}

Repozicioniranje onkoloških zdravil: priložnosti in omejitve

Povečevanje pojavnosti raka in vzporedno naraščajoče ekonomsko breme zdravljenja ustvarjata močan pritisk na zdravstvene sisteme in plačnike. Izdatki za onkološka zdravila rastejo hitreje od incidence bolezni, medtem ko številne nove terapije prinašajo majhne, postopne izboljšave izida v primerjavi s standardom zdravljenja.^{5,21} V tem okolju se repozicioniranje zdravil uveljavlja kot racionalna dopolnitev klasičnega razvoja: preskoči del predkliničnega in zgodnjega kliničnega tveganja, skrajša čas do trga ter zmanjša stroške, hkrati pa ohranja regulativne standarde kakovosti, varnosti in učinkovitosti.⁷

2 Agregirani podatki dosledno kažejo, da povprečni strošek razvoja novega zdravila znaša približno 2,5 milijarde EUR ob časovnici 10–15 let, medtem ko repozicioniranje praviloma zahteva 300 milijonov do 1,5 milijarde EUR in 3–12 let.^{7,21} Klinične faze, ki predstavljajo največji del stroškov (okvirno 44–66 %), so ključni vir prihrankov, saj repozicioniranje pogosto omogoča preskok faz I/II; posledično je verjetnost regulatorne odobritve višja ($\approx 30\%$ proti $\approx 8\text{--}12\%$ pri novih entitetah), ker so varnostni profili že dobro poznani.^{21–23}

Tudi regulatorni vidik dodatno podpira izvedljivost takšnih projektov. Za repozicionirane indikacije so na voljo pospešene oziroma sorazmerno manj zahtevne poti, kar skrajša čas do trga, čeprav zahteve glede dokazov učinkovitosti ostajajo nespremenjene.⁷ Tržni potencial repozicioniranih zdravil je sicer praviloma nižji kot pri novih entitetah zaradi konkurenčnega okolja in omejene ekskluzivnosti, vendar je poslovni primer lahko zelo prepričljiv v indikacijah z neizpolnjenimi terapevtskimi potrebami.^{6,9}

Osrednje omejitve pristopa izvirajo iz intelektualne lastnine in financiranja poznih kliničnih faz. Ker repozicionirane molekule pogosto ne omogočajo robustnih patentov na sestavo snovi (*angl.* composition-of-matter), se podjetja opirajo na patente uporabe in podatkovno/zakonsko ekskluzivnost, kar zmanjšuje izključitveno moč pravic intelektualne lastnine in stopnjo zaščite pred konkurenco, posledično pa zavira zasebne investicije.^{24–27} Zato pridobivajo pomen partnerstva med industrijo, akademijo in neprofitnimi akterji ter alternativni finančni modeli (patentni skladi, odprte licence), usmerjeni v sofinanciranje faz II/III.^{5,28–33}

Metodološko integracija bioinformacijskih orodij, od računalniškega presejanja in molekulskega sidranja do metod umetne inteligence, pospešuje identifikacijo kandidatov in oblikovanje hipotez za poznejšo eksperimentalno verifikacijo. V kombinaciji s sodobnimi dostavnimi tehnologijami lahko tak pristop izboljša terapevtski indeks repozicioniranih terapij in zmanjša toksičnost, vendar ne odpravlja potrebe po strogem, fazno ustreznem kliničnem preverjanju.^{7,21,34} Pri interpretaciji ekonomskih rezultatov je smiselna previdnost, saj so ocene občutljive na predpostavke o diskontiranju, izidnih merah, cenovni regulaciji in povračilih ter na dinamiko konkurence; dodatno negotovost vnašajo omejitve IP in potencialna off-label uporaba generikov.^{5,6}

Sklepno je repozicioniranje v povprečju stroškovno učinkovitejše in časovno hitreje od konvencionalnega razvoja, z višjo verjetnostjo uspeha in nižjim zgodnje-kliničnim tveganjem. Kljub nižjemu povprečnemu tržnemu potencialu in izzivom intelektualne lastnine ostaja repozicioniranje strateško pomemben instrument za izboljšanje dostopnosti onkoloških terapij, zlasti tam, kjer so potrebe bolnikov izrazito neizpolnjene. Za realizacijo potenciala v praksi so smiselni: (i) spodbujevalni mehanizmi za pozne klinične faze, (ii) standardizacija ekonomskih metodologij za primerljivost med trgi ter (iii) sistemska spodbuda odprtih inovacij in dostopa do "neuspešnih" molekul. Takšen sklop ukrepov na presečišču ekonomike zdravja, regulatorike in bioinformatike predstavlja pragmatično pot do hitrejših in širše dostopnih terapevtskih rešitev.^{5–7,21,34}

Interdisciplinarna zasnova in prenos znanja: reproducibilen model za prihodnje raziskave

Raziskava ponazarja sodoben interdisciplinarni pristop, ki presega okvire posameznih ved. Integracija molekularne biologije, bioinformatike, farmakologije in farmakoekonomike je omogočila oblikovanje

celostnega modela, ki HER2-pozitiven rak dojke obravnava kot biološki, farmacevtski, računalniški in zdravstveno-ekonomski izziv.

Posebnost projekta je lastna iniciativnost raziskovalcev (*angl.* investigator-initiated), neodvisna od formalnih razpisnih mehanizmov, kar poudarja znanstveno motivacijo in družbeno relevantnost teme. Poleg znanstvenih rezultatov je imel projekt izrazit izobraževalni učinek: vključil in opolnomočil je mlajše raziskovalce, okrepil mentorski prenos znanja ter spodbujal zgodnje vstopanje v raziskovalno delo. Predlagani interdisciplinarni okvir predstavlja reproducibilen model za prihodnje študije in čez-sektorsko sodelovanje, usmerjeno v translacijo rezultatov v klinično prakso in širši družbeni učinek.

Zahvala

Prispevek je nastal v okviru raziskav programov (P1-0045, P4-0220) Javne agencije za znanstvenoraziskovalno in inovacijsko dejavnost Republike Slovenije (ARIS).

Literatura

- Gutierrez C, Schiff R. HER2: Biology, detection, and clinical implications. *Arch Pathol Lab Med.* 2011;135(1):55–62.
- Pegram MD, Konecny G, Slamon DJ. The molecular and cellular biology of HER2/neu gene amplification/overexpression and the clinical development of Herceptin (Trastuzumab) therapy for breast cancer. In: Gradishar WJ, Wood WC (eds.), *Advances in breast cancer management.* 2000;103:57–75. Springer, Boston (MA), USA.
- Goutsouliak K, et al. Towards personalized treatment for early stage HER2-positive breast cancer. *Nat Rev Clin Oncol.* 2020;17(4):233–250.
- Vernieri C, et al. Resistance mechanisms to anti-HER2 therapies in HER2-positive breast cancer: Current knowledge, new research directions and therapeutic perspectives. *Crit Rev Oncol Hematol.* 2019;139:53–66.
- Weth FR, et al. Unlocking hidden potential: Advancements, approaches, and obstacles in repurposing drugs for cancer therapy. *Br J Cancer.* 2024;130(5):703–715.
- World Health Organization 2. Repurposing of medicines in oncology – the underrated champion of sustainable innovation: Policy brief. 2021. <https://iris.who.int/server/api/core/bitstreams/3cb5499f-ff27-4129-8c74-1f560aed0444/content>
- Chella N, Ranjan OP, Alexander A. Drug repurposing: Innovative approaches to drug discovery and development. 2024. Springer Singapore
- Pushpakom S, et al. Drug repurposing: Progress, challenges and recommendations. *Nat Rev Drug Discov.* 2019;18(1):41–58.
- Kodrič M, et al. Licenciranje v farmacevtski industriji: trendi in strategije. *Anali PAZU HD.* 2024;10(1–2):47–87.
- Balbuena-Rebolledo I, et al. Repurposing FDA drug compounds against breast cancer by targeting EGFR/HER2. 2021;14(8):791.
- Knox C, et al. DrugBank 6.0: The DrugBank knowledgebase for 2024. *Nucleic Acids Res.* 2024;52(D1):D1265–D1275.
- Kim S, Chen J, Cheng T, Gindulyte A, He J, He S, idr. PubChem 2025 update. *Nucleic Acids Res.* 2025;53(D1):D1516–D1525.
- Berman HM, et al. The protein data bank. *Nucleic Acids Res.* 2000;28(1):235–242.
- Aertgeerts K, et al. Structural analysis of the mechanism of inhibition and allosteric activation of the kinase domain of HER2 protein. *J Biol Chem.* 2011; 286(21):18756–18765.
- Liu Y, et al. CB-Dock2: Improved protein–ligand blind docking by integrating cavity detection, docking and homologous template fitting. *Nucleic Acids Res.* 2022;50(W1):W159–W164.
- Eberhardt J, et al. AutoDock Vina 1.2.0: New docking methods, expanded force field, and Python bindings. *J Chem Inf Model.* 2021;61(8):3891–3898.
- Meng Y, et al. A weighted bilinear neural collaborative filtering approach for drug repositioning. *Briefings in bioinformatics.* 2022. <https://consensus.app/papers/a-weighted-bilinear-neural-collaborative-filtering-meng-lu/7c1decb286515eeaa789602bdef2aed1/>
- Zhao H, et al. Novel modeling of cancer cell signaling pathways enables systematic drug repositioning for distinct breast cancer metastases. *Cancer Res.* 2013;73(20):6149–6163.
- Alam MS, et al. Bioinformatics and network-based screening and discovery of potential molecular targets and small molecular drugs for breast cancer. *Front Pharmacol.* 2022;13:942126.
- Zhou H, et al. Informatics on drug repurposing for breast cancer. *Drug Des Devel Ther.* 2023;17:1933–1943.
- PhRMA. Emerging value in oncology: How ongoing research expands the benefits of oncology medicines. 2023. https://irapatientinfo.org/wp-content/uploads/2023/07/PhRMA_Emerging-Value-Report_FIN-web_July2023_v2.pdf
- Boyd KA, Fenwick E, Briggs A. Using an iterative approach to economic evaluation in the drug development process. *Drug Dev Res.* 2010;71(8):470–477.
- Sertkaya A, Franz C. Antimicrobial drugs market returns analysis: Final report. Office of the assistant secretary for planning and evaluation. 2022. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK603193/>
- Cha Y, et al. Drug repurposing from the perspective of pharmaceutical companies. *Br J Pharmacol.* 2018;175(2):168–180.
- Verbaanderd C, Meheus L, Huys I, Pantziarka P. Repurposing drugs in oncology: Next steps. *Trends Cancer.* 2017;3(8):543–546.
- Murphy SM, et al. The Consortium for Clinical Investigations of Neurological Channelopathies (CINCH) and Inherited Neuropathies Consortium (INC) Consortia of the Rare Disease Clinical Research Network. Unintended effects of orphan product designation for rare neurological diseases. *Ann Neurol.* 2012;72(4):481–490.

27. Radley DC, et al. Off-label prescribing among office-based physicians. *Arch Intern Med.* 2006;166(9):1021–1026.
28. Mueller-Langer F. Neglected infectious diseases: Are push and pull incentive mechanisms suitable for promoting drug development research?. *Health Econ Policy Law.* 2013;8(2):185–208.
29. Krishnamurthy N, et al. Drug repurposing: A systematic review on root causes, barriers and facilitators. *BMC Health Serv Res.* 2022;22(1):970.
30. Lee JJ, Haupt JP. Scientific globalism during a global crisis: Research collaboration and open access publications on COVID-19. *High Educ.* 2021;81(5):949–966.
31. Fetro C. Connecting academia and industry for innovative drug repurposing in rare diseases: It is worth a try. *Rare Dis Orphan Drugs J.* 2023;2(2):7.
32. Roessler HI, et al. Drug repurposing for rare diseases. *Trends Pharm Sci.* 2021;42(4):255–267.
33. van den Berg S, de Visser S, Leufkens HGM, Hollak CEM. Drug repurposing for rare diseases: A role for academia. *Front Pharmacol.* 2021;12:746987.
34. Xia Y, et al. Drug repurposing for cancer therapy. *Sig Transduct Target Ther.* 2024;9(1):92.

VREDNOTENJE RAZLIČNIH METOD EKSTRAKCIJE NUKLEINSKIH KISLIN IZ HUMANE CELIČNE 3D KULTURE RAKA

Stefanija Ivanova ¹, Alexandra Bogožalec Košir ², Metka Novak ³, Barbara Breznik ³, Mojca Milavec ²

¹ Fakulteta za kemijo in kemijsko tehnologijo, Univerza v Ljubljani, Ljubljana, Slovenija

² Oddelek za biotehnologijo in sistemsko biologijo, Nacionalni inštitut za biologijo, Ljubljana, Slovenija

³ Oddelek za genetsko toksikologijo in biologijo raka, Nacionalni inštitut za biologijo, Ljubljana, Slovenija

Elektronski naslov: mojca.milavec@nib.si

Izvleček

Ustrezna izolacija DNA je bistvena za molekularne raziskave in diagnostiko, saj količina in kakovost DNA vplivata na postopke analize, kot sta sekvenciranje in PCR, ter na zanesljivost rezultatov. Ocenili smo učinkovitost štirih komercialnih metod ekstrakcije DNA iz 3D celičnih kultur glioblastoma. Količino izolirane DNA smo merili spektrofotometrično, fluorimetrično in z metodo avtomatske elektroforeze. Rezultati kažejo, da so med metodami ekstrakcije lahko večkratne razlike v učinkovitosti in da je pomembna tudi izbira metode za merjenje količine DNA. Delo je potekalo v okviru mednarodnega projekta GenomeMET, katerega namen je razviti meroslovno podporo za genomsko profiliranje in tako podpreti zgodnje odkrivanje raka ter precizno medicino.

Uvod

Glioblastom je najpogostejši primarni maligni tumor možganov pri odraslih in predstavlja približno 49 % vseh malignih možganskih tumorjev. Kljub napredku v zdravljenju je mediana preživetja bolnikov z glioblastomom še vedno nizka, kar poudarja potrebo po poglobljenem razumevanju patofiziologije in iskanju novih terapevtskih tarč.^{1,2} V raziskavah raka se kot modeli za preučevanje molekularnih mehanizmov pogosto uporabljajo celične kulture. Dvodimenzionalne (2D) celične kulture so že dolgo uveljavljene kot modeli *in vitro*, vendar ne posnemajo tridimenzionalnega (3D) okolja tumorjev. 3D celične kulture, kot so sferoidi in organoidi, ponujajo bolj realistično predstavitev celičnih interakcij in mikrookolja, kar je ključno za razumevanje celičnega vedenja in odziva na zdravljenje.^{3,4}

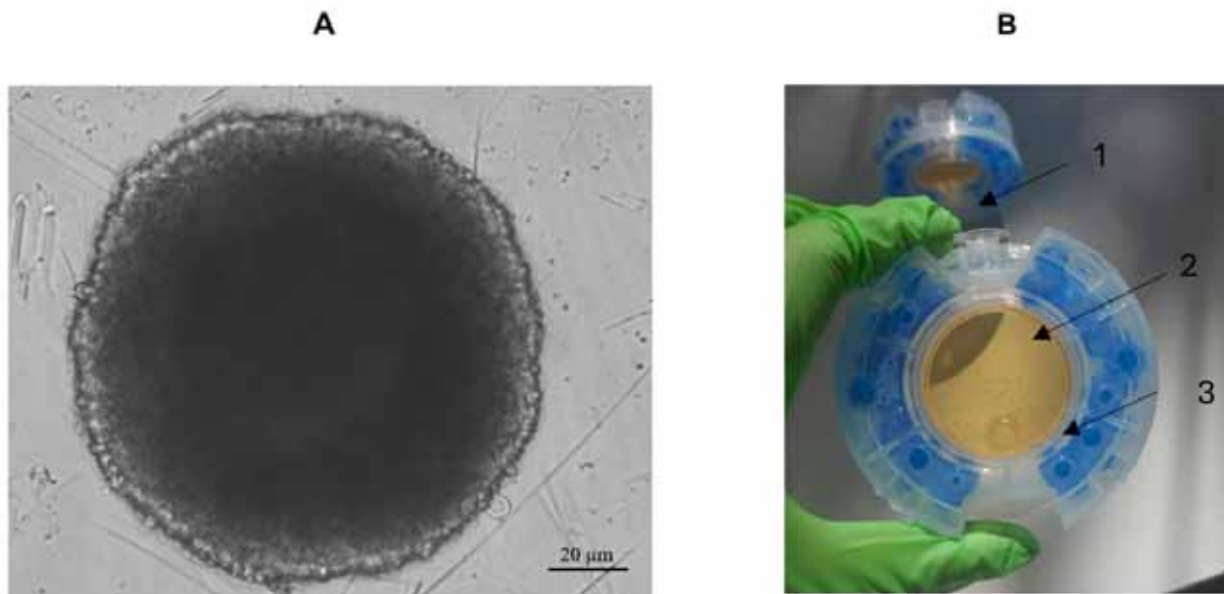
Tako za proučevanje molekularnih mehanizmov kot za molekularno diagnostiko je izolacija DNA iz vzorcev eden ključnih korakov v analizi, saj količina in kakovost DNA neposredno vplivata na nadaljnje korake kot sta sekvenciranje ali PCR in na zanesljivost končnih rezultatov. Zadostna količina DNA ustrezne kakovosti je še posebej pomembna v diagnostiki raka, kjer je potrebno zaznati izjemno majhne količine tumorske DNA, ki kroži v krvi (cirkulirajoča tumorska DNA ali ctDNA). Če je izolacija neustrezna, lahko te redke označevalce spregledamo, kar vodi do napačne diagnoze ali nepravilne ocene učinkovitosti zdravljenja. Kljub temu se pomembnost kakovostne ekstrakcije DNA še vedno premalo upošteva tako diagnostiki kot v raziskavah.

V okviru mednarodnega projekta *Metrology for genomic profiling to support early cancer detection and precision medicine*, na kratko GenomeMET⁵, razvijamo meroslovno podporo za genomsko profiliranje. Med drugim razvijamo potencialni referenčni merilni postopek za določanje količine in kvalitete DNA izolirane iz tkiva tumorja ali tekočinske biopsije. V postopku vrednotenja je metoda na osnovi digitalnega PCR (dPCR), s katero lahko sočasno določamo število kopij petih humanih referenčnih genov v vzorcu in s tem zelo natančno določimo količino oziroma koncentracijo DNA. S to metodo bomo lahko bolje ocenili zanesljivost drugih metod, ki se uporabljajo za merjenje celokupne DNA kot so fluorimetrične in spektrofotometrične metode in metode avtomatizirane elektroforeze. Za ta namen smo pripravili večje količine celičnih 3D kultur, iz katerih smo DNA izolirali s štirimi različnimi ekstrakcijami in količino izolirane DNA izmerili s tremi različnimi pristopi.

Metode

Priprava 3D sferoidov glioblastomske celične linije

3D sferoide smo pripravili s pomočjo sistema Celvivo. Za pripravo enega sferoida smo potrebovali 3×10^4 celic (primarna celična linija NIB140, pridobljena iz biopsije bolnika) v 100 μL . Pripravili smo 480 sferoidov v 5 mikrotiterskih ploščah s 96 vdolbinicami v obliki črke U. Po 3 dneh inkubacije na ploščah smo sferoide (Slika 1A) prenesli v ClinoReactor (Slika 1B). Po sedmih dneh smo po 10 sferoidov prenesli v 1,5 mL mikrocentrifugirko, ki ne veže DNA, jim odstranili medij in jih na hitro zmrznili. Tako pripravljene sferoide smo shranili na -80°C .



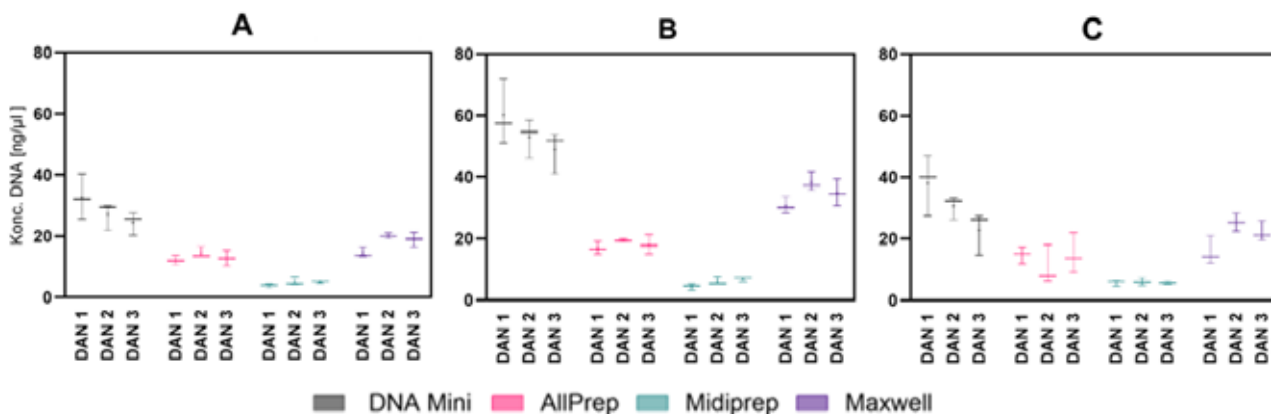
Slika 1: Priprava celičnih 3D kultur glioblastoma. A - Sferoid celične linije NIB140 pasaže 58 po 3 dneh inkubacije. Slika je bila posneta pri $100\times$ povečavi. Merilo slike: 20 μm . B - ClinoReactor. (1 - čep komore za celične kulture, 2 - komora za celične kulture (10 ml), 3- podporni komora z vlažilnimi kroglicami).

Primerjava metod izolacije DNA iz celičnih 3D kultur

Iz celičnih 3D kultur glioblastoma smo DNA izolirali s štirimi komercialno dostopnimi kompleti za ekstrakcijo DNA. Uporabili smo komplete QIAamp DNA Mini (QIAGEN), (v nadaljevanju: DNA mini); AllPrep DNA/RNA Mini (QIAGEN) (v nadaljevanju: AllPrep); Quick –DNA MidiPrep Plus (ZYMO Research) (v nadaljevanju: Midiprep) in Maxwell[®] RSC Whole Blood DNA (Promega) (v nadaljevanju: Maxwell). Vsako od štirih ekstrakcijskih metod smo izvedli v treh različnih dnevih, vsak dan v treh tehničnih ponovitvah (skupno 9 ponovitev). Za določanje količine izolirane DNA smo uporabili tri komplementarne metode: fluorometrično metodo (Qubit, Thermo Fisher Scientific), spektrofotometrično metodo (NanoDrop, Thermo Fisher Scientific) ter avtomatizirano elektroforezo (TapeStation, Agilent).

Rezultati

Rezultati kažejo, da so med metodami ekstrakcije lahko večkratne razlike v učinkovitosti. Z metodo DNA mini smo iz celičnih 3D kultur izolirali vsaj petkrat več DNA kot z metodo Midiprep. Poleg tega na Sliki 2 vidimo, da so pri posamezni ekstrakciji lahko skoraj dvakratne razlike tako med tehničnimi ponovitvami kot med različnimi dnevi. Pri metodi Maxwell je bila pri meritvah z avtomatsko elektroforezo (Slika 2C) na dan 1 najnižja izmerjena koncentracija 12 $\text{ng}/\mu\text{l}$, najvišja pa 21 $\text{ng}/\mu\text{l}$, povprečna koncentracija DNA na dan 1 je bila 15,7 $\text{ng}/\mu\text{l}$, najvišja pa 25,3 $\text{ng}/\mu\text{l}$ na dan 2.



Slika 2: Primerjava metod izolacije DNA iz celičnih 3D kultur NIB140 pri različnih dnevih. A- Metoda kvantifikacije: fluorimetrične meritve (Qubit), B- spektrofotometrične meritve (NanoDrop), C- meritve z avtomatsko elektroforezo (TapeStation). Posamezne metode izolacije so barvno označene: sivo (DNA Mini), roza (AllPrep), cian (Midiprep) in vijolično (Maxwell). Ekstrakcijske metode smo izvedli v 3 različnih dnevih in v 3 tehničnih ponovitvah (skupno 9 ponovitev). Grafičen prikaz je bil narejen v programu GraphPad Prism 10.4.1.

Rezultati kažejo tudi, da je pomembna tudi izbira metode za merjenje količino DNA. V naši raziskavi smo s spektrofotometričnimi meritvami pri vseh metodah izolacije z izjemo Midiprep izmerili do dvakrat višje količine DNA kot s fluorimetričnimi meritvami in z meritvami s sistemom za avtomatsko elektroforezo (Tabela 1).

Tabela 1: Povprečna koncentracija DNA in koeficient variabilnosti (CV) različnih metod ekstrakcije DNA iz 3D celičnih linij izmerjenih s fluorimetričnimi meritvami (Qubit), spektrofotometričnimi meritvami (NanoDrop) in meritvami s sistemom za avtomatsko elektroforezo (TapeStation). Povprečna vrednost je izračunana za 9 izolacij (3 tehnične ponovitve v treh dneh).

Metoda izolacije	QUBIT		NANODROP		TAPESTATION	
	DNA (ng/μl)	CV (%)	DNA (ng/μl)	CV (%)	DNA (ng/μl)	CV (%)
DNA Mini	28,1	21,2	54,0	16,1	30,5	30,0
AllPrep	13,1	15,8	18,1	12,4	13,5	38,3
Midiprep	4,7	22,2	5,8	25,7	5,9	15,0
Maxwell	17,8	16,4	34,6	13,0	20,6	26,4

Nenazadnje je pomembna tudi kombinacija metode za izolacijo in metode za merjenje koncentracije DNA. Pri meritvah koncentracije DNA izolirane z metodo AllPrep smo največjo variabilnost opazili pri metodi za avtomatsko elektroforezo (CV = 38,3 %), najmanjšo pa pri spektrofotometričnih meritvah (CV = 12,4 %).

Na podlagi rezultatov naše raziskave, lahko trdimo, da se je komplet DNA Mini izkazal kot najučinkovitejša metoda za izolacijo DNA iz 3D celičnih kultur. Potrdili smo tudi, da so med uporabljenimi metodami za določanje koncentracije lahko velike razlike.^{6,7} Naša raziskava je pokazala, da je preverjanje učinkovitosti ekstrakcijskih metod ključnega pomena za zagotavljanje zanesljivih rezultatov analiz DNA. Izolirano DNA bomo analizirali še z metodo dPCR za sočasno določanje

števila kopij petih humanih referenčnih genov, kjer pričakujemo bolj natančne podatke o učinkovitosti in ponovljivosti metod za izolacijo DNA in dodatne podatke o zanesljivosti metod za merjenje celokupne DNA.

Zahvala

Raziskava je potekala v okviru projekta GenomeMET, ki je prejel finančna sredstva iz Evropskega partnerstva za meroslovje, ki ga sofinancirajo program Evropske unije za raziskave in inovacije Obzorje Evropa ter sodelujoče države.

Literatura

1. Upadhyay A. Cancer: An unknown territory; rethinking before going ahead. *Genes Dis.* 2020,8(5), 655-661.
2. Gilard V, et al. Diagnosis and Management of Glioblastoma: A Comprehensive Perspective. *Journal of Personalized Medicine.* 2021, 11(4), 258.
3. Kim JB: Three-dimensional tissue culture models in cancer biology. *Semin Cancer Biol.* 2005, 15(5), 365-377.
4. Mehta G, et al. Opportunities and challenges for use of tumor spheroids as models to test drug delivery and efficacy. *J Control Release.* 2012, 164(2), 192-204.
5. <https://www.genomemet.org/>
6. Willis A, et al. Quantity, integrity & purity: A comparative study of different genomic DNA assessment methods. *Human Immunology.* 2018, 79:133-134.
7. Masago K, et al. Comparison between Fluorimetry (Qubit) and Spectrophotometry (NanoDrop) in the Quantification of DNA and RNA Extracted from Frozen and FFPE Tissues from Lung Cancer Patients: A Real-World Use of Genomic Tests. *Medicina (Kaunas).* 2021, 57(12):1375.



VNETNI DEJAVNIKI KOT OZNAČEVALCI ODGOVORA NA ZDRAVLJENJE Z OBSEVANJEM PRI DUKTALNEM KARCINOMU *IN SITU*

Tanja Marinko^{1,2}, Manca Pirc², Špela Plestenjak², Maja Marinčič³, Vita Dolžan³, Katja Goričar³

¹ Onkološki inštitut Ljubljana, Ljubljana, Slovenija

² Medicinska fakulteta, Univerza v Ljubljani, Ljubljana, Slovenija

³ Inštitut za biokemijo in molekularno genetiko, Medicinska fakulteta, Univerza v Ljubljani, Ljubljana, Slovenija

Elektronski naslov: katja.goricar@mf.uni-lj.si

4

Izvleček

Obsevanje je del standardnega zdravljenja bolnic z duktalnim karcinomom *in situ*, vendar med bolnicami obstajajo razlike v odgovoru na zdravljenje in pojavu neželenih učinkov. K temu lahko prispeva tudi vnetni odziv, saj se pri obsevanju spremeni izražanje različnih protivnetnih in provnetnih dejavnikov. Eden od ključnih citokinov je transformirajoči rastni faktor beta (TGF- β), ki ima pomembno vlogo pri vzdrževanju homeostaze v tkivih.

Rezultati naše raziskave kažejo, da se koncentracija TGF- β 1 v plazmi pri bolnicah z DCIS po obsevanju bistveno ne spremeni. Po drugi strani pa genetski dejavniki vplivajo na koncentracijo TGF- β v plazmi, prav tako pa so povezani s pojavom neželenih učinkov obsevanja na koži. TGF- β bi lahko služil kot biološki označevalec odgovora na obsevanje, kar bi lahko prispevalo k bolj prilagojenemu zdravljenju raka dojk.

Uvod

Duktalni karcinom *in situ* (DCIS) je neinvazivna oblika raka dojk, kjer pride do spremenjene proliferacije epitelijskih celic. DCIS najpogosteje odkrijemo z mamografijo v okviru presejalnih programov za odkrivanje raka dojk.¹ Pojavnost DCIS se povečuje in predstavlja kar okoli 25 % na novo odkritih primerov raka dojk in 35 % primerov raka dojk, odkritih v sklopu presejalnih programov.²

DCIS ima običajno zelo dobro prognozo, vendar pa lahko v okoli 40 % pride do ponovitve bolezni, pri čemer se rak v polovici primerov ponovi kot invazivni rak dojk.³ Glavni cilj zdravljenja je tako preprečevanje napredovanja DCIS v invazivni karcinom. Standardno zdravljenje DCIS vključuje ohranitveno operacijo in dopolnilno obsevanje. Obsevanje za 50 % zmanjša število lokalnih ponovitev bolezni, ne vpliva pa statistično značilno na preživetje bolnic.¹⁻³

Po obsevanju se lahko pri številnih bolnicah pojavijo akutni ali pozni neželeni učinki. Akutni neželeni učinki se pojavijo v prvih treh mesecih po obsevanju, najpogosteje na koži. Večinoma so te spremembe reverzibilne, lahko pa pomembno vplivajo tako na potek zdravljenja kot na kakovost življenja bolnic. Po drugi strani pa so pozni neželeni učinki, ki se lahko pojavijo več mesecev ali let po obsevanju, pogosto ireverzibilni.⁴ Ker trenutno še ni možno zanesljivo napovedati, pri katerih bolnicah bo prišlo do napredovanja bolezni, prilagajanje zdravljenja z obsevanjem posameznim bolnicam z DCIS še ni mogoče, tako da so lahko nekatere bolnice zdravljene preveč agresivno.² Novejše raziskave pa so že pokazale, da bi lahko k boljšemu prilagajanju zdravljenja pripomogla kombinacija kliničnih in molekularnih dejavnikov.³ Pomembno vlogo pri spremljanju odgovora na zdravljenje z obsevanjem ima tudi tekočinska biopsija. Ta omogoča spremljanje molekularnih značilnosti tumorskega tkiva, kot so cirkulirajoča tumorska DNA, proteini ali cirkulirajoče tumorske celice, v bioloških tekočinah, predvsem v krvi.⁵

Na molekularni ravni lahko obsevanje neposredno poškoduje DNA, kar celici onemogoči nadaljnje delitve. Spodbuja tudi nastanek reaktivnih kisikovih spojin, ki prav tako prispevajo k poškodbam

različnih makromolekul. Poleg tega pa obsevanje vpliva tudi na imunski odziv, ki je odvisen od imunskega stanja bolnika ter lastnosti rakavih celic.⁶ Po eni strani obsevanje omogoča aktivacijo prirojenega imunskega odziva ter lažje prepoznavanje rakavih celic, po drugi strani pa lahko imunski odziv tudi zavira preko spodbujanja izločanja citokinov, kot sta na primer transformirajoči rastni faktor beta (TGF- β) ali interlevkin 10.^{6,7}

TGF- β je citokin, ki ima pomembno vlogo pri regulaciji proliferacije in vzdrževanju homeostaze v tkivih.^{6,8} Poznamo tri homologne oblike TGF- β , in sicer TGF- β 1, ki je najbolj pogosta, TGF- β 2 in TGF- β 3. Izražanje TGF- β je pri raku pogosto spremenjeno.⁹ TGF- β ima namreč dvojno delovanje: v normalnih celicah in v začetnih stopnjah karcinogeneze lahko deluje kot tumor supresor, saj sodeluje pri regulaciji celične rasti in apoptoze.⁶ V kasnejših fazah razvoja tumorja pa lahko deluje onkogeno, saj signalne poti TGF- β spodbujajo epitelijsko-mezenhimsko tranzicijo, angiogenezo, migracijo in metastaziranje številnih tumorjev.⁶ Povišano izražanje TGF- β pri DCIS bi lahko vplivalo na večjo verjetnost za napredovanje do invazivnega raka dojk.³ TGF- β predstavlja tudi potencialno tarčo za zdravljenje raka.¹⁰

TGF- β ima pomembno vlogo tudi pri odgovoru na obsevanje, saj obsevanje poveča njegovo izražanje in aktivacijo. Raziskave kažejo, da lahko TGF- β v različnih tkivih vodi tako v povečano ali pa zmanjšano občutljivost na obsevanje.⁸ Vpliva lahko tudi na pojav neželenih učinkov obsevanja, saj ima pomembno vlogo na primer pri razvoju fibroze tkiv.⁸

V raziskavi smo želeli preveriti, ali koncentracija TGF- β 1 v plazmi in polimorfizmi *TGFBI* vplivajo na pojav neželenih stranskih učinkov obsevanja na koži in srcu pri bolnicah z DCIS, zdravljenih s dopolnilnim obsevanjem.

Metode

Klinična raziskava

V prospektivno longitudinalno klinično raziskavo smo vključili bolnice z DCIS, zdravljene z ohranitveno operacijo in pooperativnim obsevanjem na Onkološkem inštitutu Ljubljana med letoma 2019 in 2024 v okviru redne klinične prakse. Vse bolnice so v raziskavo privolile prostovoljno in podale pisno soglasje. Raziskavo 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 zbrali vzorce krvi pred začetkom obsevanja in ob koncu obsevanja. Takoj po koncu obsevanja in eno leto po obsevanju smo pri bolnicah ocenili prisotnost neželenih učinkov na koži in na srcu. Za spremljanje neželenih učinkov na koži smo uporabili skupna terminološka merila za neželene učinke (Common Terminology Criteria for Adverse Effects v.5, CTCAE) in lestvico za neželene učinke LENT-SOMA (Late Effects in Normal Tissues/Subjective, Objective, Management and Analytic). Za spremljanje neželenih učinkov na srcu smo uporabili koncentracijo N-konca pro-B-tipa natriuretičnega peptida (NT-proBNP) v serumu in lestvico Newyorškega združenja za srce (New York Heart Association, NYHA) za oceno morebitnega srčnega popuščanja.

Molekularno-genetske metode

Genomsko DNA smo izolirali iz vzorcev periferne venske krvi, odvzetih pred začetkom obsevanja, s pomočjo komercialnega kompleta reagentov E.Z.N.A. SQ Blood DNA Kit II (Omega Bio-Tek) skladno z navodili proizvajalca. Za genotipizacijo polimorfizmov *TGFBI* rs1800469 (c.-1347T>C), rs1800470 (c.29C>G, p.Pro10Leu) in rs1800471 (c.74G>C, p.Arg25Pro) smo uporabili kompetitivni alelni specifični PCR (KASP, LGC Biosearch Technologies).

Za določanje koncentracije proteina TGF- β 1 v plazmi pred obsevanjem in po zaključku obsevanja smo uporabili encimsko-immunski test (ELISA) (TGF-beta 1 Human ELISA, Abcam Limited).

Statistična analiza

Za opis zveznih spremenljivk smo uporabili mediano in interkvartilni razpon (25 %-75 %), za opis kategoričnih spremenljivk pa frekvence. Ker zvezne spremenljivke niso bile normalno porazdeljene, smo za nadaljnje analize uporabili neparametrične teste: Mann-Whitneyev in Kruskal-Wallisov test za neodvisne vzorce ter Wilcoxonov test za odvisne vzorce. Za analizo vplivov na pojav neželenih učinkov obsevanja smo uporabili univariatno in multivariatno logistično regresijo, kjer smo izračunali smo razmerje obetov (RO) in 95 % interval zaupanja (IZ). Za izvedbo statistične analize smo uporabili program IBM SPSS Statistics 29.0 (IBM Corporation).

Rezultati

V raziskavo smo vključili 199 bolnic z DCIS, zdravljenih z operacijo in dopolnilnim obsevanjem, z mediano starostjo 56 (50-63) let. Takoj po obsevanju je o kateremkoli neželenem učinku na koži gradusa 2 ali več po uporabljenih lestvicah poročalo manj kot 10 % bolnic (kriteriji CTCAE: 12 bolnic, 6,4 %; kriteriji LENT-SOMA: 17 bolnic, 9,2 %), po enem letu pa je bilo takih neželenih učinkov precej več (kriteriji CTCAE: 34 bolnic, 20,4 %; kriteriji LENT-SOMA: 51 bolnic, 30,5 %). Delež bolnic z razredom 2 po lestvici NYHA je bil v obeh časovnih točkah nizek (4,2 %). Povišane vrednosti NT-proBNP po obsevanju so bile prisotne pri 41 (21,0 %) bolnicah.

Mediana koncentracije TGF- β 1 v plazmi se pred in po obsevanju ni pomembno razlikovala: vrednost pred obsevanjem je bila 19,4 (13,1-28,2) ng/ml, po obsevanju pa 18,5 (13,7-26,9) ng/ml ($P = 0,105$).

Frekvenca redkejšega alela je bila 32,2 % za rs1800469, 42,0 % za rs1800470 in 8,5 % za rs1800471. Nosilke vsaj enega polimorfnega alela *TGFBI* rs1800469 so imele višjo koncentracijo TGF- β 1 v plazmi pred obsevanjem (21,9 ng/ml proti 18,5 ng/ml, $P = 0,021$). Preostala polimorfizma nista bila povezana s koncentracijo TGF- β 1 pri bolnicah z DCIS.

Nosilke dveh polimorfni alelov *TGFBI* rs1800469 so imele večjo verjetnost za pojav neželenih učinkov na koži po kriterijih LENT SOMA takoj po obsevanju (RO = 4,82; 95 % IZ = 1,26–18,52; $p = 0,022$), tudi po prilagoditvi za klinične dejavnike (RO = 7,65; 95 % IZ = 1,79–32,71; $p = 0,006$). Nosilke enega polimorfnega alela *TGFBI* rs1800470 so imele manjšo verjetnost za pojav neželenih učinkov na koži po lestvici kriterijih CTCAE eno leto po obsevanju (RO = 0,40; 95 % IZ = 0,16–0,97; $p = 0,043$), vendar povezava v multivariatni analizi ni bila več statistično značilna ($p = 0,055$). Ostale povezave med polimorfizmi *TGFBI* ali koncentracijo TGF- β 1 v plazmi in neželenimi učinki niso bile statistično značilne.

Razprava in zaključek

Rezultati naše raziskave so pokazali, da se koncentracija TGF- β 1 pri bolnicah z DCIS po obsevanju bistveno ne spremeni. Po drugi strani pa so bili polimorfizmi *TGFBI* povezani s koncentracijo TGF- β v plazmi in s pojavom neželenih učinkov obsevanja na koži.

Zaradi pomembne vloge v karcinogenezi in pri odgovoru na zdravljenje so v predhodnih raziskavah že preučevali koncentracijo TGF- β 1 pri bolnicah z rakom dojke. V posameznih raziskavah na manjšem številu bolnic z zgodnjim rakom dojke so opazili minimalno znižanje koncentracije takoj po obsevanju.^{11,12} V naši raziskavi so bile absolutne vrednosti koncentracije TGF- β 1 primerljive z omenjenimi raziskavami, smo pa na večji skupini pokazali, da po obsevanju ni večje razlike v koncentraciji TGF- β 1 v plazmi. Prav tako koncentracija TGF- β 1 pred obsevanjem ni bila povezana s pojavom akutnih ali neželenih učinkov zdravljenja. Dosedanje raziskave so sicer pokazale, da je koncentracija TGF- β 1 v serumu višja pri bolnicah z rakom dojke, pri katerih se pojavi fibroza, vendar pa so razlike bolj izrazite več mesecev po obsevanju¹³, kar nakazuje, da so na tem področju potrebne nadaljnje longitudinalne raziskave. Na koncentracijo TGF- β 1 v plazmi lahko vplivajo tudi genetski dejavniki. V naši raziskavi smo potrdili, da je polimorfizem *TGFBI* rs1800469, ki se nahaja v promotorski regiji in lahko vpliva na vezavo transkripcijskih dejavnikov, povezan z višjo koncentracijo

TGF- β 1 v plazmi, kar se sklada z dosedanjimi raziskavami.¹⁴ Po drugi strani polimorfizma *TGFB1* rs1800470 in rs1800471, ki privedeta do spremembe aminokislina, nista vplivala na koncentracijo TGF- β 1 v plazmi, kar prav tako potrjuje rezultate predhodnih raziskav.¹⁵

Nosilke dveh polimorfni alelov *TGFB1* rs1800469 so imele večjo verjetnost za razvoj neželenih učinkov na koži takoj po obsevanju, ne pa tudi po enem letu, medtem ko so imele nosilke enega polimorfne alela rs1800470 manjšo verjetnost za pojav neželenih učinkov na koži le eno leto po obsevanju. Rezultati dosedanjih raziskav o povezavi polimorfizmov *TGFB1* z neželenimi učinki obsevanja se med seboj precej razlikujejo¹⁶, vendar pa je bil skladno z našimi rezultati predvsem rs1800469 pogosto povezan z neželenimi učinki obsevanja na koži.¹⁷ Razlike med posameznimi raziskavami bi lahko bile povezane s tem, da ima TGF- β 1 pomembno vlogo v številnih celičnih procesih in je njegova vloga kompleksna. Obenem pa so predhodne raziskave pogosto vključevale bolnike, ki so prejeli različne kombinacije zdravljenja, primanjkuje pa raziskav, kjer bi vključili le bolnice z DCIS, ki ne prejema sistemskih terapij, na kar smo se osredotočili v naši raziskavi.

TGF- β 1 bi torej lahko služil kot biološki označevalec odgovora na obsevanje, kar bi lahko prispevalo k bolj prilagojenemu zdravljenju raka dojke, vendar pa so za natančnejšo pojasnitev njegove vloge potrebne dodatne proaktivne raziskave.

Zahvala

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

Raziskovalna sredstva: ARIS J3-60064, J3-1753, J3-2527 in P1-0170; OI-3-24.

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): p. 33.
2. Farante G, et al., Advances and controversies in management of breast ductal carcinoma in situ (DCIS). *Eur J Surg Oncol*, 2022. 48(4): p. 736-741.
3. Wang J, et al. Progression from ductal carcinoma in situ to invasive breast cancer: molecular features and clinical significance. *Signal Transduct Target Ther*, 2024. 9(1): p. 83.
4. De Ruysscher D, et al. Radiotherapy toxicity. *Nat Rev Dis Primers*, 2019. 5(1): p. 13.
5. De Michino S, et al. The Utility of Liquid Biopsies in Radiation Oncology. *Int J Radiat Oncol Biol Phys*, 2020. 107(5): p. 873-886.
6. Lyu S, et al. The prognostic and predictive value of peripheral immune-related proteins in patients with lung cancer treated with radiotherapy. *Front Oncol*, 2025. 15: p. 1625212.
7. Zheng Z, et al. Mechanisms and applications of radiation-induced oxidative stress in regulating cancer immunotherapy. *Front Immunol*, 2023. 14: p. 1247268.
8. Wang J, et al. TGF-beta signaling in cancer radiotherapy. *Cytokine*, 2021. 148: p. 155709.
9. Haque, S. and J.C. Morris, Transforming growth factor- β : A therapeutic target for cancer. *Hum Vaccin Immunother*, 2017. 13(8): p. 1741-1750.
10. Deng, Z., et al., TGF- β signaling in health, disease, and therapeutics. *Signal Transduct Target Ther*, 2024. 9(1): p. 61.
11. Hosseini SM, et al. The comparison of transforming growth factor beta-1 serum levels in early-stage breast cancer patients treated with external beam whole breast irradiation plus boost versus interstitial brachytherapy accelerated partial breast irradiation. *Brachytherapy*, 2022. 21(6): p. 748-753.
12. Aula H, et al. Transforming growth factor beta 1 levels predict echocardiographic changes at three years after adjuvant radiotherapy for breast cancer. *Radiat Oncol*, 2019. 14(1): p. 155.
13. Boothe DL, et al. Transforming growth factor β -1 (TGF- β 1) is a serum biomarker of radiation induced fibrosis in patients treated with intracavitary accelerated partial breast irradiation: preliminary results of a prospective study. *Int J Radiat Oncol Biol Phys*, 2013. 87(5): p. 1030-6.
14. Martellosi Cebinelli GC, et al. TGF- β 1 functional polymorphisms: a review. *Eur Cytokine Netw*, 2016. 27(4): p. 81-89.
15. Taubenschuß E, et al. The L10P polymorphism and serum levels of transforming growth factor β 1 in human breast cancer. *Int J Mol Sci*, 2013. 14(8): p. 15376-85.
16. Barnett GC, et al. Individual patient data meta-analysis shows no association between the SNP rs1800469 in TGFB and late radiotherapy toxicity. *Radiother Oncol*, 2012. 105(3): p. 289-95.
17. Grossberg AJ, et al. Association of Transforming Growth Factor β Polymorphism C-509T With Radiation-Induced Fibrosis Among Patients With Early-Stage Breast Cancer: A Secondary Analysis of a Randomized Clinical Trial. *JAMA Oncol*, 2018. 4(12): p. 1751-1757.

DD CELL-TOX CELL VIABILITY METHOD: FINDING A DIRECT AND DYNAMIC METHOD FOR A DYNAMIC PROCESS

Eneko Madorran

Medicinska Fakulteta, Univerza v Mariboru, Maribor, Slovenija

E-mail: eneko.madorran@um.si

Abstract

When cells encounter toxic substances, they initiate a cascade of signaling responses. However, conventional *in vitro* toxicity assessment methods primarily focus on cell viability, typically inferred from metabolic activity. To address this limitation, I have developed a novel cell-based toxicity assay that captures a broader spectrum of cellular behaviors—namely cell death, proliferation, and survival—upon exposure to toxic agents.

By analyzing the collective responses of the cell population, I was able to observe and predict dynamic changes that reflect the toxic potential of various compounds. This method was evaluated under two distinct experimental setups. In the first, a monoculture of blood-derived macrophages was exposed to UV radiation, hydrogen peroxide, nutrient deprivation, tetrabromobisphenol A, fatty acids, and 5-fluorouracil. In the second, a liver coculture model—comprising hepatocytes, hepatic stellate cells, Kupffer cells, and liver sinusoidal endothelial cells—was treated with rifampicin, ibuprofen, and 5-fluorouracil.

This approach demonstrated strong concordance with established toxicity assays, while offering more nuanced insights into compound effects by accounting for diverse cellular responses. Given its innovative nature, this method holds promise for broader application across various biological contexts and should be further validated in future studies. Moreover, holds particular promise for viability assessment in liquid biopsy samples, as it enables precise evaluation of cell population dynamics of the sample.

Introduction

Cell death is a highly dynamic process governed by multiple distinct pathways—such as apoptosis, necroptosis, and ferroptosis—each eliciting unique cellular responses. These pathways consist of numerous subroutines, driven by overlapping molecular mechanisms, and typically unfold over a period of 3 to 48 hours, culminating in cell death. Interestingly, during this window, cells retain the ability to reverse the death process through a phenomenon known as anastasis, which can be initiated at various stages until the point of irreversible commitment.

Moreover, certain cell death pathways are accompanied by the release of cytokines that stimulate the proliferation of neighboring cells, either of the same or different types. This regenerative mechanism, known as compensatory proliferation, plays a critical role in maintaining tissue homeostasis following cellular loss.

When a toxic agent is introduced into a cell population, the cells may undergo one of three outcomes: death, survival, or division. Therefore, assessing compound toxicity using cell models can be misleading if these diverse outcomes are not fully accounted for. For instance, a population may restore its cell count after an initial decline due to toxic exposure, and may retain its functional integrity post-recovery.

To address this limitation, I propose a novel toxicity assessment method that integrates all three cellular outcomes—death, survival, and proliferation—into a unified framework. By analyzing these responses, I was able to observe and predict cell population dynamics, thereby providing a more accurate measure of a compound's toxic potential.

To evaluate the robustness and applicability of this method, I conducted experiments using two distinct model systems. In the first, a monoculture of blood-derived macrophages was exposed to

various toxic agents. In the second, a liver coculture model—comprising hepatocytes, hepatic stellate cells, Kupffer cells, and liver sinusoidal endothelial cells—was treated with a range of hepatotoxic compounds. These complementary setups allowed for a comprehensive assessment of the method's performance across different cellular environments.

Materials and Methods

Cells

Human Blood Macrophages (TLT)

TLT macrophages were isolated from the blood of a healthy donor at the University of Maribor (Maribor, Slovenia). Cells were cultured in colorless Williams E medium (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA) supplemented with 5% fetal bovine serum (Gibco), 2 mM L-glutamine (Sigma), 100 U/ml penicillin (Sigma), and 1 mg/ml streptomycin (Fluka, Switzerland). Cultures were maintained in 25 cm² flasks (Corning, USA) at 37 °C in a humidified atmosphere with 5% CO₂.

Liver Coculture Model

A multicellular liver model was established by coculturing liver sinusoidal endothelial cells (LSEC), human stellate cells (HSC), and Kupffer cells (non-parenchymal liver cells, NPC) obtained from ZEN-BIO (USA) with hepatocytes from Lonza (Switzerland). NPCs and hepatocytes were initially cultured separately in 25 cm² flasks (NUNC, Denmark) under standard conditions (37 °C, 5% CO₂) before seeding together into 96-well microplates (NUNC) to create the coculture model.

Chemicals

MTT (3-(4,5-dimethylthiazole-2-yl)-2,5-phenyl tetrazolium bromide) was purchased from Sigma-Aldrich (USA). Phosphate-buffered saline (PBS), FluoVolt™ (FV) Membrane Potential Kit, Vybrant™ DyeCycle™ Ruby, and propidium iodide (PI) were from Thermo Fisher Scientific (USA). Hydrogen peroxide (30%), tetrabromobisphenol A (TBBPA), rifampicin (RIF), ibuprofen (IBU), and 5-fluorouracil (5-FU) were obtained from Merck KGaA (Germany). Fatty acids (FA) were prepared via oil digestion with lipase (Merck KGaA).

DD-Cell-Tox Protocol

Cells were incubated under controlled conditions and stained with FluoVolt™ to assess membrane potential—a key marker of viability—and Vybrant™ DyeCycle™ Ruby to measure DNA content and nuclear morphology (Figure 1 and 2). Cells were classified as:

- Duplicating – transiently depolarized with elevated DNA content (2n)
- Viable – resting or transiently depolarized with normal DNA content (1n)
- Dead – depolarized with ≤ 1n DNA content

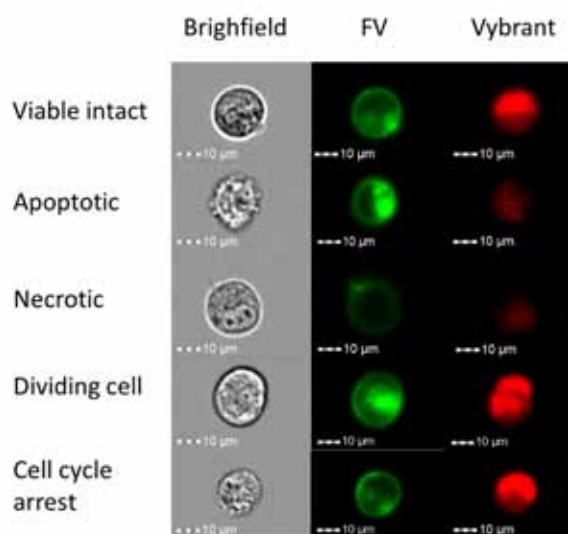
Experiments were performed in duplicate, with measurements taken 1 h apart to reduce variability from transient depolarization. Cell counts were integrated into a population-dynamics model, predicting net changes over time by adding dividing cells and subtracting dead cells. This approach yields a dynamic toxicity profile that captures not only cell loss but also regenerative and compensatory responses.

Testing – Monoculture Model

TLT cells were seeded in two 96-well plates and grown to full confluency. One plate was treated for 24 h with 12.5 mM H₂O₂, 266 μM TBBPA, 500 μM 5-FU, nutrient deprivation, or 15 μl FA. The other plate was exposed to UV light for 5 min. Viability was assessed using the DD-Cell-Tox method, PI assay, and MTT assay. After treatment, fresh medium was added, and viability was re-evaluated using a direct cell-count method for comparison.

Testing – Liver Coculture Model

Hepatocytes (20,000/well) and NPCs (5,000/well) were seeded in Hep medium after reaching confluency in separate cultures. Cultures were exposed to 50 μM RIF, 1 mM IBU, or 500 μM 5-FU. Medium was refreshed after 2 days, and viability was measured on day 5 using the DD-Cell-Tox method. Results were compared to reported clinical toxicity data from the literature.



5

Figure 1. Schematic representation of cellular outcome determination as detected by the DD Cell-Tox method.

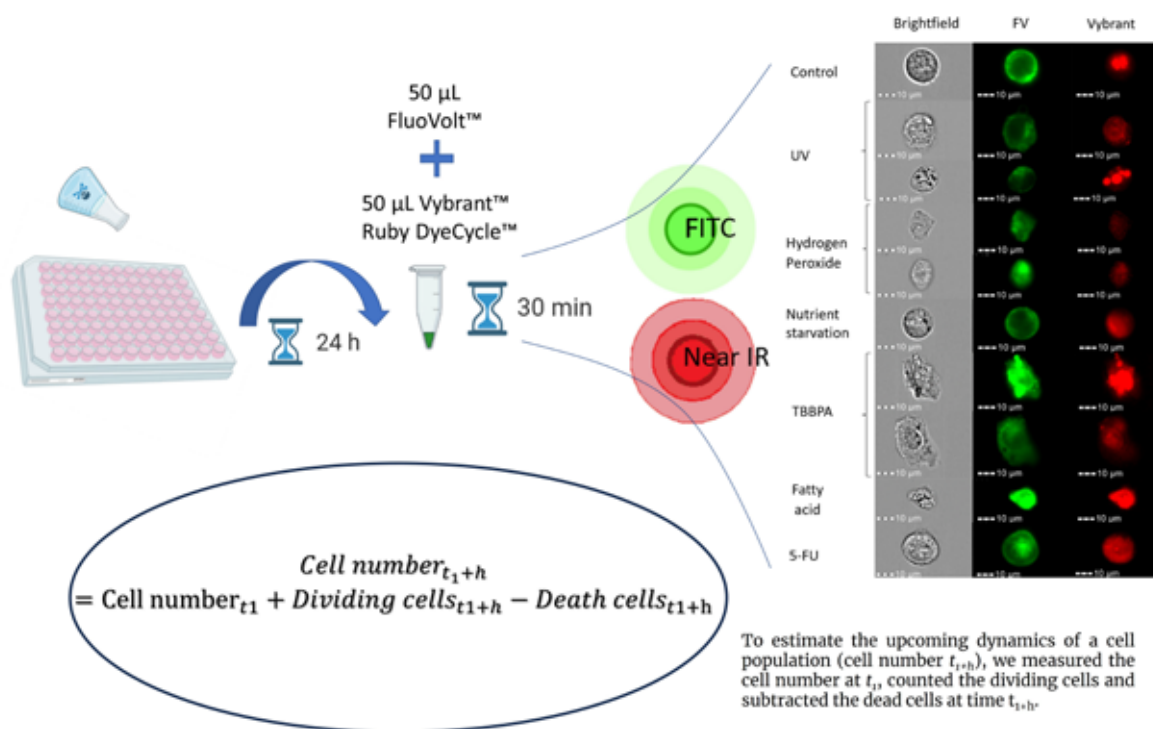


Figure 2. Protocol for the DD cell viability method.

Results and Discussion

Cell populations continually undergo death and division to maintain organ homeostasis. Consequently, assessing viability at a single time point does not fully capture population dynamics.

Cells initially classified as dead may recover and even stimulate neighbouring cell proliferation, potentially leading to false-positive results. This limitation can be mitigated by evaluating viability using a method that incorporates cell population dynamics.

To estimate imminent dynamics at a future point (t_{1+h}), I calculated:

$$\text{Cell number}_{t_{1+h}} = (\text{Cell number}_{t_1} - \text{Cell number}_{t_0}) + \text{Dividing cells}_{t_1} - \text{Dead cells}_{t_1}$$

Most cell death pathways last up to 48 h, while typical cell division occurs over 24 h. Proliferative signals triggered by programmed cell death often arise within 6 h. Thus, 24–48 h after exposure to a toxicant, most cells will have either died, maintained viability, or divided. In heterogeneous populations, some cell types may die while others proliferate—an effect that is particularly striking in complex liver models, where dying hepatocytes (~80% of liver mass) can induce fibroblast proliferation. By considering all possible outcomes, the DD-Cell-Tox method offers greater accuracy than conventional assays. In both a TLT monoculture and a 4-cell-type liver model, the method's predictions matched observed dynamics with high accuracy.

In the monoculture experiments, 12.5 mM H_2O_2 was expected to induce necroptosis, while 266 μM TBBPA and 500 μM 5-FU were predicted to trigger apoptosis. Nutrient starvation induced autophagic cell death, FA addition initiated ferroptosis, and UV exposure provoked parthanatos/apoptosis. As expected, all treatments reduced viability initially. However, 24 h after medium replacement, nutrient-deprived and 5-FU-treated cells showed increased proliferation. Nutrient replenishment redirected cells from autophagy to division, while 5-FU-treated cells reversed cell cycle arrest, re-entered the cell cycle, and proliferated—consistent with previous findings on reversible arrest mechanisms (Figure 3).

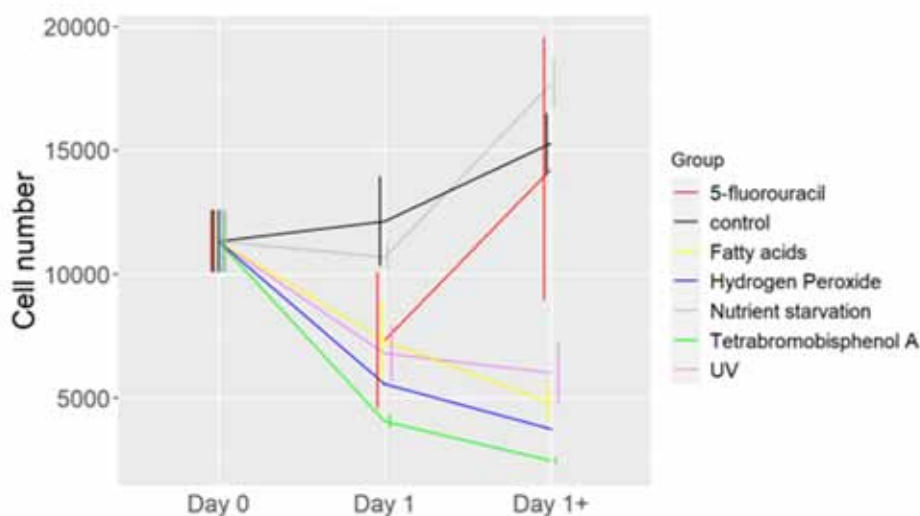


Figure 3: Cell viability assessment of blood macrophages treated with different toxic agents.

The untreated TLT control also displayed a relatively high death-to-division ratio, consistent with the expected turnover of confluent macrophage monolayers (doubling time \approx 20 h).

In the liver model, exposure to RIF, IBU, or 5-FU produced cell population dynamics consistent with clinical hepatotoxicity profiles. Neither RIF nor IBU showed measurable toxicity within the first week, reflecting their delayed mechanisms—RIF via CYP induction and toxic metabolite formation, IBU via metabolite accumulation during prolonged high-dose use. In contrast, 5-FU caused a measurable early reduction in cell number, consistent with its mechanism (thymidylate synthase inhibition and metabolite toxicity), and would be expected to cause greater damage with extended exposure (Figure 4).

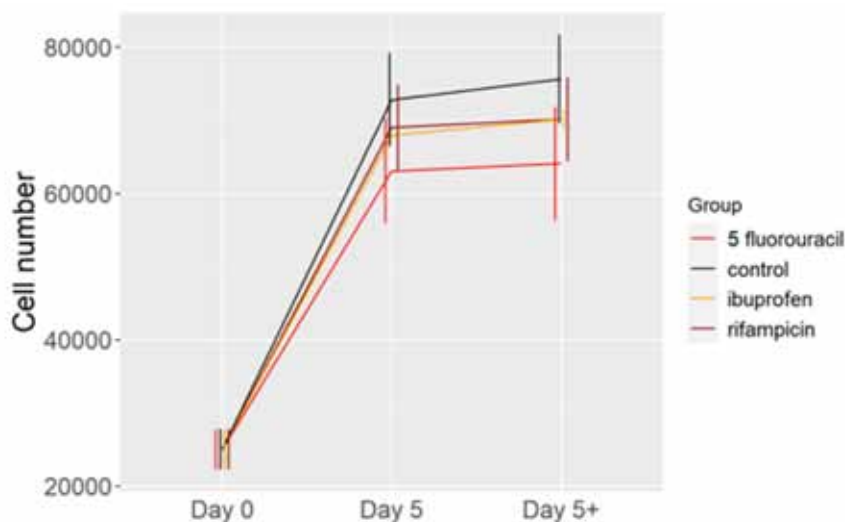


Figure 4: Cell viability assessment of the liver model treated with three different hepatotoxic drugs.

In addition, liquid biopsies often detect circulating tumor cells (CTCs), immune cells, or other rare cell types from blood or other fluids. These cells may be in different stages — dying, viable, or actively dividing. DD-Cell-Tox can classify them into these categories, revealing whether the population is shrinking, stable, or proliferating after treatment or over disease progression. Overall, the DD-Cell-Tox method was compatible with both simple and complex models, accurately capturing early death and proliferation events and enabling predictions over a 48-h window—the typical span for programmed cell death or division.

Highlights

- Provided higher accuracy than established viability assays under the tested conditions.
- Directly measures viability, avoiding reliance on indirect metabolic readouts.
- Integrates death, survival, and division for a comprehensive outcome profile.
- The DD Cell-Tox method holds particular promise for viability assessment in liquid biopsy samples, as it enables precise evaluation of cell population dynamics of the sample.

Limitations

Cells in early stages of death may still reverse course; such cases are not classified as dead until after the point of no return, which can lead to underestimation of imminent death events.

Conclusions

Cell viability should be evaluated as a dynamic parameter, reflecting changes over time rather than as a single static measurement. We recommend assessing the behaviour of an entire cell population, rather than its viability at an isolated time point, to capture the true biological context. This is particularly relevant when testing potential anticancer compounds, where distinct responses are expected between malignant and healthy cells following exposure. The DD-Cell-Tox method embraces this dynamic approach, integrating cell death, survival, and proliferation into a single viability assessment. It has demonstrated reliability across multiple experimental setups, though further comparative studies are needed to validate its broader applicability. Importantly, this method holds strong potential for liquid biopsy applications, enabling precise evaluation of cell population dynamics in rare-cell samples and offering richer insight into therapeutic impact and disease progression.

CIRCULATING SIGNALS AS PREDICTIVE TOOLS IN CUTANEOUS SQUAMOUS CELL CARCINOMA: READY FOR THE CLINIC?

Andreja Pagon¹, Janja Ocvirk^{1,2}

¹ Medical faculty, University of Ljubljana, Ljubljana, Slovenia

² Institute of Oncology Ljubljana, Ljubljana, Slovenia

E-mail: andrejka.pagon@gmail.com

Abstract

Emerging evidence indicates that circulating tumor DNA, tumor cells, exosomal RNAs, immune ratios, soluble proteins, and epigenetic markers may serve as promising tools for disease monitoring, prognosis, and treatment response prediction in cutaneous squamous cell carcinoma (cSCC). This narrative review summarizes current research in the field. While these approaches could support personalized management and refine risk stratification, most studies are preliminary and limited by sensitivity, heterogeneity, and lack of standardization. Further prospective validation is needed before liquid biopsy can become part of routine care in cSCC.

Cutaneous squamous cell carcinoma (cSCC) is the second most common skin cancer and its incidence is rising globally.¹ Although most tumors are effectively treated with local measures, up to 5% progress to regional or distant metastasis.² The wide biological heterogeneity of cSCC (ranging from indolent lesions to aggressive, treatment-refractory disease) creates a need for better tools to identify high-risk patients, monitor treatment, and guide therapeutic decisions. Blood-based biomarkers could potentially offer a minimally invasive approach to address these challenges.

We gathered evidence from studies investigating circulating signals in cSCC (Table 1). Circulating tumor DNA (ctDNA) was the most studied marker. It correlated with tumor burden and declined after surgery or radiotherapy, making it useful for treatment monitoring. However, its sensitivity was limited in small tumors. Advanced sequencing approaches such as cancer personalized profiling by deep sequencing (CAPP-seq) have detected mutations in cell free DNA (cfDNA) that mirror tumor tissue and can even precede radiological relapse. Similarly, circulating tumor cells (CTCs) and tumor microemboli were detectable in a proportion of patients with advanced disease, suggesting potential for prognostic applications. Case reports further demonstrated that ctDNA profiling may uncover actionable mutations that guide therapy, such as BRCA2 alterations responsive to poly (ADP-ribose) polymerase (PARP) inhibitors.³⁻⁸

Exosome-associated biomarkers represent another promising group. Studies show that exosomal circular RNAs, long non-coding RNAs, and micro RNAs (miRNAs) may contribute to tumor growth and drug resistance, and their serum detection could support early diagnosis or predict treatment resistance.⁹⁻¹¹ Broader miRNA profiling has identified differentially expressed molecules between precancerous actinic keratosis and invasive cSCC, suggesting a role in early detection of malignant transformation.¹²

Systemic immune and inflammatory markers derived from blood are particularly appealing given their accessibility. Ratios such as neutrophil-to-lymphocyte (NLR) and platelet-to-lymphocyte (PLR) have been consistently associated with advanced disease, survival outcomes, and response to immunotherapy. More detailed immune profiling revealed elevated myeloid-derived suppressor cells, neutrophils, and T regulatory cells in aggressive disease, highlighting the immune dysregulation that supports tumor progression.¹³⁻¹⁹

Soluble proteins in serum have also been evaluated. Squamous cell carcinoma antigen (SCCA) was found to be elevated in advanced disease and declined during response to PD-1 blockade. Other

candidates include matrix metalloproteinase-13 (linked to invasiveness), complement factor H (a baseline predictor of progression under immunotherapy), and cytokines such as IL-8, which may serve as early pharmacodynamic markers of treatment efficacy. Serum metabolomic profiling has further suggested distinct metabolic signatures differentiating cSCC patients from healthy individuals.²⁰⁻²⁸

Finally, epigenetic and T-cell receptor-based approaches add a novel dimension. DNA methylation changes in circulating T cells, particularly of SERPINB9 and FOXP3, have been linked to increased risk and recurrence, especially in immunosuppressed transplant recipients. Functional immune signatures, such as hTERT-specific Th1 responses in cemiplimab-treated patients, have correlated with durable benefit, pointing toward future predictive assays.²⁹⁻³¹

Collectively, these findings underscore the potential of liquid biopsy in cSCC for disease detection, risk stratification, and monitoring therapy. However, most studies remain exploratory, often with small cohorts, heterogeneous methods, and variable performance. Major challenges include low sensitivity in early-stage disease, lack of methodological standardization, and the biological diversity of cSCC. Before these biomarkers can be integrated into routine clinical practice, prospective validation in large, well-characterized patient cohorts is essential. Nonetheless, current progress signals an important step toward personalized, biomarker-guided management of cSCC.

Table 1: Summary of included studies.

Authors	Cohort / Design	Biomarker & Method	Key Findings
Fan et al. ³	21 int/high-risk cSCC	ctDNA	78% positive in gross disease; cleared post-th → correlates with burden/response
Kim et al. ⁴	35 advanced cSCC	Personalized ctDNA	Sensitivity ~64%; reflects tumor stage, useful for monitoring
Sawamura et al. ⁵	4 metastatic cSCC	cfDNA via CAPP-seq	Mutational profile mirrored tissue; VAF ↑ before progression
Chang et al. ⁶	25 advanced cSCC, PD-1 th	ctDNA/tDNA NGS	8 gene muts in non-responders; PD-L1/TMB not predictive
Morosin et al. ⁷	10 nodal mets	CTCs (IsoFlux™)	CTCs in 80%, CTMs 30% → possible prognostic value
Sun et al. ⁸	Case (1 pt)	Liquid biopsy (BRCA2)	PARPi (fluzoparib) stabilized disease 5 mo → therapeutic relevance
Nguyen et al. ⁹	5 H&N SCC (2 cSCC)	EV-DNA (LC-WGS)	Partial CNA concordance → limited utility
Zhang et al. (10)	5 cSCC vs 5 ctrls	Exosomal circRNA	circ-CYP24A1 ↑, linked to tumor size, SCCA → diagnostic/target

Authors	Cohort / Design	Biomarker & Method	Key Findings
Wang et al. (11)	30 pts + models	Exosomal lnc-PICSAR	Associated with cisplatin resistance → resistance marker
Dańczak-Pazdrowska et al. (12)	13 AK, 2 cSCC	Serum miRNA seq	26 miRNAs diff.; hsa-miR-101-3p common → early detection potential
Hock et al. (13)	31 RTR, 22 CKD, 14 cSCC, ctrls	MDSC/DC ratios	↑ MDSCs esp. in transplant pts → prognostic/therapeutic target
Seddon et al. (14)	168 pts	Neutrophils/G-MDSC	↑ linked to thick tumors, poor OS
Rollison et al. (15)	327 immunocompetent	Tregs (CCR4hi)	High levels + UV exposure → ↑ SCC risk
Di Raimondo et al. (16)	51 cSCC	CBC (NLR, RDW)	Higher in advanced cases → simple prognostic tools
Maeda et al. (17)	222 primary cSCC	NLR	High NLR → poor DSS, SLN positivity
Strippoli et al. (18)	30 elderly la/mcSCC, cemiplimab	NLR, PLR	Low PLR + low/high NLR → better ICI response
Lai et al. (19)	93 cSCC	FOXP3+ OX40+ Tregs	Correlated with metastasis; OX40 blockade reversed suppression
Fatica et al. (20)	60 SCC (11 cSCC)	SCCA (Kryptor)	Sensitivity low (18%), specificity >95%
Wang H. et al. (21)	77 cSCC, 50 ctrls	Serum MMP-13	AUC 0.87–0.94; correlates with size/invasion
Rudhart et al. (22)	55 cSCC	CYFRA 21-1	Not prognostic
Geidel et al. (23)	104 high-risk/adv, cemiplimab	Serum CFH	High CFH → advanced stage; low CFH → longer PFS
Vanni et al. (24)	43 la/mcSCC, cemiplimab	cfDNA, exosomal PD-L1, soluble checkpoints	Low baseline markers → durable response; high IFN-γ/sCTLA-4 → poor outcome
Komulainen et al. (25)	60 transplant SCC	ctDNA (NGS)	Detection ↑ in advanced disease (85% vs 25%) → burden/th monitor
Tan et al. (26)	199 cSCC/BCC, ctrls	Serum NLRP1	Low NLRP1 → advanced TNM, mets, recurrence, mortality

Authors	Cohort / Design	Biomarker & Method	Key Findings
Fukumoto et al. (27)	6 cSCC, 9 melanoma, ctrls	Serum metabolomics	Distinct metabolite signatures separate SCC/melanoma from controls
Esposito et al. (28)	Cemiplimab pts	Serum IL8, PD1+ Tregs	↓ in responders; potential early response marker
Peters et al. (29)	KTRs (discovery + validation)	SERPINB9 methylation	High methylation before onset & recurrence → risk marker
Sherston et al. (30)	58 KTRs	FOXP3 TSDR	Demethylated FOXP3-TSDR ↑ in cSCC → accurate Treg marker
Scala et al. (31)	Advanced cSCC, cemiplimab	CD4+ T cells (ELISpot, RNA-seq)	hTERT-specific Th1 profile → predicts durable response

Legend: AK = actinic keratosis; AUC = area under the curve; BCC = basal cell carcinoma; CBC = complete blood count; cfDNA = cell-free DNA; circRNA = circular RNA; cSCC = cutaneous squamous cell carcinoma; ctrls = controls; CTC = circulating tumor cell; CTM = circulating tumor microemboli; EV = extracellular vesicle; H&N SCC = head and neck squamous cell carcinoma; ICI = immune checkpoint inhibitor; IL8 = interleukin-8; KTRs = kidney transplant recipients; la/mcSCC = locally advanced / metastatic cutaneous squamous cell carcinoma; LC-WGS = low-coverage whole-genome sequencing; lncRNA = long non-coding RNA; miRNA = microRNA; MDSC = myeloid-derived suppressor cell; NLR = neutrophil-to-lymphocyte ratio; NLRP1 = NOD-, LRR- and pyrin domain-containing protein 1; OS = overall survival; PARPi = poly (ADP-ribose) polymerase inhibitor; PBMC = peripheral blood mononuclear cell; PD-1 = programmed cell death protein 1; PD-L1 = programmed death-ligand 1; PLR = platelet-to-lymphocyte ratio; PFS = progression-free survival; pts = patients; RTR = renal transplant recipient; SCCA = squamous cell carcinoma antigen; SLN = sentinel lymph node; tDNA = tumor DNA; TMB = tumor mutational burden; Treg = regulatory T cell; TSDR = treg-specific demethylated region; th = treatment; VAF = variant allele frequency.

References

- Liu C, et al. Global, regional, national prevalence, mortality, and disability-adjusted life-years of cutaneous squamous cell carcinoma and trend analysis from 1990 to 2021 and prediction to 2045. *Front Oncol.* 2025;15:1523169.
- Anderson R, et al. Current and Emerging Insights into the Causes, Immunopathogenesis, and Treatment of Cutaneous Squamous Cell Carcinoma. *Cancers.* 2025; 17(10):1702.
- Fan C, et al. Plasma circulating tumor DNA in patients with cutaneous squamous cell carcinoma: Initial experience. *Journal of Clinical Oncology* 2024 42:16_suppl, e15034-e15034
- Kim EY, et al. Sensitivity of personalized circulating tumor DNA assay in advanced cutaneous squamous cell carcinoma. *J Am Acad Dermatol.* 2024 ;90(2):427-429.
- Sawamura S, et al. Genomic mutation analysis of circulating tumor DNA in metastatic cutaneous squamous cell carcinoma. *J Dermatol Sci.* 2022;106(1):61-64.
- Chang MJ, et al. Mutational Profile of Blood and Tumor Tissue and Biomarkers of Response to PD-1 Inhibitors in Patients with Cutaneous Squamous Cell Carcinoma. *Cancers (Basel).* 2025;17(7):1172.
- Morosin T, et al. Circulating tumour cells in regionally metastatic cutaneous squamous cell carcinoma: A pilot study. *Oncotarget.* 2016;7(30):47111-47115.
- Sun X, et al. Case Report: Fluzoparib for multiple lines of chemotherapy refractory in metastatic cutaneous squamous cell carcinoma with BRCA2 pathogenic mutation. *Front Pharmacol.* 2022;13:968060.
- Nguyen B, et al. Low-coverage whole-genome sequencing of extracellular vesicle-associated DNA in patients with metastatic cancer. *Sci Rep.* 2021;11(1):4016.
- Zhang Z, et al. Exosomal Circular RNA RNA-seq Profiling and the Carcinogenic Role of Exosomal circ-CYP24A1 in Cutaneous Squamous Cell Carcinoma. *Front Med (Lausanne).* 2021 ;8:675842.
- Wang D, et al. Lnc-PICSAR contributes to cisplatin resistance by miR-485-5p/REV3L axis in cutaneous squamous cell carcinoma. *Open Life Sci.* 2020;15(1):488-500.
- Dańczak-Pazdrowska A, et al. Profiling of microRNAs in actinic keratosis and cutaneous squamous cell carcinoma patients. *Arch Dermatol Res.* 2022 Apr;314(3):257-266.
- Hock BD, et al. Renal transplant recipients have elevated frequencies of circulating myeloid-derived suppressor cells. *Nephrol*

- Dial Transplant. 2012;27(1):402-10.
14. Seddon A, et al. Cutaneous squamous cell carcinomas with markers of increased metastatic risk are associated with elevated numbers of neutrophils and/or granulocytic myeloid derived suppressor cells. *J Dermatol Sci*. 2016;83(2):124-30.
 15. Rollison DE, et al. Circulating Immunosuppressive Regulatory T Cells Predict Risk of Incident Cutaneous Squamous Cell Carcinoma. *Front Med (Lausanne)*. 2021;8:735585.
 16. Di Raimondo C, et al. Baseline neutrophil/lymphocyte ratio (NLR) and red blood cell distribution width (RDW) correlate with advanced stages in cutaneous squamous cell carcinoma. *Int J Dermatol*. 2022;61(2):175-179.
 17. Maeda T, et al. Neutrophil-to-lymphocyte ratio is associated with survival and sentinel lymph node positivity in invasive cutaneous squamous cell carcinoma: A retrospective study. *J Am Acad Dermatol*. 2022;86(3):615-620.
 18. Strippoli S, et al. Cemiplimab in an Elderly Frail Population of Patients With Locally Advanced or Metastatic Cutaneous Squamous Cell Carcinoma: A Single-Center Real-Life Experience From Italy. *Front Oncol*. 2021;11:686308.
 19. Lai C, et al. OX40+ Regulatory T Cells in Cutaneous Squamous Cell Carcinoma Suppress Effector T-Cell Responses and Associate with Metastatic Potential. *Clin Cancer Res*. 2016;22(16):4236-48.
 20. Fatica EM, et al. Performance characteristics of the BRAHMS KRYPTOR automated squamous cell carcinoma antigen assay. *J Immunol Methods*. 2022;504:113257.
 21. Wang H, et al. Serum matrix metalloproteinase-13 as a diagnostic biomarker for cutaneous squamous cell carcinoma. *BMC Cancer*. 2021;21(1):816.
 22. Rudhart SA, et al. CYFRA 21-1: a suitable tumor marker in patients with head and neck cutaneous squamous cell carcinoma? *Eur Arch Otorhinolaryngol*. 2019;276(12):3467-3475.
 23. Geidel G, et al. Serum Complement Factor H: A Marker for Progression and Outcome Prediction Towards Immunotherapy in Cutaneous Squamous Cell Carcinoma. *Cancers (Basel)*. 2025;17(13):2162.
 24. Vanni I, et al. Identification of prognostic liquid biopsy biomarkers in patients with cutaneous squamous cell carcinoma treated with cemiplimab. *J Transl Med* 2025;3, 965.
 25. Komulainen J, et al. Association of Elevated Serum Trypsin with Cutaneous Photodamage and Skin Cancers. *Int Arch Allergy Immunol*. 2021;182(11):1135-1142.
 26. Tan J, Li J, Zeng Y. Low-level NLRP1 is associated with increased metastasis and risk of recurrence of non-melanoma skin cancer. *Adv Clin Exp Med*. 2024;33(1):61-68.
 27. Fukumoto T, et al. Novel serum metabolomics-based approach by gas chromatography/triple quadrupole mass spectrometry for detection of human skin cancers: Candidate biomarkers. *J Dermatol*. 2017;44(11):1268-1275.
 28. Esposito D, et al. Early assessment of IL8 and PD1+ Treg predicts response and guides treatment monitoring in cemiplimab-treated cutaneous squamous cell carcinoma. *Journal for ImmunoTherapy of Cancer*. 2025;13:e010421.
 29. Peters FS, et al. Disrupted regulation of serpinB9 in circulating T cells is associated with an increased risk for post-transplant skin cancer. *Clin Exp Immunol*. 2019;197(3):341-351.
 30. Sherston SN, et al. Demethylation of the TSDR is a marker of squamous cell carcinoma in transplant recipients. *Am J Transplant*. 2014;14(11):2617-22.
 31. Scala M, et al. 34P Linking early immunity changes to clinical outcomes in cutaneous squamous cell carcinoma following anti-programmed death cell-1 (PD-1) treatment. *Immuno-Oncology and Technology*, 2024;24, 100916.

POTENTIAL OF SOLUBLE IMMUNE CHECKPOINTS AS PROGNOSTIC AND PREDICTIVE BIOMARKERS IN ENDOMETRIAL CANCER

Boštjan Pirš^{1,2}, Maja Pušić Novak^{2,4}, Luka Roškar^{2,3}, Tea Lanišnik Rižner^{2,4}, Špela Smrkolj^{1,2}

¹ Department of Gynaecology, Division of Gynaecology and Obstetrics University Medical Centre Ljubljana, Ljubljana, Slovenia

² Faculty of Medicine, University of Ljubljana, Ljubljana, Slovenia

³ Department of Gynaecology and Obstetrics, General hospital Murska Sobota, Murska Sobota, Slovenia

⁴ Laboratory for Translational Molecular Endocrinology, Institute of Biochemistry and Molecular Genetics, Faculty of Medicine, University of Ljubljana, Ljubljana, Slovenia

E-mail: bostjan.pirs@gmail.com

Abstract

Soluble immune checkpoints (sICs) have recently been studied as diagnostic, prognostic and predictive biomarkers in a range of cancers. Aim of presented study was to discover potential diagnostic, prognostic and predictive biomarkers among a set of sICs in endometrial cancer (EC). We included 50 patients diagnosed with EC prior to surgery and 26 women undergoing surgery for benign gynaecologic conditions as controls. We measured plasma concentrations of 16 sICs using Luminex XMAP Multiplex immunosorbent assay, 8 inhibitory (sPD-1, sPD-L1, sPD-L2, sCTLA-4, sLAG3, sTIM3, sBTLA, sHVEM), 6 stimulatory (sICOS, sGITR, sGITR-L, sCD40, sCD27, sCD2) and 2 with mixed role (sCD80, sCD86). Study cohort included 66% of EC patients who had non-aggressive histological type, while 33% of tumors exhibited MMR deficiency and 14% had aberrant p53 expression. Majority of tumors were confined to the uterus, with 16% of patients having stage cancer of stage IIIA or higher. sICs levels did not significantly differ between control patients and EC patients. Also, sICs levels did not significantly differ by aggressiveness of histological type. Levels of sTIM3 tended to be higher in more advanced stage cancers, similarly, its levels were higher in higher risk group patients. Levels of sPD-1, sPD-L1, sLAG-3, sICOS, sGITR, sGITRL, sCD86 were higher in MMR deficient tumors. Contrary to published findings in a small cohort of EC patients and in other malignancies, we did not detect differing sICs levels in EC patients against patients without cancer. This may be due to majority of the patients in presented study having localised disease. Further studies are needed before ruling out sICs as diagnostic biomarkers in endometrial cancer. Biological foundation of higher levels of some sICs in MMR deficient tumors may be their immunoreactivity, stimulating immune response. This finding may be clinically significant, as blood-based prognostic and predictive biomarkers could preclude the need for repeat biopsies and overcome tissue biomarker limitations.

Introduction

Soluble immune checkpoints (sICs) are proteins measurable in peripheral blood, closely related to transmembrane forms, the latter have established role in immune regulation and are targets of oncological immunotherapies.^{1,2} These molecules have been studied as diagnostic, prognostic and predictive biomarkers in a range of cancers. Simplistically, sICs can be divided into inhibitory and stimulatory. Elevated levels of the former have been associated with cancer diagnosis, less favourable prognosis and worse response to therapy, mainly immunotherapy. Studies of stimulatory immune checkpoints are few and yield inconsistent findings.²⁻⁵ Recently, levels of 3 sICs – sPD-1, sPD-L1 and sPD-L2 were examined in two small cohorts of endometrial cancer (EC) patients, observing higher sPD-L1 and sPD-L2 levels in EC patients compared to controls and finding higher sPD-L1 levels in patients with higher stage and grade tumors.^{6,7} Aim of presented study was to discover potential diagnostic, prognostic and predictive biomarkers among a larger set of sICs in endometrial cancer (EC).

Methods

In this case-control study we included 50 patients diagnosed with endometrial cancer before undergoing surgical treatment and 26 women without significant comorbidities before undergoing surgery for benign gynaecologic conditions (mainly pelvic organ prolapse, leiomyomas and urinary incontinence). Patients with active malignant disease at other site, with recurrent endometrial cancer or receiving immunosuppressive therapy were excluded. We obtained and processed peripheral venous blood into plasma according to standardized protocol. We measured plasma concentrations of 16 sICs using Luminex XMAP Multiplex immunosorbent assay, 8 inhibitory (sPD-1, sPD-L1, sPD-L2, sCTLA-4, sLAG3, sTIM3, sBTLA, sHVEM), 6 stimulatory (sICOS, sGITR, sGITR-L, sCD40, sCD27, sCD2) and 2 with mixed role (sCD80, sCD86) – schematically represented in Figure 1.

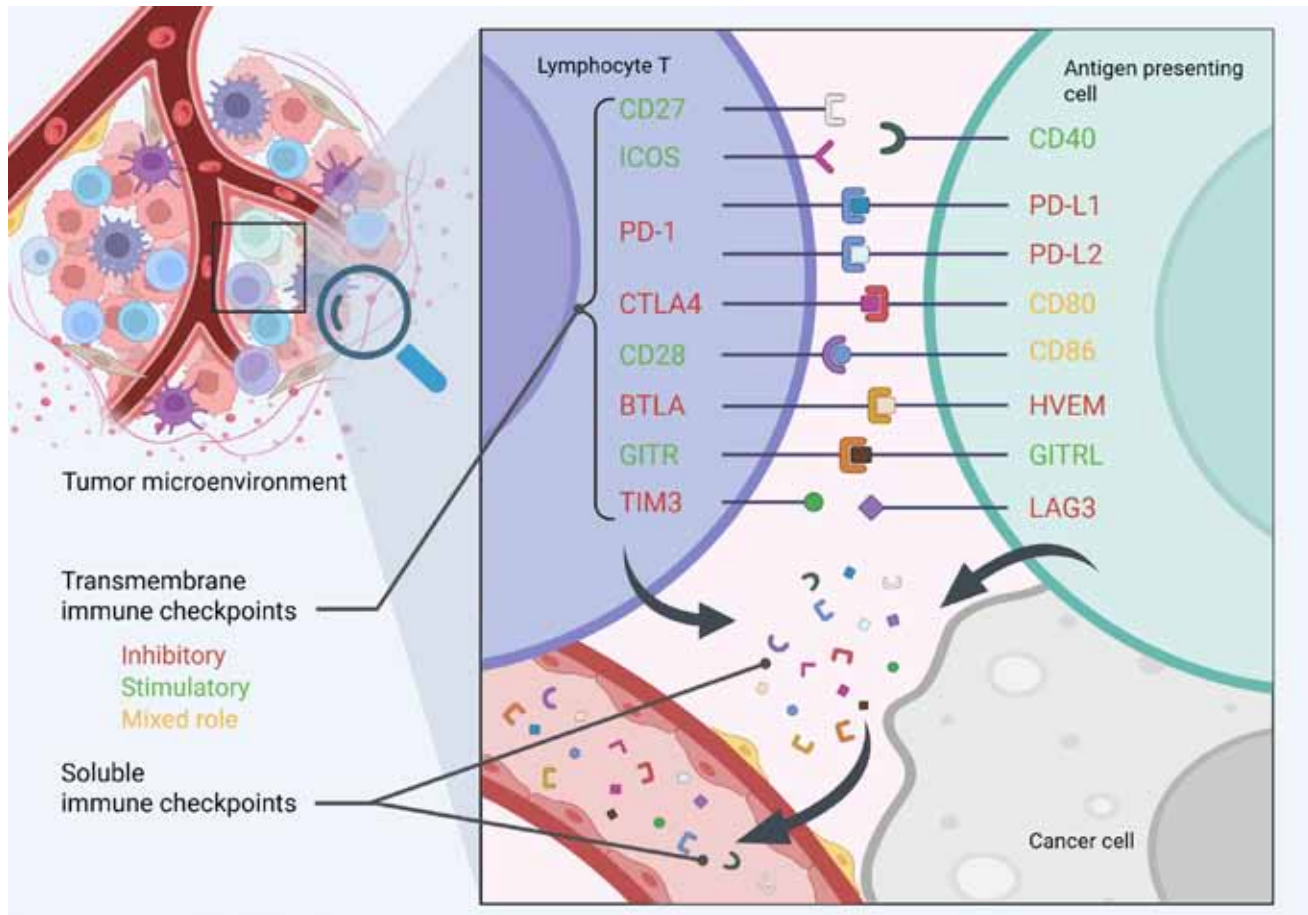


Figure 1: Schematic representation of studied soluble immune checkpoints (sICs).

Results

Groups of endometrial cancer patients and control subjects were well balanced in respect to age, BMI, waist-to-hip ratio, amount of physical activity, alcohol consumption, smoking status and presence of obesity (Table 1). Study cohort included 66% of EC patients who had non-aggressive histological type, while 33% of tumors exhibited MMR deficiency and 14% had aberrant p53 expression. Majority of tumors were confined to the uterus, with 16% of patients having stage cancer of stage IIIA or higher (Table 2). sIC levels did not significantly differ between control patients and EC patients. Also, sICs levels did not significantly differ by aggressiveness of histological type. Levels of sTIM3 tended to be higher in more advanced stage cancers, similarly, its levels were higher in higher risk group patients (Figure 3). Levels of sPD-1, sPD-L1, sLAG-3, sICOS, sGITR, sGITRL, sCD86 were higher in mismatch repair (MMR) deficient tumors (Figure 2).

Table 1: Characteristics of study patients. Obesity defined as BMI > 30 kg/m² as per WHO.

	All patients (N=76)	Control patients (N=26)	EC patients (N=50)
Age	64.0 (55.0, 70.0)	63.5 (55.2, 68.0)	64.0 (55.2, 70.0)
BMI (kg/m²)	29.1 (25.4, 33.1)	29.8 (26.8, 33.0)	28.9 (25.0, 33.0)
Waist to hip ratio	0.860 (0.810, 0.920)	0.865 (0.795, 0.915)	0.860 (0.825, 0.915)
Menopausal status			
Postmenopausal	62 (81.6%)	19 (73.1%)	43 (86.0%)
Premenopausal	14 (18.4%)	7 (26.9%)	7 (14.0%)
Age at menopause	52.0 (50.0, 53.0)	52.0 (50.0, 53.0)	52.0 (50.0, 53.0)
History of infertility			
No	69 (94.5%)	25 (96.2%)	44 (93.6%)
Yes	4 (5.5%)	1 (3.8%)	3 (6.4%)
Parity (N)			
0	3 (4.1%)	1 (3.8%)	2 (4.3%)
1	15 (20.5%)	2 (7.7%)	13 (27.7%)
2	41 (56.2%)	16 (61.5%)	25 (53.2%)
>2	14 (19.2%)	7 (26.9%)	7 (14.9%)
Physical activity (average hrs/week)	27.8 (20.0, 35.2)	27.0 (19.3, 33.1)	27.8 (22.1, 35.8)
Alcohol consumption			
No	58 (80.6%)	21 (80.8%)	37 (80.4%)
Yes	14 (19.4%)	5 (19.2%)	9 (19.6%)
Smoking status			
Non-smoker	62 (86.1%)	22 (84.6%)	40 (87.0%)
Smoker	10 (13.9%)	4 (15.4%)	6 (13.0%)
Obesity			
No	40 (52.6%)	13 (50.0%)	27 (54.0%)
Yes	36 (47.4%)	13 (50.0%)	32 (46.0%)

Table 2: Tumour characteristics in EC patients.

EC patients (N = 50)		
Histological type	Endometrioid	41 (82.0%)
	Serous	6 (12.0%)
	Mixed	2 (4.0%)
	Other	1 (2.0%)
Endometrioid cancer grade	1	20 (47.6%)
	2	13 (31.0%)
	3	9 (21.4%)
Histological type (FIGO 2023) ^a	non-aggressive	33 (66.0%)
	aggressive	17 (34.0%)
MMR status	dMMR	16 (32.0%)
	pMMR	34 (68.0%)
p53 status	Abberant	7 (14.0%)
	Wild type	43 (86.0%)
Stage (FIGO 2023)	IA1	11 (22.0%)
	IA2	7 (14.0%)
	IA3	0 (0.0%)
	IB	2 (4.0%)
	IC	6 (12.0%)
	IIA	3 (6.0%)
	IIB	8 (16.0%)
	IIC	3 (6.0%)
	IIC(IICmp53ab)	2 (4.0%)
	IIIA	0 (0.0%)
	IIIB	0 (0.0%)
	IIIC1	3 (6.0%)
	IIIC2	2 (4.0%)
	IVA	0 (0.0%)
	IVB	3 (6.0%)
IVC	0 (0.0%)	
Risk group (ESGO 2020) ^b	LR	18 (36.0%)
	IR	8 (16.0%)
	HIR	14 (28.0%)
	HR	7 (14.0%)
	AM	3 (6.0%)

Legend: a - endometrioid grade 1 or 2 cancers are regarded as non-aggressive and others as aggressive. b - Risk groups according to ESGO 2020 guidelines, LR - low risk, IR - intermediate risk, HIR - high intermediate risk, HR - high risk, AM - advanced/metastatic disease (stage III or higher with residual disease after surgery or stage IV)

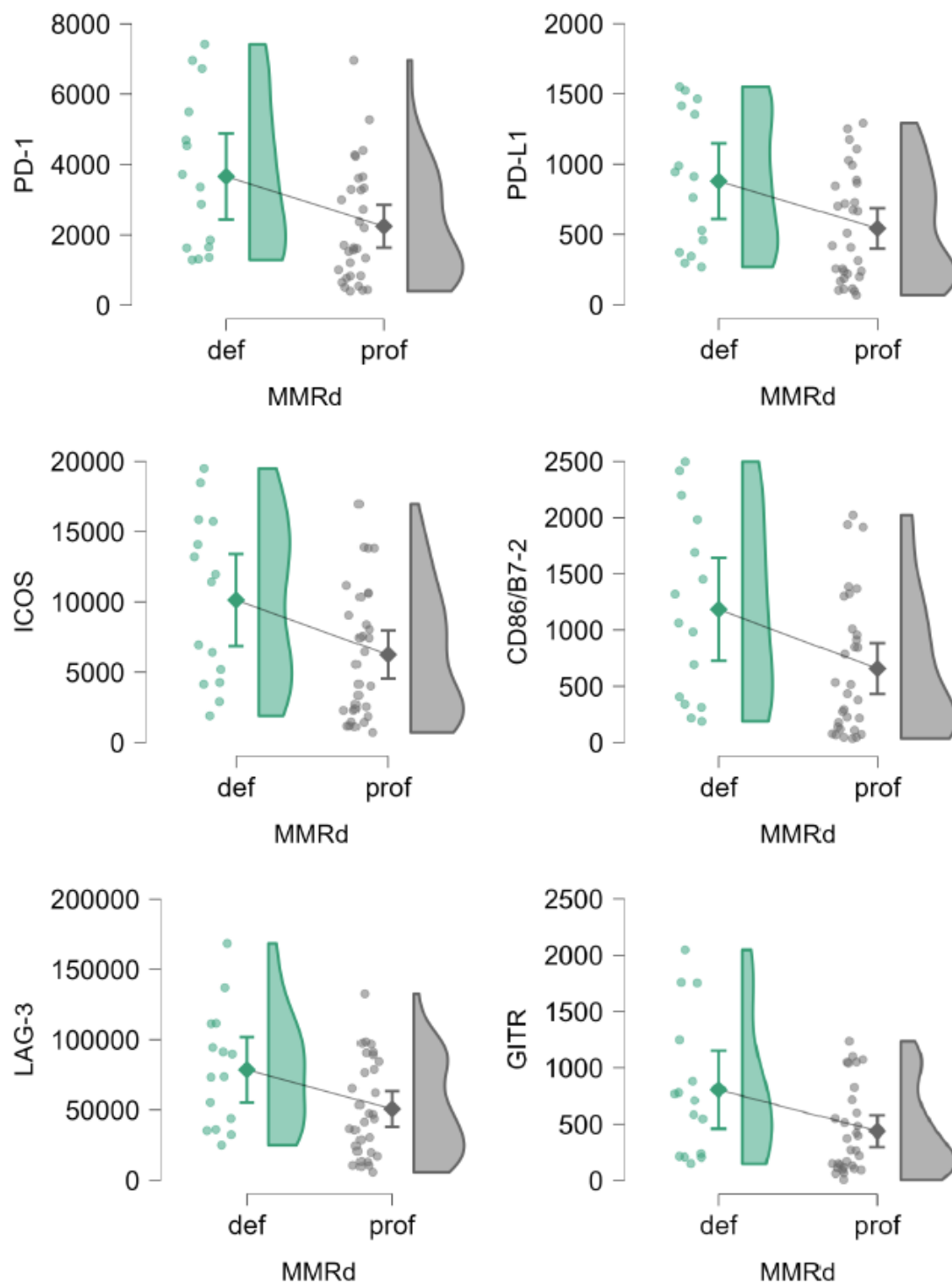


Figure 2: Raincloud plots of significant differences ($p < 0.05$) in sIC levels by tumor MMR status. Levels are expressed in pmol/L. Plotted from left to right are jittered data points, mean and 95% CI, kernel density plot.

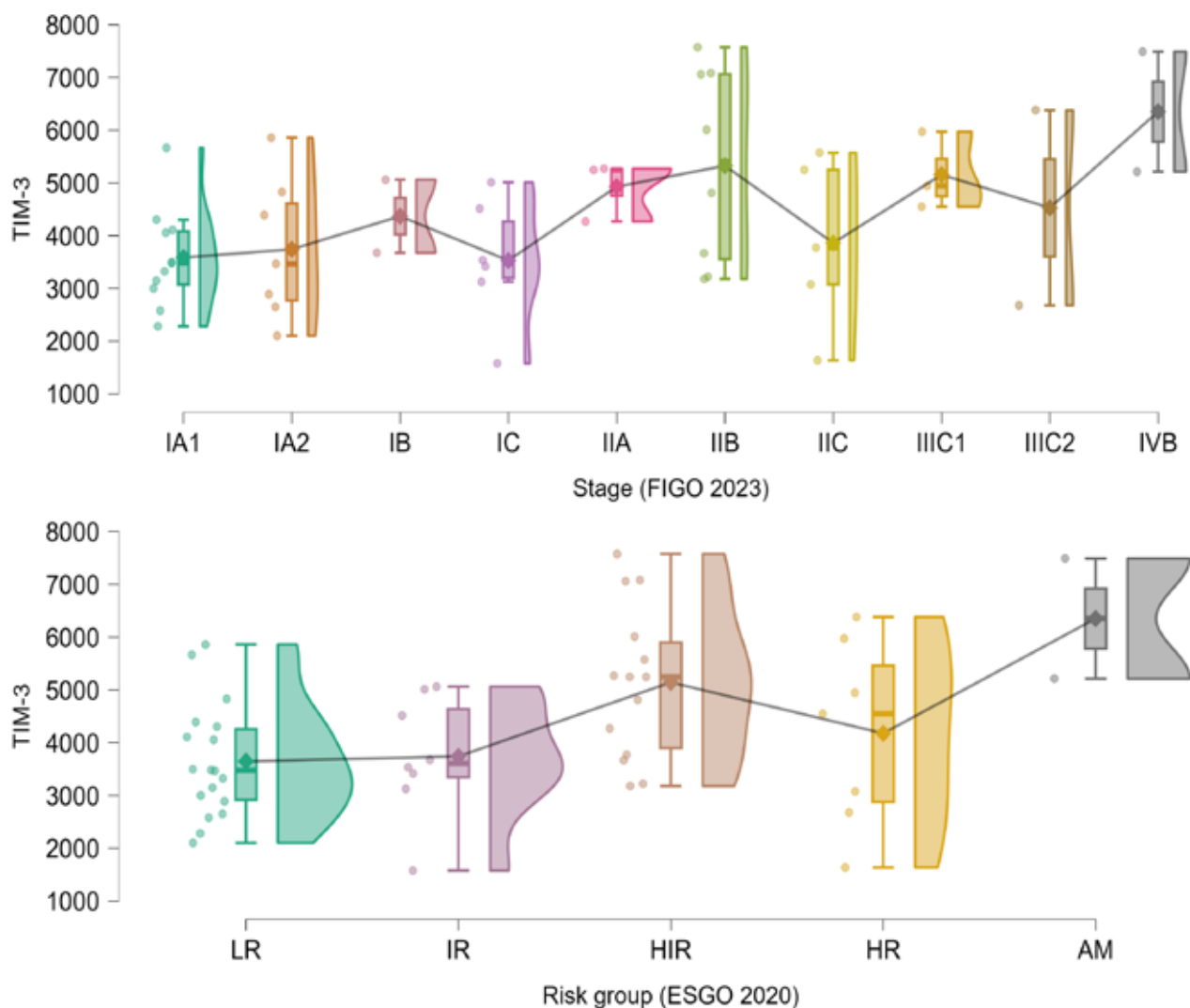


Figure 3: Raincloud plot of differing TIM3 levels by FIGO 2023 stage (upper) and ESGO 2020 guidelines risk group (lower). Levels are expressed in pmol/L. Plotted from left to right are jittered data points, box and whiskers plot with added mean, kernel density plot. LR – low risk, IR – intermediate risk, HIR – high intermediate risk, HR – high risk, AM – advanced/metastatic disease (stage III or higher with residual disease after surgery or stage IV)

Conclusion

Contrary to previously published findings in a small cohort of EC patients and findings in other malignancies, we did not detect differing sICs levels in EC patients against patients without cancer. This may be due to majority of the patients in presented study having localised disease. Further studies are needed before ruling out sICs as diagnostic biomarkers in endometrial cancer. Biological foundation of higher levels of some sICs in MMR deficient tumours may be their immunoreactivity, stimulating immune response. This finding may be clinically significant, as blood-based prognostic and predictive biomarkers could preclude the need for repeat biopsies and overcome tissue biomarker limitations.

Acknowledgement

Study was funded by ERA NET-BioEndoCar research grant and UMC Ljubljana tertiary project “Imunske molekule kot diagnostični in prognostični dejavniki pri bolnicah z rakom endometrija“ research grant.

References

1. Pirš B, et al. Overview of Immune Checkpoint Inhibitors in Gynecological Cancer Treatment. *Cancers*. 2022;14(3):631.
2. Pitts SC, et al. Soluble immune checkpoints: implications for cancer prognosis and response to immune checkpoint therapy and conventional therapies. *J Exp Clin Cancer Res CR*. 2024;43(1):155.
3. Chen L, et al. Soluble immune checkpoint molecules in cancer risk, outcomes prediction, and therapeutic applications. *Biomark Res*. 2024;12(1):95.
4. Chakrabarti R, et al. Soluble immune checkpoint molecules: Serum markers for cancer diagnosis and prognosis. *Cancer Rep Hoboken NJ*. avgust 2019;2(4):e1160.
5. Gu D, et al. Soluble immune checkpoints in cancer: production, function and biological significance. *J Immunother Cancer*. 2018;6(1):132.
6. Mamat Yusof MN, et al. Gene expression and soluble protein level of PD-1 and its ligands (PD-L1 and PD-L2) in endometrial cancer. *PloS One*. 2025;20(3):e0312765.
7. Kontomanolis E, et al. Tissue Expression and Plasma Soluble PD-L1 Levels in Patients With Endometrial Cancer. *Anticancer Res*. 2024;44(12):5525–30.

VLOGA IN POMEN mikroRNA V PATOGENEZI, DIAGNOSTIKI IN ZDRAVLJENJU KOŽNEGA MELANOMA – PREGLED LITERATURE

Dominik Škrinjar¹, Mario Gorenjak^{2,3}, Uroš Potočnik^{2,3,4,5}

¹ Medicinska fakulteta, Univerza v Mariboru, Maribor, Slovenija

² Center za humano molekularno genetiko in farmakogenomiko, Medicinska fakulteta, Univerza v Mariboru, Maribor, Slovenija

³ Katedra za biokemijo, Medicinska fakulteta, Univerza v Mariboru, Maribor, Slovenija

⁴ Laboratorij za biokemijo, molekularno biologijo in genomiko, Fakulteta za kemijo in kemijsko tehnologijo, Univerza v Mariboru, Maribor, Slovenija

⁵ Oddelek za znanstvenoraziskovalno delo, Univerzitetni klinični center Maribor, Maribor, Slovenija

Elektronski naslov: domiskrinjar7@gmail.com

Izvod

Melanom predstavlja eno najbolj agresivnih oblik kožnega raka, pri čemer njegova incidenca narašča po vsem svetu. Zgodnja diagnoza je ključnega pomena, saj pomembno vpliva na preživetje in potek bolezni pri bolnikih. MikroRNA (miRNA) igrajo pomembno vlogo v patogenezi melanoma, saj sodelujejo v regulaciji genetskih in molekularnih procesov, ki vplivajo na razvoj, rast in širjenje tumorja. Poleg tega imajo miRNA velik potencial kot diagnostični in prognostični biomarkerji, saj omogočajo zaznavanje sprememb na molekularni ravni že v zgodnjih fazah bolezni. Krožeče miRNA, ki so prisotne v telesnih tekočinah, predstavljajo obetaven neinvaziven pristop za zgodnje odkrivanje melanoma ter spremljanje njegovega napredovanja in odziva na terapijo. Terapevtski potencial miRNA vključuje razvoj ciljnih terapij, ki lahko učinkovito modulirajo izražanje specifičnih miRNA, s čimer vplivajo na ključne signalne poti. Pomemben izziv predstavlja tudi razumevanje vloge miRNA pri odpornosti melanoma na obstoječe sistemske terapije, kar lahko vodi v razvoj kombiniranih terapij za premagovanje odpornosti. Poglobljeno razumevanje molekularnih interakcij med miRNA in njihovimi ciljnimi geni omogoča natančnejše prilagajanje terapevtskih pristopov in izboljšanje kliničnih izidov. Raziskave na področju miRNA tako obetajo pomemben prispevek k izboljšanju diagnostike, zdravljenja in prognostike kožnega melanoma, kar bo ključno za razvoj novih, učinkovitejših pristopov v klinični praksi.

Uvod

Kožni melanom je maligni tumor, ki izhaja iz melanocitov in velja za eno najbolj agresivnih oblik kožnega raka, predvsem zaradi njegove hitrosti proliferacije, invazije ter nastajanja metastaz. Zgodnja prepoznavna in natančno spremljanje bolezni sta odločilna za uspeh zdravljenja in preživetje bolnikov. V zadnjem desetletju so miRNA pridobile osrednji pomen kot molekularni regulatorji, ki uravnavajo izražanje genov in vplivajo na celično homeostazo, diferenciacijo, presnovo in vnetne procese. Povezave miRNA z epigenetskimi mehanizmi dodatno poudarjajo njihov pomen pri kompleksnih bioloških procesih.^{1,2} V melanomu miRNA namreč ne delujejo le kot indikatorji bolezni, temveč aktivno modulirajo onkogene poti, ki vplivajo na proliferacijo, invazivnost, metastaziranje in sposobnost izogibanja imunskemu nadzoru. Povišana ekspresija določenih onkogenih miRNA (npr. miR-21, miR-19b-3p, miR-7, miR-126, miR-146a) spodbuja napredovanje tumorja, medtem ko tumorsupresorske miRNA, kot je let-7b, zavirajo celični cikel in omejujejo rast melanoma. Njihovo izražanje se spreminja glede na stadij bolezni, npr. miR-126 in miR-29c sta pogosti v zgodnjih fazah bolezni, medtem ko v napredovalih oblikah melanoma njuna raven znatno upade.²

Vloga mikroRNA v patogenezi kožnega melanoma

V procesu tumorogeneze melanoma (melanomogeneze) miRNA delujejo kot pomembni regulatorji, saj lahko nastopajo bodisi kot onkogene miRNA (onkomiRNA) bodisi kot tumorsupresorske

miRNA. Njihova deregulacija vpliva na številne značilnosti malignosti melanoma, vključno s proliferacijo, rezistenco na apoptozo, angiogenezo, invazijo, metastazami in odpornostjo na zdravljenje. Več študij je pokazalo, da določene miRNA spodbujajo proliferativne signale (npr. miR-137, miR-221), zavirajo programirano celično smrt (miR-18b, miR-26a), prispevajo k replikativni nesmrtnosti (miR-205, miR-203) ter povečujejo invazivnost in metastatski potencial (miR-214, miR-31). Spremembe v izražanju teh miRNA se dogajajo v različnih fazah melanomske progresije in so pogosto posledica epigenetskih mehanizmov, kot so metilacija DNK, modifikacije histonov ter interakcije z mikrookoljem tumorja (TME).³

Določene miRNA (npr. miR-101, miR-3157) z negativno regulacijo genov, kot je EZH2, pospešujejo rast tumorja, medtem ko druge, kot je miR-211, prispevajo k preoblikovanju fibroblastov v s tumorjem povezane fibroblaste (CAF), s čimer aktivirajo signalno pot MAPK in spodbujajo tumorsko proliferacijo. V angiogenezi, ključnem koraku metastatske poti, sodelujejo miR-1908, miR-199a-5p in miR-199a-3p, medtem ko miR-214 prispeva k transendotelijski migraciji in nastanku oddaljenih metastaz. Prisotnost določenih miRNA v tumorskih celicah ali v TME lahko vpliva tudi na pridobivanje odpornosti na ciljno terapijo, kot so zaviralci BRAF in MEK, ter na učinkovitost imunoterapije z zaviralci imunskih kontrolnih točk (ICIs). Na primer, zmanjšana ekspresija miR-200c je povezana z odpornostjo na BRAFi, medtem ko so cirkulirajoče miRNA, kot so miR-125a/b in miR-146a/b, povezane z delovanjem mieloidnih supresorskih celic in učinkovitostjo ICIs. Tabela 1 prikazuje vloge različnih miRNA pri razvoju in progresiji melanoma, njihov mehanizem delovanja in eksperimentalen model (*in vivo* ali *in vitro*), v katerem so bile funkcije posameznih miRNA preučevane.^{4,5}

Tabela 1: Pregled izbranih miRNA, njihove vloge pri melanomu, mehanizmov delovanja in uporabljenih eksperimentalnih modelov (*in vivo/in vitro*).⁶

miRNA	Vloga pri melanomu	Mehanizem delovanja	<i>in vivo</i> / <i>in vitro</i>
miR-137	Tumorski supresor; znižuje MITF in CDK6	Tarča: c-MET, YB1, EZH2; povzročča celični cikel G ₁ arest, zmanjšuje rast celic	oboje
miR-148	Negativno uravnava MITF	Vezava na 3' UTR MITF; vpliva na vedenje melanomskih celic	oboje
miR-182	Spodbuja migracijo in preživetje tumorskih celic	Znižuje MITF in FOXO3; povečuje proliferacijo in invazijo	<i>in vitro</i>
miR-211	Inhibira migracijo; uravnava NUA1 in POU3F2 (BRN2)	Nižje ravni v invazivnem melanomu; vpliva na adhezijo celic in metastatski potencial	<i>in vitro</i>
miR-221/222	Tarča regulatorjev celičnega cikla kot P27	Znižuje c-Kit, vpliva na izražanje MITF in tirozinaze; vključena v napredovanje melanoma	oboje
miR-205	Zmanjšuje proliferacijo in invazijo	Tarča: E2F1; vpliva na celični cikel in AKT signalno pot	oboje
miR-625	Povezan z metastazami	Tarča: SOX-2; zmanjšana ekspresija spodbuja proliferacijo in invazijo	oboje
miR-514a	Povečuje rast melanoma; uravnava NF1	Vpliva na občutljivost na terapijo, usmerjeno proti BRAF	<i>in vitro</i>

miRNA	Vloga pri melanomu	Mehanizem delovanja	<i>in vivo</i> / <i>in vitro</i>
miR-200c	Povezan z odpornostjo na BRAFi	Nizke ravni so povezane z odpornostjo na zdravila	<i>in vitro</i>
miR-155	Znižana ekspresija v melanomu; potencialna terapevtska tarča	Povzroča apoptozo ob prekomerni ekspresiji v celičnih linijah melanoma	<i>in vitro</i>

mikroRNA kot diagnostični in prognostični biomarker

8

MiRNA so zaradi stabilnosti, specifičnega izražanja in prisotnosti v telesnih tekočinah obetavni biomarkerji za diagnozo, prognozo in spremljanje odziva na terapijo.^{7,8} Med ključnimi diagnostičnimi biomarkerji so miR-21, miR-221 in miR-222, ki so prekomerno izražene v melanomu in krvi. MiR-21 spodbuja rast, invazijo in metastaziranje z zaviranjem PTEN, zato je pomembna terapevtska tarča (npr. modulacija z HIFU poveča raven PTEN). MiR-221/222 ciljata p27Kip1 in PTEN ter aktivirata poti PI3K/AKT in MAPK, s čimer povečata proliferacijo in preživetje tumorja. Panel sedmih miRNA omogoča razlikovanje bolnikov z melanomom od zdravih z visoko občutljivostjo (93 %) in specifičnostjo (82 %), kar potrjujejo tudi ROC analize.^{7,9} Nizka raven nekaterih prognostičnih biomarkerjev miRNA, npr. miR-137 napoveduje slabšo prognozo, saj ciljajo na MITF in Wnt pot, s čimer zavira rast in invazivnost. Nasprotno pa je visoka izraženost miR-182 povezana z agresivnostjo in metastazami. MiR-150-5p napoveduje možganske metastaze, nižji nivoji miR-205-5p, miR-145-5p in miR-203-3p pa odražajo napredovalo bolezen in povečano agresivnost tumorja.¹⁰ Krožeče miRNA (cmiRNA) so stabilne in dostopne v krvi, plazmi ter drugih tekočinah. MiR-34a, miR-100 in miR-125b so povezane z odpornostjo na sistemsko zdravljenje, medtem ko sta miR-99b in let-7e povezani z MDSC in nakazujeta na agresivnejši potek in slabšo prognozo bolezni. Zaradi visoke specifičnosti in občutljivosti se cmiRNA uveljavljajo kot perspektivno orodje za neinvazivno diagnostiko, prognozo in personalizirano spremljanje melanoma.¹¹

Terapevtski potencial mikroRNA pri kožnem melanomu

Tarčno zdravljenje na osnovi miRNA

Raziskave so pokazale, da imajo miRNA ključno vlogo pri uravnavanju celičnega cikla, proliferacije, invazije, imunskega odziva in aktivacije signalnih poti, predvsem MAPK/ERK, kar neposredno vpliva na napredovanje melanoma. Posebej pomembne tarče so tumorski supresorji in transkripcijski faktorji, kot so CYLD, ITCH, FOXM1, HOX-B7, BMP4 in zlasti MITF, ki predstavlja osrednji regulator rasti in heterogenosti tumorja.^{7,12} Med klinično najbolj preučevanimi so miR-137, katere nizka raven napoveduje slabšo prognozo in uravnava onkogene, kot so c-MET, YB1, EZH2 in PIK3R3 ter miR-182, ki je prekomerno izražena ter spodbuja napredovanje melanoma z zaviranjem FOXO3 in MITF in miR-211 in miR-603, katerih spremembe izražanja vplivajo na invazivnost in rast tumorja. Poleg tega miRNA vplivajo na odzivnost na zdravljenje, saj je na primer povišana raven kemokina CCL2 povezana z napredovanjem bolezni, medtem ko krožeče miRNA, kot so let-7e, miR-99b, miR-100, miR-125a/b in miR-146a, modulirajo delovanje mieloidnih supresorskih celic in imunski odziv, miR-514a pa vpliva na občutljivost melanoma na BRAF-ciljno terapijo.^{12,13} Ti mehanizmi potrjujejo, da so miRNA ključni dejavniki pri razvoju odpornosti na zdravljenje ter predstavljajo obetavne terapevtske tarče pri razvoju novih pristopov v zdravljenju melanoma.

Potencialne metode zdravljenja na osnovi miRNA

Potencialne metode zdravljenja na osnovi miRNA vključujejo sintetične posnemovalce, virusne vektorje in nevirusne načine dostave. Sintetični posnemovalci nadomeščajo zmanjšano izražene

tumorsupresorske miRNA in omogočajo hkratno ciljanje več onkogenih poti, pri čemer pa je njihova stabilnost v organizmu omejena, zato se uporabljajo kemične modifikacije ali nosilci; na primer modificiran posnemovalac miR-205 zavira proliferacijo in angiogenezo z uravnavanjem genov E2F1, VEGF in BCL2.^{7,9} Virusni vektorji, kot so lentivirusni, adenovirusni in vektorji adenovirusom pridruženih virusov (AAV), zagotavljajo učinkovito dostavo miRNA v melanomske celice. Lentivirusni vektorji omogočajo trajno vključitev terapevtskih zaporedij v genom gostitelja, adenovirusni vektorji so optimizirani za manjšo imunogenost in učinkovito dostavo posnemovalcev, medtem ko AAV omogočajo dolgotrajno izražanje z minimalnimi stranskimi učinki. Raziskave z miR-21 kažejo, da lahko z zaviranjem encima MKK3 učinkovito omeji rast in metastaziranje melanoma.^{7,14,15} Kljub prednostim virusnih vektorjev obstajajo tveganja, kot so insercijska mutageneza, toksičnost in omejena možnost ponovljenih aplikacij zaradi imunskega odziva. Zato se razvijajo tudi nevirusne metode dostave, med katerimi so lipidni nanodelci, polimeri in predvsem eksosomi, ki kot naravni nosilci učinkovito prehajajo biološke pregrade in omogočajo ciljno in manj imunogeno dostavo miRNA v melanomske celice, kar obeta večjo terapevtsko učinkovitost in varnost.¹⁶

Vloga miRNA pri neodzivnosti na obstoječe sistemsko zdravljenje

Dolgotrajno sistemsko zdravljenje melanoma, zlasti z zaviralci BRAF (BRAFi) in MEK (MEKi), pogosto vodi v razvoj odpornosti, ki običajno nastopi v enem letu in omejuje učinkovitost terapije. Ključno vlogo pri tem imajo miRNA, saj lahko nekatere sprožijo odpornost, druge pa povečajo ali obnovijo občutljivost na zdravila. Nizke ravni miR-200c so povezane z odpornostjo na BRAFi, visoka izraženost miR-100 in miR-125b pa je bila opažena pri bolnikih, zdravljenih z BRAFi, medtem ko lahko miR-579 povrne občutljivost na terapijo.^{17,18} Pomembno vlogo ima tudi TME, zlasti CAF ter prenos eksosomalnih miRNA, ki dodatno spodbujajo kemorezistenco.^{19,20} Poleg tarčnih terapij so miRNA vključene tudi v odzivnost na zaviralce imunskih kontrolnih točk (ICIs), saj cmiRNA, kot so let-7e, miR-99b, miR-100, miR-125a/b, miR-146a/b in miR-155, vplivajo na delovanje mieloidnih supresorskih celic (MDSC) in s tem na klinično učinkovitost imunoterapije.^{9,21} Zaradi svoje dvojne vloge pri občutljivosti in odpornosti se miRNA vse bolj uveljavljajo kot obetavne terapevtske tarče za premagovanje neodzivnosti na obstoječe sistemske terapije pri melanomu. V tabeli 2 so povzete najpomembnejše miRNA, katerih povečana ekspresija je povezane bodisi s povečano občutljivostjo, bodisi s povečano odpornostjo na tarčno zdravljenje in kemoterapijo pri (metastatskem) melanomu.^{9,21}

Tabela 2: Najpomembnejše miRNA, katerih povečana ekspresija je povezane s povečano občutljivostjo ali povečano odpornostjo na tarčno zdravljenje in kemoterapijo pri (metastatskem) melanomu.¹⁵

miRNA	Funkcija	Tarča	Zdravljenje
miR-7	Občutljivost	EGFR/IGF-1R/CRAF	BRAFi
miR-31	Občutljivost	SOX10	Kemoterapija
miR-32	Občutljivost	MCL-1	BRAFi (vemurafenib)
miR-126-3p	Občutljivost	ADAM9 in VEGF-A	BRAFi (dabrafenib)
miR-199b-5p	Občutljivost	HIF-1 α /VEGF	BRAFi
miR-200c	Občutljivost	BM1	BRAFi
miR-524-5p	Občutljivost	BRAF in ERK2	BRAFi
miR-579-3p	Občutljivost	BRAF, MDM2	BRAFi + MEKi
miR-659-3p	Občutljivost	NFIX	Kemoterapija (karboplatin/paklitaksel)
miR-34a	Odpornost	CCL-2	BRAFi (vemurafenib)
miR-30a-5p	Odpornost	IGF1R	Kemoterapija (cisplatin)
miR-100	Odpornost	CCL-2	BRAFi (vemurafenib)
miR-125a	Odpornost	BAK1, MLK3	BRAFi
miR-125b	Odpornost	CCL-2	BRAFi (vemurafenib)

miRNA	Funkcija	Tarča	Zdravljenje
miR-204	Odpornost	NUAK1/ARK5, IGFBP5, TGF- β RII, Slug, CHD5	BRAFi
miR-211	Odpornost	NUAK1/ARK5, IGFBP5, TGF- β RII, Slug, CHD5	BRAFi
miR-514a	Občutljivost	NF1	BRAFi

miRNA kot podporna terapija pri imunoterapiji

8

Imunoterapija, ki temelji na zaviralcih imunskih kontrolnih točk, kot so anti-CTLA-4 (ipilimumab) in anti-PD-1 (pembrolizumab, nivolumab), predstavlja eno najučinkovitejših oblik zdravljenja napredovalega melanoma, saj okrepi sposobnost imunskega sistema za prepoznavo in uničenje rakavih celic, vendar pa približno 50–60 % bolnikov na zdravljenje ne odgovori.²² V tem kontekstu se miRNA kažejo kot obetavna podpora imunoterapiji, saj usmerjeno delujejo na mehanizme, ki rakavim celicam omogočajo izogibanje imunskemu nadzoru. MiRNA, kot sta miR-21 in miR-34a, izboljšujeta odzivnost na imunoterapijo, številne druge (npr. miR-17-5p, miR-28, miR-30b/30d, miR-146a, miR-155, miR-200a, miR-210, miR-433, miR-494) pa ciljajo ključne molekularne tarče, povezane z regulacijo imunskega odziva in karcinogeneze.^{21,23} Proces imunskega urejanja vključuje faze eliminacije, ravnovesja in izogibanja, pri čemer se tumor in imunski sistem nenehno prilagajata drug drugemu; prav na tej točki lahko miRNA prispevajo k ponovni občutljivosti melanomskih celic na imunski nadzor, na primer z regulacijo izražanja MITF-M preko IL-1 β .^{14,24} Tako se oblikuje koncept kombiniranih terapevtskih pristopov, v katerih bi se imunoterapija in miRNA dopolnjevali, kar odpira nove možnosti za zmanjšanje odpornosti tumorja in izboljšanje kliničnih izidov bolnikov z melanomom.

Izzivi in priložnosti uporabe mikroRNA pri melanomu

Kljub napredku raziskav miRNA pri zdravljenju melanoma ostajajo številni izzivi, saj njihova kompleksna vloga v regulaciji celičnih poti, metastaziranja, invazivnosti in odpornosti na terapije še ni povsem pojasnjena. Interakcija miRNA z imunskim sistemom in TME jih postavlja kot ključne regulatorje bolezni, pri čemer sodobne tehnologije odpirajo nove priložnosti za terapevtsko uporabo. Nanodelci bi lahko omogočali bolj stabilno in usmerjeno dostavo miRNA posnemovalcev ali inhibitorjev, prav tako bi naj zmanjševali sistemske stranske učinke in povečali terapevtski učinek neposredno v tumorskem tkivu.^{7,25} Tehnologija CRISPR/Cas9 bi lahko omogočala natančno gensko urejanje in manipulacijo ekspresije specifičnih miRNA, kar odpira možnosti za personalizirane pristope in preprečevanje odpornosti na ciljne terapije, kot so BRAFi ali imunoterapija. Napredek umetne inteligence in strojnega učenja omogoča analizo velikih količin podatkov, identifikacijo novih biomarkerjev, klasifikacijo podtipov melanoma in napovedovanje odziva na terapijo.^{24,25} Translacijski pristopi, ki povezujejo osnovne raziskave s klinično prakso, so ključni za validacijo miRNA kot diagnostičnih, prognostičnih in terapevtskih orodij ter za preučevanje zdravljenja s kombiniranimi terapijami. Čeprav še ni uradno registriranega miRNA zdravila za melanom, predklinična preskušanja miRNA zdravil za druge bolezni (Miravirsen za HCV, MRG-110 za srčno-žilne bolezni, Cobomarsen za T-celični limfom, posnemovalec miR-29 za fibrozo in RGLS5579 za glioblastom) kažejo velik potencial teh molekul, kar skupaj z vlaganji farmacevtskih podjetij potrjuje obetavno smer razvoja tudi pri melanomu, kjer bi kombinacija miRNA terapij z obstoječimi tarčnimi in imunoterapijami lahko izboljšala individualizacijo in učinkovitost zdravljenja.^{22,23,25}

Zaključek

MiRNA igrajo ključno vlogo pri napredovanju melanoma, vplivajo na metastaziranje, invazivnost, proliferacijo in razvoj odpornosti na terapije ter modulirajo odzivnost na imunoterapijo. Nekatere miRNA obetajo kot biomarkerji za zgodnjo diagnozo, druge kot terapevtske tarče. Kombinacija tarčnih zdravil in miRNA pristopov lahko izboljša klinične izide, še posebej pri napredovalih oblikah bolezni. Za uresničitev tega potenciala so nujne nadaljnje raziskave, sistematična klinična preskušanja in tehnološke izboljšave, ki bodo razjasnile kompleksno delovanje miRNA v TME.

Literatura

1. Arnold M, et al. Burden of Cutaneous Melanoma in 2020 and Projections to 2040. *JAMA Dermatol.* 2022;158(5):495-503.
2. O'Brien J, Hayder H, Zayed Y, Peng C. Overview of MicroRNA Biogenesis, Mechanisms of Actions, and Circulation. *Front Endocrinol (Lausanne).* 2018;9:402.
3. Poniewierska-Baran A, et al. Role of miRNA in Melanoma Development and Progression. *Int J Mol Sci.* 2022;24(1):201.
4. Ghafouri-Fard S, Gholipour M, Taheri M. MicroRNA Signature in Melanoma: Biomarkers and Therapeutic Targets. *Front Oncol.* 2021;11:608987.
5. Saliminejad K, et al. An overview of microRNAs: Biology, functions, therapeutics, and analysis methods. *J Cell Physiol.* 2019;234(5):5451-5465.
6. Varrone F, Caputo E. The miRNAs Role in Melanoma and in Its Resistance to Therapy. *Int J Mol Sci.* 2020;21(3):878.
7. Poniewierska-Baran A, et al. MicroRNA as a Diagnostic Tool, Therapeutic Target and Potential Biomarker in Cutaneous Malignant Melanoma Detection-Narrative Review. *Int J Mol Sci.* 2023;24(6):5386.
8. Prodan M, et al. Prognostic Significance of miRNA Subtypes in Melanoma: A Survival Analysis and Correlation with Treatment Response Across Patient Stages. *Biomedicines.* 2024;12(12):2809.
9. Eyyapan G, Ozdem B, Aksoy G. miRNAs in melanoma: diagnostic, prognostic, and therapeutic strategies. *Biomed Res Ther.* 2024;11(11):6912-6922.
10. Mumford SL, et al. Circulating MicroRNA Biomarkers in Melanoma: Tools and Challenges in Personalised Medicine. *Biomolecules.* 2018 Apr 26;8(2):21.
11. Gajos-Michniewicz A, Czyz M. Role of miRNAs in Melanoma Metastasis. *Cancers (Basel).* 2019;11(3):326.
12. Dong L, et al. The Roles of MiRNAs (MicroRNAs) in Melanoma Immunotherapy. *Int J Mol Sci.* 2022;23(23):14775.
13. Jones N, Nonaka T. Circulating miRNAs as biomarkers for the diagnosis in patients with melanoma: systematic review and meta-analysis. *Front Genet.* 2024;15:1339357.
14. Fattore L, et al. MicroRNAs in melanoma development and resistance to target therapy. *Oncotarget.* 2017;8(13):22262-22278.
15. Thyagarajan A, et al. MicroRNA-Directed Cancer Therapies: Implications in Melanoma Intervention. *J Pharmacol Exp Ther.* 2018 ;364(1):1-12.
16. Motti ML, et al. MicroRNAs as Key Players in Melanoma Cell Resistance to MAPK and Immune Checkpoint Inhibitors. *Int J Mol Sci.* 2020;21(12):4544.
17. Stark MS, et al. The Prognostic and Predictive Value of Melanoma-related MicroRNAs Using Tissue and Serum: A MicroRNA Expression Analysis. *EBioMedicine.* 2015;2(7):671-80.
18. Hamilton BA, Wright JF. Challenges Posed by Immune Responses to AAV Vectors: Addressing Root Causes. *Front Immunol.* 2021;12:675897.
19. Melnik BC. MiR-21: an environmental driver of malignant melanoma? *J Transl Med.* 2015;13:202.
20. Geisler A, Fechner H. MicroRNA-regulated viral vectors for gene therapy. *World J Exp Med.* 2016;6(2):37-54.
21. Mirzaei H, et al. MicroRNAs as potential diagnostic and prognostic biomarkers in melanoma. *Eur J Cancer.* 2016;53:25-32.
22. Fortunato O, Iorio MV. The Therapeutic Potential of MicroRNAs in Cancer: Illusion or Opportunity? *Pharmaceuticals (Basel).* 2020;13(12):438.
23. Sabato C, et al. A novel microRNA signature for the detection of melanoma by liquid biopsy. *J Transl Med.* 2022;20(1):469.
24. Neagu M, et al. miRNAs in the Diagnosis and Prognosis of Skin Cancer. *Front Cell Dev Biol.* 2020;8:71.
25. Merk DJ, et al. CRISPR-Cas9 screens reveal common essential miRNAs in human cancer cell lines. *Genome Med.* 2024;16(1):82.

POVZETKI

SEKUNDARNE NAJDBE OB GENETSKEM TESTIRANJU BOLNIC IN BOLNIKOV Z RAKOM DOJK V OBDOBJU 2015-2024

Eva Avsec^{1,2}, Ana Blatnik^{1,2}, Simona Hotujec¹, Vida Stegel³, Mateja Krajc^{1,2}

¹ Oddelek za onkološko klinično genetiko, Onkološki inštitut Ljubljana, Ljubljana, Slovenija

² Medicinska fakulteta, Univerza v Ljubljani, Ljubljana, Slovenija

³ Oddelek za molekularno diagnostiko, Onkološki inštitut Ljubljana, Ljubljana, Slovenija

Elektronski naslov: eavsec@onko-i.si

Rezultati genetskega testiranja (GT) so za bolnike z rakom pomembni za načrtovanje zdravljenja in preventivnih ukrepov. Ob GT lahko odkrijemo patogene in verjetno patogene različice (P/VPR) v genih, ki niso neposredno povezani z indikacijo za GT - imenujemo jih sekundarne najdbe (SN). V evropskem prostoru so strokovnjaki glede poročanja SN zadržani, Ameriško združenje za medicinsko genetiko in genomiko pa od leta 2013 redno objavlja posodobljen seznam genov, ki so pomembni za posameznika, in priporoča poročanje P/VPR v teh genih ob vsakem GT. Praksa številnih laboratorijev in genetskih centrov v Evropi je poročanje SN, za katere je možno preventivno ukrepanje za preprečevanje in zmanjšanje tveganja za nastanek bolezni pri testiranih ali njihovih svojcih.

p1

Na Onkološkem inštitutu Ljubljana (OIL) od leta 2014 opravljamo GT za dedne predispozicije za nastanek tumorjev z uporabo večgenskega panela po metodi sekvenciranja naslednje generacije. Do leta 2019 je bil v uporabi panel Trusight Cancer (Illumina), ki je vseboval 94 genov, od leta 2019 naprej pa Trusight Hereditary Cancer (Illumina), ki vsebuje 113 genov, povezanih z do sedaj znanimi dednimi predispozicijami za nastanek raka. Po predtestnem genetskem svetovanju ob izpolnjenih merilih za GT specialist klinične genetike določi primarno indikacijo za GT in s tem izbere v naprej dogovorjen nabor preiskovanih genov. Največkrat pri bolnikih in bolnicah z rakom dojk tako opravimo GT za virtualni panel dednega raka dojk in/jajčnikov (panel HBOC – *angl. hereditary breast and ovarian cancer syndrome*), ki vključuje 19 genov: *ATM, BARD1, BRCA1, BRCA2, BRIP1, CDH1, CHEK2, EPCAM, MLH1, MSH2, MSH6, NF1, PALB2, PMS2, PTEN, RAD51C, RAD51D, STK11, TP53*. Zaradi specifične tehnologije so v bioinformacijskih podatkih vidne tudi spremembe v drugih genih, ki so zajeti v uporabljenem panelu Trusight Cancer/Hereditary Cancer (Illumina). Pri posameznikih z rakom dojk brez druge indikacije za GT so vse odkrite P/VPR v genih izven virtualnega panela HBOC t.i. SN. Kadar so za nosilce SN na voljo preventivni ukrepi v smislu preprečevanja in/ali zgodnjega odkrivanja raka, jih po predhodnem soglasju preiskovanca poročamo.

Namen naše raziskave je bil ugotoviti pogostnost in vrsto SN ob GT bolnic/bolnikov z rakom dojk s panelom HBOC.

V analizo smo vključili bolnice in bolnike z rakom dojk, ki so na OIL opravili GT s panelom HBOC v 10-letnem obdobju od leta 2015 do konca 2024. Pridobili smo njihove genetske izvide in relevantno medicinsko dokumentacijo ter določili število testiranih, pri katerih smo poročali SN.

Kriterije za vključitev v raziskavo je izpolnjevalo 5261 bolnic in bolnikov z rakom dojk. Pri 923 testiranih (17,5 %) je bil rezultat testa pozitiven. SN smo ugotovili pri 14 posameznikih (0,3 % vseh testiranih, 1,5 % vseh pozitivnih). Pri 3-eh bolnicah z rakom dojk smo ugotovili P/VPR v genih *BLM, NTHL1* in *MSH3* v homozigotni obliki. Pri 9-ih bolnicah in 1 bolniku smo odkrili P/VPR v genih *BAP1, CDC73, CDKN2A (2x), HOXB13 (3x), FLCN, RET, SDHAF2*. Pri 1 bolnici je bila odkrita SN v genu *APC* v mozaični obliki.

Naša raziskava je pokazala, da lahko ob GT odkrijemo P/VPR v genih, ki niso povezani z rakom dojk in ki jih glede na podatke o bolnikih in njihovih družinah nismo pričakovali. Ker so nekatere dedne predispozicije za raka izjemno redke, spekter rakov, ki se pojavljajo pri nosilcih, ni vedno jasno

opredeljen. Danes je znano, da je tveganje za nastanek raka dojk lahko povečano tudi v primeru P/VPR nekaterih genov, omenjenih v naši raziskavi (*BLM*, *NTHL1*), vendar teh genov nimamo v panelu HBOC. Zarodne P/VPR v genih *BAP1*, *CDKN2A* in *FLCN* dosedanje študije potencialno povezujejo s povišanim tveganjem za nastanek raka dojk, pri drugih (*APC*, *CDC73*, *HOXB13*, *RET*, *SDHAF2*) povezave vsaj zaenkrat ni. Nosilcem dednih predispozicij za nastanek tumorjev moramo vedno omogočiti informativno genetsko svetovanje, posebno pa to velja v primerih SN, ko so najdbe po GT nepričakovane.

SPREMEMBE V INVAZIVNOSTI GLIOBLASTOMSKIH CELIC PO REVERZIBILNI ELEKTROPORACIJI

Anja Blažič, Bernarda Majc, Metka Novak, Barbara Breznik, Lea Rems

Fakulteta za elektrotehniko, Univerza v Ljubljani, Ljubljana, Slovenija

Elektronski naslov: anja.blazic@fe.uni-lj.si

Glioblastom je najpogostejši in najbolj agresiven maligni primarni možganski tumor pri odraslih, za katerega so značilni hitra rast, širjenje v zdravo možgansko tkivo in izrazita heterogenost med pacienti. Kljub zdravljenju z več terapevtskimi pristopi, ki vključuje kirurški poseg, radioterapijo in kemoterapijo s temozolomidom, ostaja mediana preživetja bolnikov po postavljeni diagnozi približno 15 mesecev. Zaradi omejene učinkovitosti standardnih terapij se vse pogosteje raziskujejo novi pristopi, med njimi tudi terapije, ki temeljijo na elektroporaciji. Mednje sodijo elektrokemoterapija, ki omogoča boljši vnos kemoterapevtikov v tumorske celice, ter ireverzibilna elektroporacija, ki deluje kot metoda netermične ablacije tumorskega tkiva. Naša raziskava je bila usmerjena v razumevanje vpliva elektroporacije na tumorske celice, ki bi zdravljenje z elektroporacijo preživele. Zlasti pri tumorjih z izrazito infiltracijo v zdravo tkivo, kot je značilno za glioblastom, se takšne celice lahko pojavijo na obrobju tretiranega območja zaradi neenakomerne porazdelitve električnega polja okrog elektrod. Tumorske celice, ki preživijo elektroporacijo, pa se lahko ohranijo tudi pri elektrokemoterapiji, kadar so izpostavljene prenizki koncentraciji kemoterapevtikov. Invazivnost glioblastomskih celic predstavlja eno največjih ovir za dolgotrajno obvladovanje bolezni, posledično pa je razumevanje teh učinkov bistveno za nadaljnji razvoj terapij temelječih na elektroporaciji.

Pet glioblastomskih celičnih linij, pridobljenih iz vzorcev pacientov, smo najprej ovrednotili glede na njihovo osnovno invazivno sposobnost. V nadaljnjo analizo smo vključili dve najbolj invazivni celični liniji (NIB140 CORE in NIB216 CORE). Celice v suspenziji smo izpostavili reverzibilni elektroporaciji (1 kV/cm) z uporabo visokofrekvenčnih bipolarnih električnih pulzov. Jakost električnega polja smo določili na podlagi krivulj permeabilizacije in preživetja celic po elektroporaciji, in sicer z barvanjem s propidijevim jodidom ter analize na pretočnem citometru. Spremembe v invazivnosti smo ocenili z uporabo migracijskega »transwell« testu, molekularne spremembe pa ovrednotili z analizo RNA-sekvenciranja, pri čemer smo oboje izvedli 24 ur po izpostavitvi celic zunanemu električnemu polju.

Reverzibilna elektroporacija je povečala invazivno sposobnost pri obeh testiranih celičnih linijah, vendar ne v enaki meri. NIB140 CORE je pokazala konsistentno in izrazito povečanje števila invazivnih celic, s 3,7-kratnim (274 %) porastom v primerjavi s kontrolo. V liniji NIB216 CORE je bil odziv manj izrazit in bolj variabilen (1,3-krat; 30 %). Analiza transkriptoma v NIB140 CORE je razkrila spremembe v izražanju genov, povezanih z organizacijo zunajceličnega matriksa in aktivnostjo ionskih kanalov, kar je skladno z aktivacijo signalnih poti, ki uravnavajo invazijo in migracijo tumorskih celic. Ti rezultati nakazujejo molekularno ozadje opaženih sprememb, ki pa jih je potrebno dodatno potrditi na funkcionalni ravni.

Rezultati raziskave opozarjajo na potencialno tveganje, da bi glioblastomske celice, ki preživijo reverzibilno elektroporacijo, lahko pridobile povečano sposobnost invazije in tako prispevale k ponovni rasti ali širjenju tumorja. Obe celični liniji sta pokazali različne transkriptomске in funkcionalne odzive, kar poudarja biološko raznolikost tumorjev med posameznimi pacienti. Glede na omejitve dvodimenzionalnih celičnih kultur pa bi bilo te učinke smiselno potrditi tudi v fiziološko bolj ustreznih tridimenzionalnih modelih, kot so večcelični sferoidi oz. organoidi.

UČINKI OBSEVANJA MIŠJIH TUMORJEV NA NAUČENO IMUNOST IN NARAVNE CELICE UBIJALKE

Tim Božič¹, Boštjan Markelc^{1,2}, Barbara Lisec¹, Iva Šantek^{1,3}, Simona Kranjc Brezar^{1,3}, Živa Pišljarič¹, Tanja Jesenko^{1,3}, Maja Čemažar^{1,4}

¹ Oddelek za eksperimentalno onkologijo, Onkološki inštitut Ljubljana, Ljubljana, Slovenija

² Biotehniška fakulteta, Univerza v Ljubljani, Ljubljana, Slovenija

³ Medicinska fakulteta, Univerza v Ljubljani, Ljubljana, Slovenija

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

Elektronski naslov: tbozic@onko-i.si

Naučena imunost, pri kateri celice prirojene imunosti razvijejo lastnosti podobne imunskemu spominu kot je to značilno za celice pridobljene imunosti, je povezana tudi z rakom. Med celicami prirojene imunosti, ki so bile podvržene naučeni imunosti, kažejo spominske celice naravnih ubijalk (mNK) obetavne cilje za terapijo, bodisi samostojno bodisi v kombinaciji s standardnimi zdravljenji, kot je radioterapija. Kljub temu učinki obsevanja na celice NK niso povsem znani, zlasti med različnimi dozami obsevanja in različnimi obsevalnimi režimi. V trenutni literaturi naj bi frakcionirana radioterapija spodbudila delovanje celic NK, je za napredek terapij, ki temeljijo na celicah NK, nujno globlje razumevanje vpliva obsevanja na celice NK v tumorjih.

V naši raziskavi smo določevali učinke obsevanja mišjih tumorjev na: a) zaostanek v rasti tumorjev po obsevanju, b) infiltracijo celic NK v tumorsko mikrookolje, c) izražanje citokinov povezanih z migracijo celic NK v tumorje, d) nastanek celic mNK v bezgavkah ter e) ovrednotiti citotoksično funkcijo z IR induciranih celic mNK. Mišji tumorji kolorektalnega raka CT26 in raka dojke 4T1 so bili obsevani z enkratnimi (3 Gy, 5 Gy, 10 Gy, 15 Gy) ali frakcioniranimi (3 × 1 Gy, 3 × 2 Gy, 3 × 5 Gy, 3 × 7 Gy) režimi obsevanja, kar je povzročilo z dozo obsevanja naraščajoči zaostanek v rasti tumorjev. Imunofluorescenčna mikroskopija tumorskih rezin je pokazala povečano infiltracijo grancim B pozitivnih celic NK v tumorjih CT26 po obsevanju s 3 × 5 Gy tako na 3. kot na 7. dan v primerjavi s kontrolo, medtem ko so imeli tumorji 4T1 po obsevanju omejeno infiltracijo celic NK. Določevanje izražanja genov obsevanih tumorjev z qRT-PCR, je pokazalo povečano izražanje vnetnih citokinov *Ccl5*, *Cxcl9*, *Cxcl10* in *Cxcl16* povezanih z infiltracijo NK celic v tumorje. Analiza pretočne citometrije mišjih bezgavk na 14. dan po intraperitonealni indukciji z LPS je pokazala, da je LPS, uporabljen kot pozitivna kontrola, sprožil nastanek različnih populacij celic NK, vključno z zreliimi celicami mNK.

V nadaljnjih poskusi bomo določili, ali lahko obsevanje tumorjev inducira nastanek celic mNK in v kolikšni meri v primerjavi s kontrolno ter z LPS-om tretirano skupino. Rezultati bodo pojasnili kako obsevanje tumorjev vpliva na populacije celic NK in pomagali pri izboljšanju terapij, ki temeljijo na celicah NK.

p3

VPLIV MEMBRANSKE FILTRACIJE IN TEKOČINSKE CITOLOGIJE V DIAGNOSTIKI CITOPATOLOGIJE URINA

Damjana Cimerman, Margareta Žlajpah, Margareta Strojan Fležar

Inštitut za patologijo, Medicinska fakulteta, Univerza v Ljubljani, Ljubljana, Slovenija

Elektronski naslov: damjana.cimerman@mf.uni-lj.si

Citopatologija urina je neinvazivna, hitra, enostavna in poceni diagnostična metoda za odkrivanje urotelnega karcinoma visokega gradusa, ki spada med deset najpogostejših karcinomov tako na svetovni ravni kot tudi v Sloveniji.¹ Urotelni karcinom visokega gradusa najpogosteje odkrijemo s citopatološkim pregledom urina, katerega izvid je zapisan v standardizirani obliki, ki je predpisana v Pariškem sistemu za poročanje urinske citologije (*angl.* The Paris System for Reporting Urinary Cytology (TPS)). TPS vsebuje sedem diagnostičnih kategorij, kjer ima vsaka izmed njih specifične citomorfološke kriterije.²

Za umestitev citomorfoloških sprememb urotelnih celic v specifično diagnostično kategorijo TPS sta poleg znanja citopatologa nadvse pomembna tudi način in kakovost priprave urinskih vzorcev. Zanimalo nas je, ali način priprave preparata urinskega vzorca vpliva na kakovost laboratorijske obdelave in diagnostiko citologije urina, zato smo primerjali pripravo preparata urinskega vzorca z membransko filtracijo in pripravo preparata s sistemom ThinPrep. Starejši način priprave preparata urinskega vzorca je z membransko filtracijo, kjer smo vzorce urina filtrirali čez 20 µm filter. Vse celice iz urinskega vzorca, ki so ostale na okroglem membranskem filtru, smo ročno odtisnili na dve objektivi stekli na način, da so na vsakem objektivu steklu odtisnjene vse celice polovice kroga membranskega filtra. Priprava preparata ThinPrep pa je potekala po navodilih proizvajalca. Preparati so bili nato fiksirani in pobarvani po Papanicolaou.

Z uvedbo tekočinske citologije je postala priprava preparatov urinskih vzorcev s sistemom ThinPrep standardizirana, čeprav je bil pregledan le delež vseh celic urinskega vzorca v primerjavi z membransko filtracijo. Strukture celice so bile pri pripravi preparata s sistemom ThinPrep ohranjene. Oteženo ocenjevanje citomorfoloških značilnosti sta pri pripravi preparatov z membransko filtracijo povzročali degeneracija celic, ki je bila posledica ročnega odtisa vseh celic membranskega filtra na objektiva stekla, in slaba fiksacija, kjer so bile slabo fiksirane celice citomorfološko povečane ter struktura kromatina zabrisana. Tudi ozadje urinskih vzorcev se je z uvedbo tekočinske citologije spremenilo, saj je v primerjavi z membransko filtracijo veliko manj neceličnih komponent (drobirja) in je tako bolj čisto. Največja razlika se je pokazala pri ocenjevanju kromatinske strukture jeder urotelnih celic. S primerjavo obeh metod priprave urinskih vzorcev smo ugotovili, da so jedra atipičnih urotelnih celic v urinskih vzorcih, pripravljenih s sistemom ThinPrep, bolj svetla, hipokromna, kromatinska struktura jeder večinoma drobnozrnata. V urinskih vzorcih, pripravljenih z membransko filtracijo pa so bila jedra atipičnih urotelnih celic in urotelnega karcinoma visokega gradusa temna, hiperkromna, večkrat s povsem zabrisano kromatinsko strukturo. Žlezne celice (žlezna metaplazija) so zlasti v vzorcih izpirkov sečnega mehurja, pripravljenih s sistemom ThinPrep, manj prepoznavne, ker se celice v suspenziji pred nanosom na objektiva steklo skrčijo zaradi predhodne fiksacije, medtem ko smo v vzorcih, pripravljenih z membransko filtracijo, žlezne celice zlasti v izpirkih sečnega mehurja pogosto prepoznali. Prav tako smo lahko v urinskih vzorcih, pripravljenih z membransko filtracijo, urinske kristale po obliki celo opredelili, medtem ko so urinski kristali v vzorcih, pripravljenih s sistemom ThinPrep večinoma razdrobljeni.

Ugotovili smo, da ima način priprave urinskega preparata pomemben vpliv na kakovost laboratorijske obdelave in diagnostiko citologije urina. Pokazali smo, da priprava s sistemom ThinPrep omogoča standardizacijo postopka, pri čemer je morfologija celic dobro ohranjena. Poleg tega metoda ThinPrep

omogoča tudi izvedbo dodatnih imunocitokemičnih in molekularno genetskih preiskav na istem urinskem vzorcu.

Literatura

1. Jubber I, et al. (2023). Epidemiology of Bladder Cancer in 2023: A Systematic Review of Risk Factors. *Eur Urol*, 84(2), 176–190.
2. Kurtycz DFI, et al. (2020). The Paris system of Reporting Urinary Cytology: Strengths and opportunities. *Diagn Cytopathol*, 48(10), 890–895.

BAKTERIOFAGI KOT NOSILCI TUMORSKIH ANTIGENOV: NOVA STRATEGIJA V IMUNOTERAPIJI RAKA

Andrej Cör^{1,2}, Nuša Brišar², Simona Kranjc Brezar³, Katja Šuster¹

¹ Ortopedska bolnišnica Valdoltra, Ankaran, Slovenija

² Fakulteta za vede o zdravju, Univerza na Primorskem, Izola, Slovenija

³ Onkološki Inštitut Ljubljana, Ljubljana, Slovenija

Elektronski naslov: andrej.coer@ob-valdoltra.si

Osnovni mehanizem delovanja protitumorskih cepiv temelji na aktivaciji tumorsko specifičnih T-limfocitov. Ti prepoznajo in uničujejo tumorske celice, potem ko jim ustrezne tumorske antigene predstavijo antigen predstavitvene celice (APC). V klinični praksi se je pokazalo, da so peptidna cepiva sicer obetavna in učinkovita pri sprožanju specifičnega imunskega odziva, a imajo številne omejitve. Njihova priprava je zahtevna, pogosto zelo draga, hkrati pa peptidi sami po sebi kažejo nizko imunogenost in slabo biokemično stabilnost. Zaradi teh pomanjkljivosti se raziskovalci usmerjajo k razvoju alternativnih nosilcev antigenov, pri čemer posebno mesto zasedajo virusni sistemi, saj jih APC učinkovito prepoznajo, internalizirajo, procesirajo na njih predstavljene tumorske antigene ter jih predstavijo imunskemu sistemu.

Med novejšje in inovativne pristope sodi uporaba bakteriofagov. Bakteriofagi (krajše fagi) so virusi, ki naravno okužijo zgolj bakterije in so zato varni za uporabo pri sesalcih, saj ne okužijo evkariontskih celic. V zadnjih letih so fagi najbolj prepoznavni zaradi svoje vloge pri premagovanju naraščajoče protibakterijske odpornosti, vendar imajo bistveno širši potencial. Fage je mogoče zelo enostavno genetsko prilagoditi, so izjemno stabilni in ponujajo veliko površino za predstavitev tujih antigenov. S tehniko predstavitve na fagu lahko njihov genom spremenimo tako, da na površini izražajo različne peptide ali proteine. Ker so fagi že sami po sebi do neke mere imunogeni, njihova modifikacija dodatno spodbuja aktivacijo tako prirojene kot pridobljene imunosti, in sicer tako humoralne kot celične. Zaradi teh lastnosti se fagi uvrščajo med obetavne nanodelce za razvoj novih cepiv, vključno s protitumorskimi.

Namen naše raziskave je bil razviti cepivo na osnovi bakteriofagov ter preveriti njegovo protitumorsko učinkovitost na mišjem modelu malignega melanoma. Dodatno nas je zanimalo, ali se fagno cepivo lahko kombinira z drugimi oblikami imunoterapije raka, zlasti z genskimi pristopi, ki povečujejo imunsko aktivacijo v tumorju.

S pomočjo tehnike predstavitve na fagu smo filamentozne bakteriofage M13 genetsko spremenili tako, da so na površini izražali tri različne tumorske peptide: MAGE-A1, gp100 in MAET-1/MELAN-A. Pripravili smo koktajl treh modificiranih fagov in terapevtski potencial tako pripravljenega cepiva preizkusili *in vivo* na mišjem modelu melanoma B16-F10 pri sevih C57BL. Cepivo smo preizkušali samostojno in v kombinaciji z genskim elektroprenosom (GET) plazmida, ki kodira citokin IL-12. GET omogoča učinkovit vnos plazmidne DNK neposredno v tkiva, kar privede do lokalne tvorbe IL-12, enega ključnih imunostimulacijskih dejavnikov, ki spodbuja diferenciacijo T-celic in krepi protitumorsko imunost.

Uspešnost izražanja antigenov na površini fagov smo potrdili s testom ELISA in masno spektrometrijo, imunski odziv pa smo dodatno ovrednotili z imunocitokemijo. Rezultati so pokazali, da je bila pri miših, ki so prejele modificirane fage, rast tumorjev značilno zavrta. Poleg tega se je življenjska doba teh miši izrazito podaljšala – petkrat v primerjavi z nezdravljenimi kontrolami in štirikrat v primerjavi z živalmi, ki so prejele nemodificirane fage. Še posebej obetavni so bili rezultati v kombinirani skupini: pri miših, ki so hkrati prejemale GET-IL-12 in fagno cepivo, smo pri 30 % živali dosegli popolni odziv, kar pomeni popolno regresijo tumorja. Pomembno je tudi, da zdravljenje ni povzročilo zaznavnih

neželenih učinkov, kar kaže na varnost uporabljenega pristopa.

Rezultati kažejo, da ima kombinacija gensko spremenjenih fagov in GET plazmida IL-12 velik terapevtski potencial. Z nadaljnjim razvojem fagnih cepiv se krepi možnost njihove klinične uporabe pri zdravljenju in preprečevanju melanoma, kot tudi drugih oblik raka.

SERUM-BASED STEROID-PROTEIN PANELS FOR DIFFERENTIATING OVARIAN CANCER FROM NON-MALIGNANT ADNEXAL TUMORS

Marija Gjorgoska¹, Boštjan Pirš², Špela Smrkolj³, Tea Lanišnik Rižner⁴

¹ Institute of Biochemistry and Molecular Genetics, Faculty of Medicine, University of Ljubljana, Ljubljana, Slovenia

² Department of Gynecology, University Medical Centre, Ljubljana, Slovenia

³ Department of Gynecology and Obstetrics, Faculty of Medicine, University of Ljubljana, Ljubljana, Slovenia

⁴ Institute of Biochemistry and Molecular Genetics, Faculty of Medicine, University of Ljubljana, Ljubljana, Slovenia

Elektronski naslov: marija.gjorgoska@mf.uni-lj.si

Ovarian cancer is the deadliest gynecological malignancy, largely due to the advanced stage at diagnosis in most patients. This study investigates whether systemic steroids can serve as biomarkers to distinguish malignant ovarian tumors from non-malignant adnexal masses.

This prospective, single-center observational study included 99 women with adnexal masses who underwent surgery between December 2021 and February 2025. Preoperative serum levels of 17 steroid hormones—including androgens, 11-oxyandrogens, glucocorticoids, and mineralocorticoids—were quantified using liquid chromatography-tandem mass spectrometry (LC-MS/MS). Machine learning was employed to assess the diagnostic potential of these steroids in distinguishing ovarian cancer (n=43) from non-malignant adnexal masses (n = 56).

Patients with ovarian cancer had lower levels of 11 β -hydroxy-testosterone (11OHT), 11-keto-testosterone (11KT), and testosterone compared to those with non-malignant adnexal masses. Using stepwise feature selection, we developed two diagnostic models incorporating three 11-oxyandrogens (11KT, 11OHT, and 11 β -hydroxy-androstenedione), patient age, and either cancer antigen 125 (CA-125) or human epididymis protein 4 (HE4) for distinguishing malignant from non-malignant adnexal masses. The model including CA-125 achieved AUC of 0.907, 88.9% sensitivity and 82.0% specificity, while the model including HE4 achieved AUC of 0.911, 94.4% sensitivity and 77.3% specificity as evaluated by cross-validation. Both models significantly outperformed CA-125, HE4, and the Risk of Ovarian Malignancy Algorithm (ROMA) index alone.

Patients with ovarian cancer exhibit distinct steroid profiles compared to those with non-malignant adnexal masses. If validated, the models could enhance diagnosis, reducing unnecessary surgeries for benign conditions while ensuring timely treatment for ovarian cancer, particularly when conventional biomarkers are inconclusive.

VPLIV SISTEMSKÉ TERAPIJE NA CIRKULIRAJOČE TUMORSKE CELICE IN SKUPKE CIRKULIRAJOČIH TUMORSKIH CELIC

Klara Grad, Sara Šauer, Erika Matos, Domen Ribnikar, Nataša Snoj, Tanja Ovčariček, Veronika Škrjanc, Živa Pišljar, Maja Čemažar, Simona Miceska, Tanja Jesenko, Veronika Kloboves-Prevodnik, Cvetka Grašič Kuhar

Onkološki inštitut Ljubljana, Ljubljana, Slovenija

Elektronski naslov: kgrad@onko-i.si

Cirkulirajoče tumorske celice (CTC) in skupki CTC so predhodniki oddaljenih zasevkov. V dosedanjih študijah, kjer so bile uporabljene različne metode izolacije, so bile CTC in skupki CTC pri zgodnjem raku dojke zaznani zelo redko in niso napovedovali patološke kompletne remisije (pCR).

Namen je bil ugotoviti incidenco posamičnih CTC in skupkov CTC pri bolnicah z zgodnjim rakom dojke ter vpliv neoadjuvantne sistemske terapije (NST) na CTC, skupke CTC ter doseg pCR.

V prospektivno neintervencijsko raziskavo GALIA vključujemo bolnice z visoko tveganim zgodnjim rakom dojke, ki so zdravljene z NST. Analizo CTC opravimo iz 10 ml vzorca venske krvi odvzete iz centralnega venskega kanala v treh časovnih točkah: T1 (pred NST), T2 (sredi zdravljenja z NST) in T3 (po zaključeni NST - pred operacijo). CTC izoliramo z uporabo sistema Parsortix® in pripravimo citospin obarvan z barvilom Giemsa za citomorfološko oceno. Analiziramo frekvenco, velikost, in dinamiko CTC in skupkov CTC med NST ter njihovo morebitno povezavo s kliničnimi značilnostmi bolnic, tumorja in vpliva zdravljenja na pCR.

Doslej smo vključili 26 bolnic. Mediana starosti bolnic je bila 50 let (IQR 38–59); 42 % je imelo pozitivne pazdušne bezgavke, 77% jih je bilo v stadiju II in 23 % v stadiju III. 11,5 % bolnic je imelo vnetni rak. Podtip raka je bil: trojno negativen (57,7 %), HER2+ (38,5 %) in luminalni B (3,8 %). NST je bila shema Keynote 522 (53,8 %) ali kemoterapija/trastuzumab/pertuzumab (38,5 %). CTC so bile prisotne ob času T1 v 100 %, času T2 v 91 % in času T3 v 59 %. CTC skupki so bili prisotni ob času T1 v 73%, ob času T2 v 67 % in ob času T3 v 55 %. Pogostnost skupkov v času T1 ni bila povezana s stadijem bolezni ali podtipom raka. Povprečno število CTC (razpon) se je med NST zmanjšalo: 21 (2-99) ob času T1, 18 (0-55) ob času T2 in 15 (0-99) ob času T3. Prav tako se je zmanjšalo povprečno število CTC skupkov: 2,7 (0-31) ob času T1, 1,9 (0-6) ob času T2 in 1,4 (0-9) ob času T3. CTC skupki so vsebovali povprečno (razpon) naslednje število celic: 2,3 (2–6) ob času T1, 2,1 (2–5) ob času T2 in 2,2 (2–7) ob času T3. Med skupki CTC smo pogosteje zaznali heterotipne skupke, sestavljene iz CTC in nevtrofilcev ali monocitov ali trombocitov, kot pa homotipne skupke, sestavljene samo iz dveh ali več CTC. Heterotipni skupki so bili večji od homotipnih (ob času T1: 576 proti 350 μm^2 ; ob času T3: 575 proti 281 μm^2). Število heterotipnih in homotipnih CTC skupkov ob času T3 je bilo obratno sorazmerno s pCR (Spearmanov koeficient rho = -0,499 (p = 0,05) oziroma -0,829 (p < 0,001)).

CTC smo zaznali pri 100 %, CTC skupke pa pri 73 % bolnic z zgodnjim rakom dojke pred NST. Njihovo število je med zdravljenjem z NST upadalo. Heterotipni skupki CTC so prevladovali in so bili večji od homotipnih. Nižje število homotipnih in heterotipnih skupkov pred operacijo je napovedovalo večji delež pCR.

KLINIČNI POMEN CIRKULIRAJOČIH TUMORSKIH CELIC PRI RAKU DOJK

Cvetka Grašič Kuhar

Onkološki inštitut Ljubljana, Ljubljana, Slovenija

Elektronski naslov: cgrasic@onko-i.si

Cirkulirajoče tumorske celice (CTC) so tumorske celice, ki se odcepijo od primarnega tumorja in vstopijo v krvni obtok, kjer jih lahko pridobimo s pomočjo tekočinske biopsije. Predstavljajo začetek zasevkov v oddaljenih organih. Pri raku dojk je bilo ugotovljeno, da imajo CTC cirkadiani ritem sproščanja in se večina sproščanja dogaja ponoči v mirovanju. CTC se sproščajo kot posamične CTC, le v 2-5 % se sproščajo v obliki skupkov CTC, ki imajo znatno večji potencial zasevanja. Metaanaliza raziskav CTC pri zgodnjem raku dojk je pokazala, da prisotnost vsaj ene CTC/7,5 ml krvi (izolirane z metodo CellSearch®) pred neoadjuvantno terapijo pomeni slabšo prognozo glede ponovitve in preživetja. Podobno je pokazala tudi študija pred primarnim operativnim zdravljenjem in pred adjuvantno kemoterapijo (pri obeh je bila slabša prognoza pri ≥ 1 CTC/30 ml krvi, pri adjuvantni kemoterapiji pa še trikrat večje tveganje, če je bilo ≥ 5 CTC/30 ml krvi). CTC so bile prisotne v krvi tudi 2 in 5 let po operaciji ali kemoterapiji in so napovedovale večje tveganje za pozne ponovitve. Kljub dokazanem prognostičnem pomenu pa pri zgodnjem raku dojk CTC zaenkrat nimajo klinične uporabnosti. Raziskave v našem laboratoriju kažejo na to, da so že ob diagnozi zgodnjega raka dojk v krvi bolnikov prisotni ne samo CTC ampak tudi skupki CTC. Dinamika CTC skupkov med zdravljenjem ne korelira vedno s trenutnimi merili uspešnosti zdravljenja. Njihova genomska analiza bi nam omogočila boljši vpogled v mehanizme zasevanja.

Pri razsejanem raku dojk je ≥ 5 CTC/7,5 ml krvi ali prisotnost skupkov CTC slab napovedni dejavnik za progres in preživetje. Zelo pomembna je tudi dinamika števila CTC ob zdravljenju; bolniki z upadom na < 5 CTC/7,5 ml krvi imajo boljšo prognozo. Klinična uporabnost CTC je bila preučevana v več študijah faze II/III. Študija STIC-CTC je preučevala pomen števila CTC pri odločitvi o vrsti prvega razsoja hormonsko pozitivnega HER2- raka dojk. Pri bolnikih z nizkim kliničnim rizikom/visokimi CTC (≥ 5 CTC/7,5 ml krvi) je bilo zdravljenje s kemoterapijo bolj uspešno kot hormonska terapija. Številne študije s podobnim vprašanjem izbire najprimernejše terapije na podlagi CTC še potekajo v 1. in 2. liniji razsejanega raka dojk. Kasnejše raziskave so se osredotočile bolj na fenotip CTC, predvsem prisotnost receptorja HER2 (raziskava DETECT). Novejše raziskave uporabljajo agnostično izolacijo CTC na podlagi različne velikosti in deformabilnosti celic. Eden takih sistemov je Parsortix®, ki ga uporabljamo tudi v naši ustanovi, ki omogoča spremljanje ravni izražanja klinično uporabnih biomarkerjev in tudi sekvenciranje genov. S Parsortixom je mogoče izolirati tudi skupke CTC. Študija DICCT pri razsejanem raku dojk je inovativna v tem, da je bil njen cilj farmakološko učinkovanje na skupke CTC; z digoksinom so uspeli zmanjšati velikost skupkov.

CTC so pomemben napovedni dejavnik pri raku dojk pred in med zdravljenjem. V prihodnosti si obetamo bolj celosten multimodalen pristop raziskovanja biologije CTC. Po eni strani sočasna analiza genomskega, epigenomskega, transkriptomskega in proteomskega profila CTC na *ex vivo* modelih, ki jih ctDNA ne omogoča, po drugi strani pa vključitev več sočasnih parametrov v tekočinski analizi (ctDNK, vezikli, inflamatorni biomarkerji, CA 15-3).

MORFOLOŠKE ZNAČILNOSTI CIRKULIRAJOČIH TUMORSKIH CELIC IZOLIRANIH IZ CENTRALNE VENSKE KRVI BOLNIC Z ZGODNJIM RAKOM DOJK

Tanja Jesenko, Farah Edisa Krekić, Veronika Škrjanc, Živa Pišljar, Simona Miceska, Maja Čemažar, Veronika Kloboves-Prevodnik, Cvetka Grašič Kuhar

Onkološki inštitut Ljubljana, Ljubljana, Slovenija

Elektronski naslov: tjesenko@onko-i.si

Na Onkološkem inštitutu Ljubljana poteka prospektivna ne-intervencijska klinična raziskava GALIA, pri kateri raziskujemo pomen cirkulirajočih tumorskih celic (CTC) ter skupkov CTC pri bolnicah z zgodnjim rakom dojk. Bolnicam pred začetkom neoadjuvantne sistemske terapije odvzamemo vzorec centralne venske krvi (10 ml v epruveti K2EDTA) in CTC izoliramo na podlagi njihovih fizikalnih lastnosti z metodo Parsortix™ (Angle plc.). Za njihovo detekcijo uporabljamo rutinske citopatološke metode in imunofluorescenčno barvanje. Vzorce kohorte desetih bolnic smo pobarvali s kompletom za imunofluorescenčno barvanje Portrait+ CTC Staining Kit (Angle plc.). Komplet vsebuje jedrno barvilo, označena protitelesa proti epiteljskim označevalcem, mezenhimskim označevalcem ter mešanico označevalcev za krvne celice. Z analizo vzorcev smo CTC razvrstili v 2 veliki populaciji, ne-degenerirane CTC in degenerirane CTC. Ne-degenerirane CTC predstavljajo celice z morfološkiimi značilnostmi malignih celic, ki imajo jasen jedrni signal in so pozitivne na epiteljske označevalce ali vimentinske označevalce ali oboje in so negativne na barvanju za krvne celice. Za razliko od ne-degeneriranih celic pa populacijo degeneriranih CTC predstavljajo celice z odsotnim jedrnim signalom in očitnimi znaki celične degeneracije (brsti in vili na plazemski membrani). Pri obeh populacijah se lahko celice nahajajo v skupkih. V populaciji ne-degeneriranih CTC smo opazili tudi nekaj multicelularnih struktur, mikro-strdkov. Bolnice so v povprečju imele večje število degeneriranih CTC kot ne-degeneriranih CTC. Degenerirane CTC so bile v povprečju manjše od ne-degeneriranih, kar velja tudi v primeru skupkov CTC. Za ovrednotenje kliničnega pomena vseh opaženih populacij CTC bo potrebna nadaljnja analiza v večji kohorti bolnic in spremljanje njihovega dolgoročnega izida zdravljenja.

p9

RADIATION-INDUCED SKELETAL MUSCLE INJURY: MECHANISMS AND THERAPEUTIC PERSPECTIVES

Mihaela Jurdana¹, Maja Čemažar^{1,2}

¹ Faculty of Health Sciences, University of Primorska, Izola, Slovenia.

² Institute of Oncology Ljubljana, Ljubljana, Slovenia

Elektronski naslov: mihaela.jurdana@upr.si

Radiotherapy remains a cornerstone of cancer treatment. However, it often leads to unintended damage to adjacent healthy tissue, including skeletal muscle. Ionizing radiation induces oxidative stress and chronic inflammation, leading to impaired muscle regeneration and long-term loss of function. While adult skeletal muscle is generally considered resistant to low to moderate doses of ionizing radiation, higher doses can still cause significant damage. In contrast, developing skeletal muscle is highly sensitive to radiation, which makes radiotherapy in children particularly worrying as it can lead to muscle atrophy and permanent deficits in muscle function.

The main mechanisms underlying radiation-induced muscle damage include depletion and dysfunction of satellite cells, disruption of myogenic differentiation and defects in tissue remodeling. Irradiation also promotes fibrosis and vascular injury in the muscle microenvironment, further exacerbating the failure of regeneration. In addition, dysregulation of cytokine signaling pathways impairs the activation and differentiation of satellite cells, exacerbating the regeneration deficit.

Taken together, these pathological changes contribute to persistent muscle weakness, reduced mobility and lower quality of life in cancer survivors. Emerging evidence suggests that therapeutic agents such as melatonin and specific growth factors may help mitigate radiation-induced muscle damage by preserving satellite cell function and modulating oxidative and inflammatory responses.

A deeper understanding of the molecular and cellular basis of radiation-induced muscle injury is crucial for the development of targeted interventions. Multidisciplinary strategies could significantly improve functional recovery and overall outcomes in patients receiving radiotherapy.

p10

GENSKA MODIFIKACIJA MEZENHIMSKIH MATIČNIH CELIC Z GENSKIM ELEKTROPRENOSOM ZA INTRATUMORSKO DOSTAVO INTERLEVKINA-12

Urška Kamenšek^{1,2}, Tim Božič¹, Maja Čemažar^{1,2,3}, Urban Švajger^{4,5}

¹ Oddelek za eksperimentalno onkologijo, Onkološki inštitut Ljubljana, Ljubljana, Slovenija

² Biotehniška fakulteta, Univerza v Ljubljani, Ljubljana, Slovenija

³ Zdravstvena Fakulteta, Univerza na Primorskem, Izola, Slovenija

⁴ Oddelek za terapevtske storitve, Zavod Republike Slovenije za transfuzijsko medicino, Ljubljana, Slovenija

⁵ Fakulteta za farmacijo, Univerza v Ljubljani, Ljubljana, Slovenija

Elektronski naslov: ukamensek@onko-i.si

Mezenhimske stromalne celice (MSC) predstavljajo obetavno orodje za tarčno dostavo genov v tumorje zaradi nizke imunogenosti, ki omogoča alogeno aplikacijo, ter njihovega naravnega tropizma do tumorskega tkiva. Poleg tega so enostavne za gojenje in manipulacijo v celični kulturi, kar omogoča njihovo učinkovito pridelavo za terapevtske namene. Kljub široki uporabi virusnih vektorjev za gensko spreminjanje MSC, so varnostni pomisleki spodbudili zanimanje za nevirusne metode, med katerimi izstopa genski elektroprenos (GET).¹ Namen naše raziskave je bil optimizirati pogoje GET za transfekcijo MSC, preučiti njihovo biodistribucijo po aplikaciji *in vivo* ter oceniti terapevtsko učinkovitost MSC, transfeciranih z interlevkinom-12 (IL-12), na mišjem modelu melanoma.²

p11

Človeške MSC smo izolirali iz popkovnic po etično odobrenih protokolih. Pogoje GET smo optimizirali z oceno učinkovitosti transfekcije in celične viabilnosti z uporabo fluorescenčnega poročevalskega gena. Biodistribucijo MSC smo analizirali po intravenski ali intratumorski aplikaciji MSC, transfeciranih z luminiscentnim poročevalskim genom, na mišjih tumorskih modelih. Terapevtski potencial z IL-12-transfeciranih MSC smo ovrednotili na singenem mišjem modelu melanoma B16F10.

Optimizirani GET protokol je omogočil do 80 % učinkovitost transfekcije ob 90 % ohranjeni celični viabilnosti. Raziskava biodistribucije je pokazala učinkovito zadrževanje MSC v tumorju po intratumorski aplikaciji, medtem ko so se po intravenski aplikaciji MSC akumulirale predvsem v pljučih. Intratumorska aplikacija z IL-12-transfeciranih MSC je pomembno zavrla rast tumorjev za pet dni v primerjavi s kontrolno skupino.

Naši rezultati potrjujejo, da optimizirani pogoji GET omogočajo visoko učinkovitost transfekcije ob ohranjeni vitalnosti MSC, kar potrjuje njihovo uporabnost kot vektorji za gensko terapijo. Čeprav tropizma MSC do tumorskega tkiva nismo uspeli potrditi, študija poudarja potencial GET kot zanesljive nevirusne platforme za gensko modifikacijo MSC in izpostavlja terapevtsko učinkovitost z IL-12-modificiranih MSC. Nadaljnji napredek na področju tarčne dostave in kombiniranih terapevtskih pristopov bo ključnega pomena za uresničevanje kliničnega potenciala genske terapije na osnovi MSC.

Literatura

1. Kamenšek U, et al. Antitumor Efficacy of Interleukin 12-Transfected Mesenchymal Stem Cells in B16-F10 Mouse Melanoma Tumor Model. *Pharmaceutics*. 2025;17(3):278.
2. Švajger U, Kamenšek U. Interleukins and interferons in mesenchymal stromal stem cell-based gene therapy of cancer. *Cytokine Growth Factor Rev*. 2024;77:76-90. .

UČINEK KOMBINACIJE ELEKTROKEMOTERAPIJE IN anti-PD-1 IMUNOTERAPIJE PRI MIŠJIH MODELIH TUMORJEV Z RAZLIČNIM IMUNSKIM STATUSOM

Simona Kranjc Brezar^{1,2}, Maša Omerzel^{1,3}, Urša Lamprecht Tratar^{1,4}, Tanja Jesenko^{1,2},
Barbara Lisec¹, Gregor Serša^{1,3}, Maja Čemažar^{1,5}

¹ Oddelek za eksperimentalno onkologijo, Onkološki inštitut Ljubljana, Ljubljana, Slovenija

² Medicinska fakulteta, Univerza v Ljubljani, Ljubljana, Slovenija

³ Zdravstvena fakulteta, Univerza v Ljubljani, Ljubljana, Slovenija

⁴ Veterinarska fakulteta, Univerza v Ljubljani, Ljubljana, Slovenija

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

Elektronski naslov: skranjc@onko-i.si

Elektrokemoterapija (EKT) z bleomicinom (BLM) je klinično potrjena lokalno ablativno zdravljenje, ki je zaradi svojih imunomodulatornih lastnosti vse bolj prepoznaven način zdravljenja raka. Glede na njeno sposobnost povzročanja imunogene celične smrti EKT predstavlja obetaven pristop za kombinirano terapijo z zaviralci imunskih kontrolnih točk, kot je anti-PD-1 terapija.

p12

V tej raziskavi smo ovrednotili učinkovitost kombinacije EKT z mišjim analogom anti-PD-1 pri singenih mišjih modelih različnega histološkega tipa in imunskega statusa: fibrosarkom WEHI, dveh kolorektalnih karcinomov CT26 in MC38 ter karcinom dojke 4T1.

V poskusih *in vitro* smo določili občutljivost celic fibrosarkoma WEHI-164, karcinomov debelega črevesa CT26 in MC38 in karcinoma dojke 4T1, na EKT z BLM z uporabo testa viabilnosti s Presto Blue reagentom. V nadaljevanju smo v poskusih *in vivo* (dovoljenje U34401-3/2022/17) na induciranih podkožnih tumorjih fibrosarkoma WEHI-164, kolorektalnih karcinomov CT26, MC38 in karcinoma dojke 4T1 vrednotili protitumorski učinek kombinacije EKT z BLM in anti-PD-1 s testom zaostanka rasti tumorjev in testom sekundarnega izziva (ponovna indukcija tumorjev pri miših, ki so bile ozdravljene 100 dni po zdravljenju). Da bi razjasnili vlogo tumorskega mikrookolja pri odgovoru tumorjev na zdravljenje smo izvedli imunohistološke analize (nekroza, Ki67, grancim B, infiltracija imunskih celic: CD4, CD8).

Poskusi *in vitro* so potrdili različno občutljivost celic na EKT BLM, pri čemer so fibrosarkomske celice WEHI izkazovale najvišjo občutljivost in celice kolorektalnega karcinoma MC38 najmanjšo občutljivost. V poskusih *in vivo* je učinkovito delovala že sama ECT, in sicer dosegli smo popolne odzive na zdravljenje (CR) pri 100 % tumorjev WEHI, 61 % CT26, 17 % 4T1 in 15 % MC38 tumorjev. Kombinacija EKT z anti-PD-1 je statistično značilno izboljšala izid zdravljenja pri manj odzivnih tumorskih modelih, s povečanjem deleža CR na 90 % pri CT26, 91 % pri MC38 in 53 % pri tumorjih 4T1. Imunohistokemična analiza je pokazala povečano infiltracijo CD4 in CD8 T-celic ter granzyme B⁺ citotoksičnih efektorskih celic, zlasti po kombiniranem zdravljenju. Po terapiji so se pojavile terciarne limfoidne strukture, zlasti v tumorjih MC38, kar kaže na močno aktivacijo imunskega sistema. V poskusih sekundarnega izziva na ozdravljenih miših je kombinirano zdravljenje povečalo delež miši z dolgotrajnim imunskim spominom v modelih tumorjev CT26 in MC38 ter induciralo dolgoročni imunski spomin tudi pri miših s tumorji 4T1, kar ni bilo doseženo z nobeno od monoterapij.

Ti rezultati poudarjajo potencial kombinacije EKT z zaviranjem PD-1 pri premagovanju imunske odpornosti v slabo imunogenih tumorjih ter podpirajo njeno klinično uporabo v okviru personalizirane imunoterapije raka.

PRILOŽNOSTI, RAZVOJ IN UPORABA UMETNE INTELIGENCE V IMUNOTERAPIJI RAKA

Karin Kunstelj^{1,2}, Neja Brumec^{1,3}, Luka Irenej Pečan⁴, Anja Tanšek⁵, Minja Zorc⁵,
Marko Jeran¹

¹ Odsek za anorgansko kemijo in tehnologijo, Institut "Jožef Stefan", Ljubljana, Slovenija

² Fakulteta za kemijo in kemijsko tehnologijo, Univerza v Ljubljani, Ljubljana, Slovenija

³ Biotehniška fakulteta, Univerza v Ljubljani, Ljubljana, Slovenija

⁴ Department of Life Sciences, University of Trieste, Trieste, Italy

⁵ Oddelek za zootehniko, Katedra za genetiko, animalno biotehnologijo in imunologijo, Biotehniška fakulteta, Univerza v Ljubljani, Domžale, Slovenija

Elektronski naslov: marko.jeran@ijs.si

Umetna inteligenca (UI) v onkologiji ne predstavlja zamenjavo dosedanjih pristopov zdravljenja raka, temveč omogoča njihovo nadgradnjo ter odpira poti k dodatnim možnostim in bolj prilagojenim terapevtskim rešitvam. UI lahko obdeluje in integrira multimodalne podatkovne sklope kot so genomske in transkriptomski podatki, radiomska analiza, sekvenciranje posameznih celic in klinični zapisi.^{1,2}

Napredek na področju UI je pokazal njen potencial v številnih znanstvenih in tehnoloških disciplinah. Z uporabo razložljivih modelov UI so raziskovalci odkrili nove mehanizme odpornosti. Algoritmi, ki uporabljajo podatke sekvenciranja transkriptoma posamezne celice, so podali cenovno dostopne in neinvazivne biomarkerje, ki bolj zanesljivo napovedujejo izid zdravljenja kot tradicionalne histopatološke metode. Uporaba Bayesovih mrež omogoča sprotne prilagajanje protokolov terapije CAR-T (T-limfociti s himernim antigenim receptorjem) z namenom izboljšanja dolgoročne remisije prek zgodnjega zaznavanja ponovitve simptomov.^{1,2}

Uporaba radiomike in slikanja s pozitronsko emisijsko tomografijo (PET) v kombinaciji z analizo transkriptomskih podatkov, podprto z umetno inteligenco, je pokazala visoko obetavnost pri napovedovanju odziva na imunoterapijo z zaviralci kontrolnih točk.³ Kvantne simulacije omogočajo in silico preizkušanje kombinacij med imunskim sistemom in tumorjem, kar prinaša hitrejše rezultate in varno sodelovanje med institucijami brez ogrožanja zasebnosti pacientov. Kvantne simulacije omogočajo in silico preizkušanje kombinacij med imunskim sistemom in tumorjem, kar prinaša hitrejše rezultate in varno sodelovanje med institucijami brez ogrožanja zasebnosti pacientov.⁴

Iskanje optimalnih kombinacij imunoterapij in napovedovanje neželenih učinkov se poenostavlja z uporabo generativne UI, okrepljenega učenja in nevronske mreže. Ti pristopi prispevajo k razvoju naprednih računalniških metod za odkrivanje zdravil in optimizacijo terapij. Cilj uporabe teh orodij ni zgolj pospeševanje razvoja, temveč povečanje verjetnosti kliničnega uspeha z identifikacijo sinergijskih mehanizmov in zmanjšanjem stranskih učinkov.^{5,6} Na podlagi podatkov o sestavi tumorskega mikrookolja so modeli UI sposobni napovedati vzorce infiltracije imunskih celic, imunogenost tumorja ter občutljivost na blokado kontrolnih točk.^{4,6,7}

Uporaba UI v imunoterapiji raka omogoča naprednejše napovedovanje odzivov bolnikov, vendar odpira vprašanja zasebnosti in regulative. V skladu s splošno uredbo o varstvu podatkov je potrebno za podatke iz genomike, slikanja in kliničnih evidenc zagotoviti anonimizacijo, varno hrambo in privolitev bolnikov, pri čemer ostaja tveganje ponovne identifikacije.^{8,9,10} Pri uvedbi UI je potrebno upoštevati tudi etične vidike. Slednji vključujejo pristranskost algoritmov, pomanjkanje preglednosti ter odsotnost enotnih norm in validacijskih protokolov.^{8,9,10,11} Poleg opisanega se tehnologija sama sooča z omejitvami, kot so heterogenost podatkov, pristranski učni nabori, omejena zastopanost

p13

populacij in težavna razločljivost t. i. »črnih skrinjic«. Možne rešitve vključujejo standardizacijo zbiranja podatkov, razvoj razločljivih metod (npr. SHAP, modeli pozornosti) ter prilagodljive oblike kliničnih preskušanj. Kljub navedenim omejitvam ostaja UI perspektiven dopolnilni pristop, ki lahko postopno izboljša zanesljivost in učinkovitost imunoterapije raka.

Zahvala

Prispevek je nastal v okviru raziskav programa (P1-0045, P4-0220) Javne agencije za znanstvenoraziskovalno in inovacijsko dejavnost Republike Slovenije (ARIS).

Literatura

1. Olawade DB, et al. Integrating AI into cancer immunotherapy – A narrative review of current applications and future directions. *Diseases*. 2025;13(1):24.
2. Derraz B, et al. New regulatory thinking is needed for AI-based personalised drug and cell therapies in precision oncology. *Npj Precis Oncol*. 2024;8(1):23.
3. McGale JP, et al. Integrating artificial intelligence and PET imaging for drug discovery: A paradigm shift in immunotherapy. *Pharmaceuticals*. 2024;17(2):210.
4. Gui Y, He X, Yu J, Jing J. Artificial intelligence-assisted transcriptomic analysis to advance cancer immunotherapy. *J Clin Med*. 2023;12(4):1279.
5. Li T, et al. Artificial intelligence in cancer immunotherapy: Applications in neoantigen recognition, antibody design and immunotherapy response prediction. *Semin Cancer Biol*. 2023;91:50–69.
6. Prelaj A, et al. Artificial intelligence for predictive biomarker discovery in immuno-oncology: A systematic review. *Ann Oncol*. 2024;35(1):29–65.
7. Garg P, et al. Artificial intelligence-driven computational approaches in the development of anticancer drugs. *Cancers*. 2024;16(22):3884.
8. Kumar A, et al. Personalized cancer vaccine design using AI-powered technologies. *Front Immunol*. 2024;15:1357217.
9. Olawade D, et al. Integrating AI into cancer immunotherapy—A narrative review of current applications and future directions. *Diseases*. 2025;13(1):24.
10. Prelaj A, et al. Artificial intelligence for predictive biomarker discovery in immuno-oncology: a systematic review. *Ann Oncol*. 2023;35(1):29–65.
11. Gao Q, et al. The artificial intelligence and machine learning in lung cancer immunotherapy. *J Hematol Oncol*. 2023;16:55.

ELEKTROKEMOTERAPIJA PRI OSTEOSARKOMU: RAZVOJ PREDKLINIČNIH MODELOV ZA POVEČANJE UČINKOVITOSTI

Saša Kupčič, Urška Kamensšek, Maja Čemažar, Urša Lampreht Tratar

Oddelek za eksperimentalno onkologijo, Onkološki inštitut Ljubljana, Ljubljana, Slovenija

Elektronski naslov: skupcic@onko-i.si

Osteosarkom je redek in agresiven rak, ki večinoma prizadene otroke med 11 in 14 letom starosti. V Sloveniji letno odkrijejo približno 15 primerov bolezni. Primarno zdravljenje vključuje kirurški poseg in kemoterapijo, tak protokol pa je nespremenjen že od leta 1970. Medtem ko je 5-letna stopnja preživetja za osteosarkom približno 70 %, se v metastatskih primerih zmanjša na 25 %. Elektrokemoterapija (EKT) uporablja električne pulze kot dostavno metodo za citostatik. Uporabljala se je že za zdravljenje kostnih metastaz, vendar je zaradi specifičnega tumorskega mikroolja v kosti, potrebna optimizacija EKT protokola. Za ugotavljanje primernosti EKT za zdravljenje osteosarkoma smo želeli razviti napovedne modele bolezni *in vitro* in *in vivo*. Razvili smo dvodimenzionalne (2D) in tridimenzionalne (3D) celične modele z uporabo mišje celične linije K7M2 za osteosarkom in ortotopični mišji model z uporabo celic K7M2-luc s predhodno transduciranim genom za luciferazo. Model 2D smo uporabili za teste citotoksičnosti in permeabilizacije celične membrane po elektroporaciji in EKT. S ploščatimi elektrodami iz nerjavečega jekla (razmak 2,4 cm) smo dovedli električne pulze (8 pulzov, 100 μ s, 1 Hz) amplitude 300–1300 V/cm. Za tumorske sferoide 3D smo nasadili različno število celic ter jih gojili v rotacijskem inkubatorju Clinostar® 7 ali 14 dni. Za analizo nekrotičnih in proliferajočih območij smo opravili imunohistokemične analize (HE in Ki-67). Da bi natančneje simulirali mikrookolje kostnega tumorja, smo vzpostavili ortotopični mišji model. Različno število celic (0.5×10^6 , 1×10^6 , 2×10^6) K7M2-luc smo injicirali na proksimalno stran golenice zadnje desne noge. Z iglo velikosti 29G smo prebili periost in celice injicirali v medularno regijo kosti. Na modelu 2D smo s pomočjo rezultatov citotoksičnosti in permeabilizacije izbrali 1300 V/cm kot jakost pulzev za nadaljnje poskuse. Po izvedenem EKT s temi pulzi smo izračunali IC_{50} vrednosti citostatikov bleomicin (0.11 nM), cisplatin (10.55 μ M) in oksaliplatin (9.52 μ M). Pri sferoidih smo po določevanju velikosti območij nekroze in proliferacije izbrali sferoid z začetnim nasajanjem 2000 celic/sferoid, ki je bil gojen 7 dni, kot primeren model za nadaljnje analize. Nekrotično jedro je na dan 7 zavzemalo 35 % sferoida, proliferajoče območje pa 65%. Pri ortotopičnem mišjem modelu smo razvoj tumorja spremljali tedensko z bioluminiscenčnim in rentgenskim slikanjem z napravo IVIS (dovoljenje št. U34401-17/2023/1). V času približno 6 tednov po inokulaciji smo potrdili lizo kosti ter razvoj kliničnih znakov. Na podlagi rezultatov slikanja smo za nadaljnje raziskave ortotopičnega modela izbrali 1×10^6 celic. V okviru tega projekta smo uspeli vpostaviti predklinične modele osteosarkoma, ki nam bodo pomagali pri optimizaciji protokola EKT z namenom povečanje njene protitumorske učinkovitosti.

p14

MALO-MOLEKULARNI INHIBITORJI 6-FOSFOFRUKTO-1-KINAZE SOČASNO ZATREJO NASTAJANJE LAKTATA IN SUPEROKSIDA PRI RAKAVIH CELICAH.

Matic Legiša, Samo Lešnik, Janez Konc, Tina Vodopivec, Katja Čamernik, Urška Karolina Potokar

Kemijski inštitut, Ljubljana, Slovenija

Elektronski naslov: Matic.Legisa@ki.si

Za rak je značilen nekontroliran energijski metabolizem, ki se kaže tudi kot pospešeni glikolitični tok. Pomembno vlogo pri tem ima modificirana, visoko aktivna 6-fosfofrukto-1-kinaza (PFK1), ki je značilna za rakaste celice. Prekomeren pretok pa sproži tudi pospešeno tvorbo citosolnega Nikotinamid adenin di-nukleotida (NADH), ki ima vlogo prenašalca elektronov. Posledično pride do nastanka škodljivega visokega redoks potenciala in energetskega neravnovesja v rakavih celicah, ki se mora hitro nevtralizirati z redukcijo piruvata v laktat in kisika v superoksid (SOX).

Da bi izvedeli več o deregulirani glikolizi in vloge modificirane PFK1 v rakavih celicah, smo pripravili specifične inhibitorje. S super računalnikom smo poiskali atomski model kristalne strukture človeškega PFK1 za virtualno presejevanje baze podatkov s 4,5 milijoni spojin, ki so podobnimi katalitičnimi vezavnimi mestom encima. Presejevanje je razkrilo sedem učinkovin, ki so učinkovito inhibirali PFK1 encime, znižali glikolitični pretok in zavrli nastanek laktata in SOX. Teste z učinkovitostjo inhibitorjev pri različnih koncentracijah, smo izvedli pri naslednjih tumorskih celičnih linijah: Jurkat (akutna levkemija T-celic), Caco-2 (kolorektalni adenokarcinom), COLO 829 (melanom) in MDA-MB-231 (adenokarcinom dojke). Pri dveh izbranih učinkovinah po 72-urni inkubaciji nismo zaznali negativnih učinkov na proliferacijo tumorskih celic niti na njihovo presnovno aktivnost, kar nakazuje odsotnost citostatične in citotoksične aktivnosti v navedenih pogojih. Vendar pa smo med podaljševanjem inkubacije zaznali počasno zmanjševanje učinkovitosti inhibitorjev, tako med nastajanjem laktata kot SOX. Takšnih učinkov nismo opazili, če smo celicam zaporedno, vsakih 24 ur, dodajali učinkovino v nizkih koncentracijah. Dodatni poskusi, ki smo jih izvedli pri Jurkat celicah, so pokazali zmanjšano stopnjo respiracije in glikolitičnega toka v celicah tretiranih z učinkovinami, v primerjavi z netretiranimi celicami.

Inhibicija modificirane visoko-aktivne PFK1, ki je specifična za rakaste celice, zmanjša dereguliran glikolitični tok, prepreči preobilno nastajanje citosolnega NADH in obnovi redoks ravnovesje, s čimer hkrati prepreči nastajanje škodljivega učinka laktata in SOX, dveh ključnih snovi pri nastanku in razvoju raka.

INTERROGATING THE TUMOR MICROENVIRONMENT IN RENAL CELL CARCINOMA: A SPATIAL PROTEOMICS STUDY

Taja Ložar^{1,2,3}, Daniel Shapiro³, Paul Lambert³, Miha Pukl¹, Simon Hawlina^{2,4}

¹ *Institute of Oncology Ljubljana, Ljubljana, Slovenia*

² *University of Ljubljana, Slovenia*

³ *University of Wisconsin-Madison, Madison, USA*

⁴ *University Medical Centre Ljubljana, Ljubljana, Slovenia*

Elektronski naslov: tlozar@onko-i.si

There is a clinical need to identify prognostic markers that can help predict which patients with non-metastatic clear cell renal cell carcinoma (ccRCC) will develop metastatic disease after nephrectomy.

We performed a spatial proteomics study to assess the immune cell populations of interest in ccRCC tumors and their correlation with progression after surgery. Both a research (n=83) and a validation cohort (n=46) consisting of ccRCC tumors with and without progression after radical nephrectomy were interrogated using highly multiplex immunostaining, and a spatial analysis was performed to determine specific spatial patterns between the tumor and immune cells.

We found that higher levels of CD8⁺ T cells were correlated to a lower risk of progressive disease. Patients with recurrence after surgery had more exhausted CD8⁺ T cells in the tumor microenvironment. We demonstrated that patients who progressed to metastatic disease had shorter distances between CD8⁺ T cells and RCC cells.

Our study shows CD8⁺ T cell infiltration within ccRCC tumors could be a valuable prognostic biomarker.

p16

VLOGA DOTIKA V DOBI SLIKE: ALI IMA KLINIČNI PREGLED ŠE MESTO PRI PRESEJANJU VISOKO OGROŽENIH ŽENSK?

Luka Marinko^{1,2}, Barbara Perić^{2,3}, Mateja Krajc^{1,2}

¹ Oddelek za onkološko klinično genetiko; Onkološki inštitut Ljubljana, Ljubljana, Slovenija

² Medicinska fakulteta, Univerza v Ljubljani, Ljubljana, Slovenija

³ Oddelek za onkološko kirurgijo; Onkološki inštitut Ljubljana, Ljubljana, Slovenija

Elektronski naslov: lmarinko@onko-i.si

V Sloveniji za rakom dojk (RD) letno zbolijo približno 1500 žensk; pri večini gre za sporadične rake, v 5-10 % pa se rak dojk lahko pojavi zaradi podedovane genetske okvare predvsem v genih *BRC1A1*, *BRC1A2*, *PALB2*, *ATM* in *CHEK2*. Na podlagi ocene ogroženosti ženske umestimo v eno od treh kategorij ogroženosti za RD, in sicer (i) populacijsko, (ii) zmerno povečano in (iii) visoko, katerih ogroženosti se predstavljajo do 15 %, med 15 % in 30 % in nad 30 % v identičnem vrstnem redu. Nosilke večine patogenih/verjetno patogenih različic (PR/VPR) genov, ki povečujejo ogroženost za RD, spadajo v kategorijo z visoko ogroženostjo in se spremljajo v organiziranem presejalnem programu na Onkološkem inštitutu Ljubljana v Centru za bolezni dojk – genetika (CBD-GEN) po vnaprej dogovorjenem presejalnem protokolu, v odvisnosti od okvarjenega gena. *BRC1A1* in *BRC1A2* nosilke lahko v Sloveniji opravljajo (i) od 25. leta starosti klinični pregled (KP) dojk na šest do 12 mesecev in (ii) letno magnetno-resonančno slikanje (MRI) tkiva dojk s kontrastom, (iii) od 30. leta dalje opravljajo tudi letno presejalno mamografijo (mamografijo in MRI so do nedavno opravljale izmenjujoče na 6 mesecev).

Namen naše raziskave je bil (i) pregledati razpoložljive podatke o presejalnih programih visoko ogroženih (*BRC1A1* in *BRC1A2* nosilke) za RD v ostalih državah ter (ii) primerjati smernice spremljanja s slovenskimi, s posebnim poudarkom na KP dojk.

Analizirali smo rezultate člankov, ki so raziskovali metode presejanja bolj ogroženih. Literaturo smo iskali v spletnih zbirkah PUBMED z uporabo naslednjih iskalnih pojmov: »HBOC syndrome«, »HBOC«, »HBOC surveillance«, »hereditary breast cancer«, »BRCA«, »BRCA1 AND MRI«, »clinical breast exam brca«. Med vključitvene kriterije smo šteli: starost izvornega članka enajst let ali manj, primerjava najdb med *BRC1A1* in *BRC1A2* in doprinos KP dojk k zgodnjemu odkrivanju raka dojk.

Med izbranimi državami 27 od 31 držav priporoča KP dojk pri bolj ogroženih. In sicer se sheme razlikujejo glede starosti pričetka presejanja: 4 države pričnejo s presejanjem s KP pri 18. letih, 3 pri 20. letih, 18 pri 25. letih, 1 pri 30. letih starosti, ena država pa ne opredeljuje starosti pričetka spremljanja. Presejalno mamografijo in MRI pri bolj ogroženih priporočajo vse države članice; z začetkom pri 18. letih (1/31), 25. letih (25/31) ali 30. letih starosti (5/31) za MRI in 25. letih (3/31), 30. (19/31), 35. (4/35) ali 40. letih starosti (5/31) za mamografijo. Med 27 državami, ki priporočajo klinični pregled dojk, sta dve določili zgornjo starostno mejo. Od enaintridesetih držav, ki priporočajo mamografijo, jih ima sedem (22,5 %) opredeljeno zgornjo starostno mejo zaključka presejanja. Med trinajstimi državami, ki priporočajo ultrazvočno presejanje, je to mejo določila le ena, medtem ko je pri magnetno resonančnem slikanju (MRI) zgornja starostna meja določena v šestnajstih od enaintridesetih držav. Doprinos KP dojk k zgodnji diagnozi raka dojk ocenjujejo med 0 % in 5,7 %, s skupnim deležem (delež po združitvi podatkov) 2,5 %.

Med državami obstajajo razlike med starostnimi mejami za posamezne presejalne metode pri bolj ogroženih, kar priča o pomanjkanju trdnih dokazov in študij, ki govorijo v prid določeni starostni meji in metodi presejanja. Veliko vprašanje in izziv prinaša vprašanje o smiselnosti izvajanja KP pri tej skupini. Čeprav priporočila Evropskega združenja za internistično onkologijo (ESMO) jasno

navajajo, da KP dojk ne doprinese k zgodnjemu odkrivanju raka dojk pri bolj ogroženih, se tako v Sloveniji, kot tudi v večini drugih evropskih držav še vedno opravlja. V evropskem prostoru bi bilo potrebno raziskati doprinos KP k zgodnjem odkrivanju raka dojk pri bolj ogroženih ženskah in na podlagi pridobljenih rezultatov predlagati razmislek o spremembi trenutnih priporočil, oziroma pripraviti podlago za izvedbo prospektivne raziskave, ki bi bolj natančno opredelila pomen izvajanja KP pri bolj ogroženih.

Literatura

1. Cancer in Slovenia 2021. Ljubljana: Institute of Oncology Ljubljana, Epidemiology and Cancer Registry, Slovenian Cancer Registry; 2024.
2. Blatnik A, et al. Priporočila diagnostike in zdravljenja raka dojk. Ljubljana: Onkološki inštitut; 2021. Available from: <https://www.onko-i.si/priporocila>
3. Madorsky-Feldman D, et al. An international survey of surveillance schemes for unaffected BRCA1 and BRCA2 mutation carriers. *Breast J.* 2016;157(2):319–27.
4. Sessa C, et al. Risk reduction and screening of cancer in hereditary breast-ovarian cancer syndromes: ESMO Clinical Practice Guideline. *Ann Oncol.* 2023;34(1):33–47.
5. Monticciolo DL, et al. Breast Cancer Screening for Women at Higher-Than-Average Risk: Updated Recommendations From the ACR. *J Am Coll Radiol.* 2023;20(9).
6. National Comprehensive Cancer Network. Genetic/Familial High-Risk Assessment: Breast, Ovarian, Pancreatic, and Prostate. Version 1.2026. 2026. Available from: <https://www.nccn.org/guidelines/guidelines-detail?category=2&cid=1545>
7. Marmolejo DH, et al. Overview of hereditary breast and ovarian cancer (HBOC) guidelines across Europe. *Eur J Med Genet.* 2021;64(12):104350.
8. Bufman H, et al. Clinical experience on the limited role of ultrasound for breast cancer screening in BRCA1 and BRCA2 mutations carriers aged 30–39 years. *Clin Imaging.* 2024 ;116:110310–0.
9. Menes TS, et al. Clinical breast exam contribution to breast cancer diagnosis in BRCA mutation carriers vs. average to intermediate risk women. *Breast Cancer Res Treat.* 2024;207(1):111–8.

EVROPSKI PROJEKT TWINNING ZA ODLIČNOST PRI RAZISKAVAH AKTIVACIJE PROTITUMORSKEGA IMUNSKEGA ODZIVA PO ELEKTROKEMOTERAPIJI V KOMBINACIJI Z GENSKIM ELEKTROPRENOSOM PLAZMIDNE DNA, KI KODIRAJO ZA ZAVIRALCE IMUNSKIH KONTROLNIH TOČK – ZAP CANCER

Boštjan Markelc

*Oddelek za eksperimentalno onkologijo, Onkološki inštitut Ljubljana, Zaloška cesta 2, 1000 Ljubljana
Biotehniška fakulteta, Univerza v Ljubljani, Jamnikarjeva ulica 101, 1000 Ljubljana*

Elektronski naslov: bmarkelc@onko-i.si

V zadnjem desetletju so zaviralci imunskih kontrolnih točk (ZIKT) bistveno spremenili zdravljenje raka, začevši z odobritvijo ipilimumaba, protitelesa proti CTLA-4, za zdravljenje metastatskega melanoma. Protitelesa, usmerjena proti CTLA-4, PD-1 in PD-L1, se danes široko uporabljajo pri različnih vrstah raka, vključno z melanomom in rakom debelega črevesa in danke. Kljub temu dolgotrajne remisije doseže le približno polovica bolnikov z melanomom, pri raku debelega črevesa in danke pa je učinkovitost še nižja, kar poudarja potrebo po novih terapevtskih pristopih in tehnologijah za izboljšanje imunoterapij.

p18

Zdravljenje raka pogosto povzroči celično smrt, njen način pa pomembno vpliva na aktivacijo imunskega odziva. Imunogena celična smrt (ICD) sproži pridobljeno imunost proti tumorskim ali virusnim antigenom, izraženih v umirajočih celicah. ICD je značilna po sproščanju s poškodbo povezanih molekulskih vzorcev (DAMP). Konstitutivni DAMP (cDAMP), kot so kalretikulin, ATP, HMGB1 in nukleinske kisline, so normalno prisotne intracelularne molekule, ki se sprostijo ob poškodbi membrane. Inducibilni DAMP (iDAMP), kot so citokini, ki jih uravnava NF- κ B, interferoni tipa I in družina IL-1, nastanejo specifično med celično smrtjo. Koordinirano sproščanje obeh tipov DAMP je nujno za uvrstitev smrti med ICD. Poleg tega so za učinkovito aktivacijo T-celic potrebni še predstavitelji tumorskih antigenov, kostimulacija dendritičnih celic in diferenciacija v efektorske celice T. ICD lahko tudi sinergistično deluje v kombinaciji z ZIKT in poveča protitumorsko imunost. Le omejeno število terapij povzroča ICD, med njimi radioterapija, fotodinamična terapija ter nekateri kemoterapevtiki (antraciklini, cisplatin, oksaliplatin, bleomicin, bortezomib). Nedavno je bilo ugotovljeno, da tudi elektrokemoterapija (ECT), lokalna ablativna metoda, lahko sproži ICD. Najpogosteje uporabljena citostatika sta bleomicin (BLM) in cisplatin (CDDP), oksaliplatin (OXA) pa kaže velik potencial v predkliničnih študijah. Vsi trije učinkujejo kot sprožilci ICD, a časovni potek sproščanja DAMP ostaja slabo raziskan. Sam elektroporacijski postopek lahko sproži sproščanje cDAMP zaradi povečane prepustnosti membrane. Po ECT so bile opažene različne oblike celične smrti (apoptoza, nekroza, piroptoza, nekroptoza). Pri BLM celice odmrejo bodisi s hitro psevdopoptozo bodisi z mitotsko smrtjo, vendar ni jasno, kateri mehanizmi vodijo v ICD. Za CDDP in OXA pa to vprašanje ostaja neodgovorjeno. Natančna opredelitev tipov in kinetike celične smrti ter sproščanja DAMP je tako ključna za optimalno izrabo ICD, sprožene z ECT. Posredni dokazi kažejo, da ECT sproži tudi iDAMP in privabi antigen-predstavljalne celice (APC), saj je bila opažena infiltracija dendritičnih celic, aktivacija monocitov in limfocitov T ter migracija imunskih celic v tumorje. Kljub temu sistemskih protitumorskih učinkov v mišjih modelih in pri bolnikih skorajda ni bilo, kar predstavlja očitno neskladje z in vitro raziskavami. Kombinacija ECT z ZIKT bi lahko to omejitev premagala. Klinične raziskave kažejo, da je imela kombinacija ECT z BLM in pembrolizumabom pri melanomu boljše izide kot sama imunoterapija. Predklinične študije z dodatkom citokinov (IL-2, IL-12, TNF- α , GM-CSF) prav tako potrjujejo sinergistični potencial. To nakazuje, da imunosupresivno tumorsko mikrookolje (TME) omejuje sistemske učinke ECT in da

bi imunoterapije, vključno z ZIKT, lahko pomagale lokalni učinek spremeniti v sistemski.

Elektroporacija pa omogoča tudi vnos plazmidne DNA (pDNA) – postopek, imenovan genski elektrotransfer (GET). Ta pristop omogoča tudi lokalno dostavo genov za monoklonska protitelesa, vključno z ZIKT, neposredno v tumor. V primerjavi s sistemskimi infuzijami intratumorski vnos zmanjša toksičnost zaradi visokih koncentracij v krvi in poveča lokalno prisotnost, čeprav so še vedno potrebna ponavljajoča odmerjanja. GET pa omogoča dolgotrajnejše izražanje. Predklinične študije so pokazale uspešen sistemski imunski odziv po GET pDNA, ki kodira za protitelesa proti CTLA-4 in PD-1 pri melanomu in raku debelega črevesa in danke, vendar kombinacija z ECT še ni bila izvedena. Kombinacija ECT z BLM, CDDP ali OXA ter GET pDNA, ki kodira za ZIKT, bi tako lahko potencialno spremenila lokalni protitumorski odziv v sistemski z aktivacijo protitumorskega imunskega odziva.

REPURPOSING MEDROXYPROGESTERONE ACETATE AND MEFENAMIC ACID FOR PLATINUM-RESISTANT OVARIAN CANCER

Nika Marolt ¹, Frédéric Amant ², Daniela Annibali ², Tea Lanišnik Rižner ¹

¹ Institute of Biochemistry and Molecular Genetics, Faculty of Medicine, University of Ljubljana, Ljubljana, Slovenia

² Laboratory of Gynecological Oncology, Department of Oncology, KU Leuven, Leuven, Belgium

Elektronski naslov: nika.marolt@mf.uni-lj.si

p19 High-grade serous ovarian carcinoma (HGSOC) is the most prevalent and lethal subtype of ovarian cancer, frequently characterized by resistance to platinum-based chemotherapy. Members of the aldo-keto reductase subfamily 1C (AKR1C) have been associated with both chemoresistance and hormone-regulated tumor progression, though their exact contribution to HGSOC remains to be fully elucidated. To investigate this, we analyzed transcriptomic profiles from The Cancer Genome Atlas (TCGA) to assess expression patterns of *AKR1C1–3* and *NFE2L2* (encodes NRF2, a key oxidative stress regulator) in HGSOC tumors. Notably, platinum-resistant samples exhibited stronger co-expression relationships among *AKR1C* genes. Kaplan–Meier Plotter analysis revealed that elevated expression of *AKR1C1*, *AKR1C2*, and reduced expression of *NFE2L2* was associated with reduced survival in patients with serous ovarian cancer. qPCR and RNAseq analysis confirmed higher expression of *AKR1C1–3* in the least carboplatin-sensitive cell lines (Caov-3 and COV362), although *NFE2L2* expression patterns did not consistently reflect those seen in clinical survival data. We next evaluated the antitumor activity of two FDA-approved AKR1C inhibitors, medroxyprogesterone acetate and mefenamic acid. Both agents significantly decreased cell viability and impaired migratory capacity, whether administered alone or in combination with estrone sulfate and/or carboplatin. In several assays, their efficacy matched or exceeded that of carboplatin. Importantly, medroxyprogesterone acetate and mefenamic acid induced apoptosis without triggering necrosis in either cell line. In contrast, carboplatin failed to activate apoptotic pathways and caused delayed necrosis only in Caov-3 cells after 72 hours, suggesting a slow, non-apoptotic mechanism of cell death. Together, these results highlight *AKR1C* and *NFE2L2* as candidate prognostic markers in HGSOC and suggest that repurposing medroxyprogesterone acetate and mefenamic acid may offer a promising therapeutic strategy against platinum-resistant tumors.

Acknowledgements

ARIS grant to T.L.R. J3-60065, P3-0449, CELSA grant to T.L.R., F.A., and D.A., and a Young Researcher grant to N.M.

CIRCULATING TUMOR DNA AS PREDICTIVE AND PROGNOSTIC MARKERS IN BREAST CANCER

John Martens

Head of Translational Cancer Genomics, Dept. of Medical Oncology, Erasmus MC Cancer Institute, Rotterdam, The Netherlands

E-mail: j.martens@erasmusmc.nl

Circulating cell-free DNA (cfDNA) is emerging liquid biopsy that has a unique potential to deal with key issues in oncology. For example, they can be used to assess prognosis, to direct treatment with certain kinds of drug, or to provide information about response to treatment. However, despite an overflow of literature on the subject, clinical implementation of these liquid biopsies has been scarce. This is mainly because there is a lack of preanalytical standardization, the fact that multiple different techniques or platforms are being used, and a lack of prospective studies being performed investigating a meaningful clinical question. I will present an overview of the state-of-the-art of liquid biopsy assays available and their clinical application and make suggestions for how liquid biopsies can reach the tipping point. The focus will be on breast cancer, however, examples from other cancer types, to illustrate the intended use of certain assays will be provided. Specifically, in my talk I will provide examples of the use of cfDNA analysis techniques as prognostic marker, as marker of disease progression and tumor evolution during treatment. My examples will mostly be in the context of advanced disease but I will also attempt to discuss their role in “early” detection. Finally, using data from the prospective SONIA trial, I demonstrate that pretreatment ctDNA levels as well on-treatment ctDNA dynamics can be used to identify patients that benefit from first-line over second line CDK4/6i treatment and vice versa. As a results, my lecture will provide the audience with my perspective on the state-of-the-art of current liquid biopsy research and the daunting task to get these techniques into clinical practice.

p20

GENSKI ELEKTROPRENOS mRNA Z ZAPISOM ZA IL-12 V CELICAH MELANOMA IN KOLOREKTALNEGA KARCINOMA

Ajda Medved^{1,2}, Urša Lampreht Tratar^{1,3}, Matjaž Peterka⁵, Urban Bezeljak^{5,6}, Nastja Štemberger⁵, Tjaša Marušič^{5,7}, Maja Čemažar^{1,4}

¹ Onkološki inštitut Ljubljana, Oddelek za eksperimentalno onkologijo, Ljubljana, Slovenija

² Univerza v Ljubljani, Medicinska fakulteta, Ljubljana, Slovenija

³ Univerza v Ljubljani, Veterinarska fakulteta, Ljubljana, Slovenija

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

⁵ COBIK, Ajdovščina, Slovenija

⁶ Sferogen d.o.o., Ajdovščina, Slovenija

⁷ Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Ljubljana, Slovenija

Elektronski naslov: amedved@onko-i.si

Interlevkin 12 (IL-12) je močan imunostimulativni citokin z velikim potencialom za zdravljenje raka, saj modulira različne mehanizme, ki delujejo proti imunosupresivnemu tumorskem mikrookolju. Sistemska uporaba IL-12 je povezana s toksičnostjo, kar je preusmerilo predklinične raziskave v lokalne metode za dostavo terapije, kot je genski elektroprenos (GET).^{1,2} GET mRNA molekul predstavlja alternativo plazmidni DNA (pDNA), saj mRNA omogoča višje stopnje transfekcije, prav tako pa ne predstavlja tveganja za insercijsko mutagenozo, saj molekule za uspešen prepis v proteine, ne vstopajo v jedro. Stabilnost mRNA molekul in učinkovitost transfekcije je mogoče dodatno izboljšati s kemičnimi modifikacijami, med katere spada tudi t.i. Kapa (ang. Cap) na mRNA molekuli.

V naši raziskavi smo ocenili učinkovitost GET terapevtske mRNA z zapisom za IL-12 v celičnih linijah mišjega melanoma (B16F10) in karcinoma debelega črevesa (CT26). Uporabili smo dve različici IL-12 mRNA (mRIL12), ki se razlikujeta v modifikaciji Kape (Cap0 in Cap1), skupaj z nekodirajočo kontrolno mRNA (mRScramble Cap0 in mRScramble Cap1).

Viabilnost celic smo ocenili tri dni po GET, medtem ko smo izražanje proteina IL-12 merili v več časovnih točkah. Rezultati so pokazali, da je izražanje IL-12 doseglo najvišjo vrednost 24 ur po GET. V celicah B16F10 so bile koncentracije IL-12 po elektroprenosu mRNA Cap1 znatno višje v primerjavi s Cap0, kar je skladno z izboljšano stabilnostjo molekule mRNA Cap1 modifikacijo v citosolu. V celicah CT26 pa ni bila ugotovljena statistično značilna razlika med Cap0 in Cap1. Pomembno je, da je GET mRNA IL-12 zmanjšal viabilnost celic v primerjavi s kontrolnimi skupinami. Rezultati kažejo, da je terapevtsko mRNA z zapisom za IL-12 mogoče učinkovito dostaviti z GET, pri čemer modifikacije Cap vplivajo na viabilnost celic in izražanje proteina, ki se razlikuje med celičnimi linijami. Rezultati predstavljajo pomembno podlago za nadaljnje raziskave *in vivo* in optimizacijo imunoterapije raka na osnovi mRNA IL-12.

Literatura

1. Kos, Spela, et al. "Non-Clinical In Vitro Evaluation of Antibiotic Resistance Gene-Free Plasmids Encoding Human or Murine IL-12 Intended for First-in-Human Clinical Study." *Pharmaceutics* vol. 13,10 1739. 19 Oct. 2021,
2. Markelc, Bostjan et al. "Non-clinical evaluation of pmIL12 gene therapy for approval of the phase I clinical study." *Scientific reports* vol. 14,1 22288. 27 Sep. 2024.

OPTIMIZACIJA IN VALIDACIJA PROTOKOLOV ZA DOLOČANJE HORMONSKIH RECEPTORJEV RAKA DOJK NA CITOLOLOŠKIH VZORCIH NA BARVALCU DAKO OMNIS V RUTINSKEM CITOPATOLOŠKEM LABORATORIJU

Simona Miceska, Tina Germšek, Teja Knafelj, Anamarija Kuhar, Veronika Kloboves
Prevodnik

Onkološki inštitut Ljubljana Ljubljana, Slovenija

Elektronski naslov: tgermsek@onko-i.si

Rak dojk je najpogostejši rak pri ženskah v razvitem svetu, ki je ozdravljiv ob zgodnjem odkritju. Večina tumorjev bolnic izraža estrogenske (ER) in/ali progesteronske receptorje (PR), ki sta ključna označevalca za določitev hormonskega statusa in načrtovanje ustreznega zdravljenja. Status hormonskih receptorjev določamo na histoloških vzorcih z imunohistokemično (IHK) metodo ter na citoloških z imunocitokemično (ICK) metodo. Za imunocitokemično določanje hormonskih receptorejev uporabljamo različne imunocitokemične barvalce. Pred uvdebo novih barvalcev (avtomatiziranih platform) v rutinsko diagnostiko je nujno potrebno optimizirati in validirati protokole barvanja.

Namen raziskave je bil optimizirati in validirati ICK protokole za določanje ER in PR na citoloških vzorcih na novi avtomatizirani platformi Dako Omnis (Agilent), ki jo uvajamo v rutinsko diagnostiko na Oddelku za citopatologijo, s protitelesi proti ER (klon 6F11, Leica Biosystems) in proti PR (klon 16+SAN27, Leica Biosystems), ki ju že uporabljamo v rutinski diagnostiki na platformi BenchMark Ultra (Ventana, Roche Diagnostic).

V raziskavi smo uporabili ostanke citoloških vzorcev bolnic s primarnim ali razširjenim rakom dojk, odvzetih za rutinsko določanje hormonskih receptorjev, ki bi jih po zaključeni diagnostični obdelavi sicer zavrgli. Iz ostankov vzorca smo naknadno pripravili citospine za ICK barvanje na platformi Dako Omnis. Hkrati smo iz laboratorijskega informacijskega sistema pridobili rezultate o rutinskem ICK določanju izražanja ER in PR na platformi BenchMark Ultra: delež tumorskih celic, ki so izražale ER in PR ter podatke o starosti posameznega vzorca. V raziskavi smo najprej testirali več različnih ICK protokolov na Dako Omnis z različnimi pogoji predobdelave celic, inkubacije protitelesa in ojačanja signala reakcije s komercialno dostopnim ojačevalcem (Mouse Linker, Agilent), da bi ugotovili s katerim protokolom dobimo rezultate, ki so primerljivi z rezultati referenčnega, rutinskega ICK barvanja na platformi BenchMark Ultra. Testirali smo naslednje protokole: (1) brez predobdelave celic, (2) predobdelavo z nizkim pH pri 65 °C, (3) predobdelavo z nizkim pH pri 97 °C, (4) predobdelavo z visokim pH pri 65 °C ter (5) predobdelavo z visokim pH pri 97 °C. Vse protokole (1–5) smo kombinirali z 20- oziroma 40-minutno inkubacijo protitelesa, brez in z dodatkom ojačevalca reakcije. Nato smo najbolj optimalni ICK protokol validirali na dodatnih 20 vzorcih.

Med vsemi preizkušenimi testnimi ICK protokoli so bili rezultati barvanja za ER in PR najbolj optimalni s protoklom z 20 minutno inkubacijo primarnega protitelesa, s predobdelavo pri nizkem pH in temperaturi 97 °C ob dodatku komercialnega ojačevalca reakcije. Izbrani protokol smo uspešno validirali na 20 vzorcih, saj so rezultati pokazali visoko ujemanje z rezultati/deleži referenčnih ICK in IHK barvanj za ER in PR na citoloških in histoloških vzorcih (Cronbach $\alpha > 0,8$). Zaključili smo, da je ICK določanje hormonskih receptorjev na platformi Dako Omnis je primerno za implementacijo v rutinsko citopatološko diagnostiko na Onkološkem inštitutu Ljubljana.

p22

OVREDNOTENJE CIRKULIRAJOČIH TUMORSKIH CELIC IN CELIČNIH SKUPKOV PRI BOLNICAH S PRIMARNIM, NAPREDOVALNIM SEROZNIM RAKOM JAJČNIKA VISOKEGA GRADUSA PRED NEOADJUVANTNIM SISTEMSKIM ZDRAVLJENJEM

Simona Miceska, Tanja Jesenko, Živa Pijšlar, Erik Škof, Cvetka Grašič Kuhar, Veronika Kloboves Prevodnik

Onkološki Inštitut Ljubljana, Ljubljana, Slovenija

Elektronski naslov: tjesenko@onko-i.si

p23 Serozni rak jajčnikov visokega gradusa (angl. high-grade serous carcinoma, HGSC) spada med ginekološke rake z največjo umrljivostjo, saj je bolezen običajno odkrita v napredovalnem stadiju FIGO III ali IV. Zaenkrat nimamo bioloških označevalcev, s katerimi bi lahko zanesljivo napovedali potek bolezni in odgovor na zdravljenje. Nedavne raziskave so pokazale, da so cirkulirajoče tumorske celice (CTC) pomemben biološki označevalec pri različnih vrstah raka, pri HGSC pa so še zelo slabo preučene. V okviru pilotne prospektivne, neintervencijske raziskave ASTRA, ki poteka na Onkološkem inštitutu Ljubljana, smo preučevali CTC in njihove skupke pri bolnicah s primarnim, napredovalnim HGSC pred neoadjuvantnim zdravljenjem (ob diagnozi), s poudarkom na številu, morfoloških značilnostih in povezavi s stadijem bolezni. CTC smo izolirali iz 10 ml periferne krvi s sistemom Parsortix, pripravili citospine, jih pobarvali po metodi Giemsa in skupaj z izkušenim citopatologom analizirali pod svetlobnim mikroskopom. V dosedanje analizo smo vključili 20 bolnic, od tega 12 (60,0 %) v stadiju FIGO III in 8 (40,0 %) v stadiju FIGO IV. Prisotnost CTC smo zaznali pri vseh bolnicah, mediana število CTC je bilo 7,5 celic (razpon 1–33). Polimorfizem CTC smo opazili med vzorci vseh bolnic in v vzorcu posamezne bolnice. Pri 10 bolnicah (50,0 %) smo odkrili skupke CTC (mediana = 1, razpon 1–3); večina skupkov je bila dvoceličnih in heterotipskih, sestavljenih iz ene CTC in ene imunske celice, medtem ko smo pri dveh bolnicah opazili homotipski skupek, sestavljen iz dveh morfološko različnih CTC. Prisotnost skupkov smo zaznali pri bolnicah, ki so imele v citospinu najmanj pet CTC. Opazili smo trend višjega števila CTC pri bolnicah v stadiju FIGO IV (mediana = 11,0, razpon 3–33) v primerjavi z bolnicami v stadiju FIGO III (mediana = 6,0, razpon 1–25), čeprav razlika ni bila statistično značilna ($p = 0,246$). Značilne razlike v številu skupkov med obema skupinama FIGO III in FIGO IV nismo zaznali ($p = 0,711$).

Naši pilotni rezultati nakazujejo pomembno vlogo CTC in njihovih skupkov pri patogenezi HGSC ter poudarjajo potrebo po nadaljnjem preučevanju njihovega pomena in potenciala na večji kohorti bolnic.

IMPLEMENTACIJA VEČBARVNEGA KRIO- IMUNOFLUORESCENTNEGA BARVANJA CITOSPINOV V RUTINSKEM CITOPATOLOŠKEM LABORATORIJU

Simona Miceska ¹, Živa Ledinek ^{2,3}, Sebastian C. Bhakdi ^{4,5}, Veronika Kloboves Prevodnik ^{1,3}

¹ Oddelek za citopatologijo, Onkološki inštitut Ljubljana, Slovenija

² Oddelek za patologijo, Univerzitetni klinični center Maribor, Slovenija

³ Medicinska fakulteta, Univerza v Mariboru, Slovenija

⁴ X-ZELL Biotech Pte Ltd., Singapur

⁵ Oddelek za patobiologijo, Fakulteta za naravoslovje, Univerza Mahidol, Bangkok, *Tajska*

Elektronski naslov: ziva.ledinek@gmail.com

Večbarvno krio-imunofluorescentno barvanje citospinov s platformo X-ZELL omogoča hkratno določanje do 8 označevalcev na enem preparatu, kar pomembno prispeva k reševanju težav s katerimi se srečujemo v imunocitkemiji (ICK), kjer na enem preparatu praviloma lahko določimo le en označevalcec. Za določitev osmih označevalcev tako potrebujemo 8 preparatov, ki pa jih iz vzorcev, ki vsebujejo malo celic, ne moremo pripraviti. Protokol priprave in fiksacije vzorcev za večbarvno krio-imunofluorescentno barvanje s platformo X-ZELL se razlikuje od rutinskih metod, ki jih uporabljamo za ICK barvanja v rutinskem citopatološkem laboratoriju. V pilotni študiji smo želeli preveriti, ali rutinsko pripravljene citospini omogočajo zanesljivo večbarvno krio-imunofluorescentno barvanje s platformo X-ZELL.

p24

Za testiranje smo vzpostavili mini-večbarvni (4-barvni) panel za limfomske označevalce (CD45/CD3/CD20/DAPI) in mini-panel za karcinomske označevalce (EpCAM/CK7/CK20/DAPI). V analizo smo vključili vzorce, odvzete z aspiracijsko biopsijo s tanko iglo (ABTI) in izlive, pri katerih je bila citopatološka diagnoza že zaključena in bi jih sicer po izdaji izvida zavrgli. Iz vzorcev smo pripravili citospine in primerjali dve metodi priprave: 1) s komercialnim X-ZELL protokolom (X-ZELL stekla, Cytofuge/citocentrifuga, krio-fiksacija in krio-barvanje) ter 2) s klasično metodo s Superfrost Plus stekli (Epredia), Shendon citocentrifugo in metanolno fiksacijo na 4 °C, ki ji je sledila krio-fiksacija in krio-barvanje po X-ZELL protokolu. Kot kontrolo smo uporabili citospine pobarvane z ICK metodo. Ocenili smo delež pozitivnih celic za vsak tarčni označevalcec, ohranjenost celične morfologije ter prisotnost ozadja. Rezultate smo podali opisno.

V analizo smo vključili deset primerov: 7 ABTI (5 limfomskih, 2 reaktivna vzorca) za testiranje mini-limfomskega panela in 2 ABTI ter 1 izliv (adenokarcinomi) za testiranje mini-karcinomskega panela. Pri ocenjevanju deležev celic razlik med X-ZELL in rutinsko pripravljenimi citospini nismo zaznali (razen pri CD20 pozitivnih celicah v enem vzorcu), rezultati so bili primerljivi tudi s kontrolnimi citospini pobarvani po metodi ICK. X-ZELL citospini so imeli bolj ohranjeno celično morfologijo in intenzivnejše barvanje tarčnih celic brez ozadja, medtem ko so rutinsko pripravljene citospini imeli nekoliko šibkejšo intenziteto barvanja, zlasti pri šibkih fluorokromih, kot je CD20-APC. Pri mini-karcinomskega panelu smo pri ABTI vzorcih opazili močno barvanje citoplazemskih označevalcev (CK7), medtem ko so membranski označevalci (EpCAM) imeli malce šibkejšo intenziteto barvanja, precej v primerih, ko morfologija celic ni bila ohranjena. V vzorcih izlivov je bila ne glede na uporabljeno metodo morfologija celic ohranjena, barvanje pa močno.

Naši rezultati kažejo, da lahko platformo X-ZELL uporabimo tudi na rutinsko pripravljenih citospinih, zlasti pri vzorcih izlivov. Pri ABTI vzorcih lahko rezultate izboljšamo, morda z uporabo X-ZELL stekel, ledeno hladnega metanola in izogibanjem šibkim fluorokromom za kritične označevalce, kar bi lahko povečalo kakovost in zanesljivost barvanja.

TRENDI ZBOLEVANJA ZA RAKOM MED MLAJŠIMI OD 50 LET V OBDOBJU 1961–2021

Ana Mihor, Mojca Birk, Tina Žagar, Sonja Tomšič, Maja Jurtela, Nika Bric, Katarina Lokar, Amela Duratović Konjević, Barbara Mihevc Ponikvar, Teja Oblak, Ema Kobal, Vesna Zadnik

Sektor onkološke epidemiologije in register raka, Onkološki inštitut Ljubljana, Ljubljana, Slovenija

Elektronski naslov: amihor@onko-i.si

Pogosto rak štejemo kot bolezen starejših ljudi. Iz več držav z visokim indeksom razvoja poročajo o trendih povišanja incidence raka pri mlajših od 50 let, ki so bolj strmi kot pri starejših ter nakazujejo učinek rojstne kohorte – preloma v trendih z določeno generacijo zaradi sprememb v izpostavljenosti nevarnostnim dejavnikom za raka. V prispevku smo pregledali breme raka in njihove trende pri mladih odraslih v Sloveniji ter jih primerjati z ugotovitvami drugod po svetu.

Iz baze podatkov Registra raka Republike Slovenije smo pridobili podatke o rakih za obdobje 1961–2021. Stratificirano po spolu, treh (ali dveh) starostnih skupinah (20–49 let, 50–74 let in 75+ ali 50+) in poenostavljenem registrskem stadiju ob diagnozi smo za vse rake skupaj ter po posameznih skupinah vrst rakov analizirali absolutne številke, starostno specifično, grobo in starostno standardizirano stopnjo (SSS) incidence in umrljivosti. Za oceno časovnih trendov smo izračunali povprečno letno spremembo (PLC) s programom JoinPoint. 5-letno čisto preživetje smo izračunali po metodi Pohar-Perme.

Leta 2021 je za rakom zbolelo nekaj več kot 1.500 mladih odraslih (stari 20–49 let) in okoli 10–krat več starejših od 50 let (blizu 16.000), umrlo pa okoli 180 oziroma nad 30-krat manj kot starejših (okoli 6.000). Stopnja zbolevanja je pri mladih višja pri ženskah na račun raka dojke, po 55. letu se trend obrne in zboleva več moških. Lestvici najpogostejših rakov se razlikujeta: pri 20–49 let je najpogostejši rak dojke, sledijo nemelanomski rak kože (NMRK), maligni melanom (MM), rak mod ter debelega črevesa in danke (DČD); pri 50+ let je najpogostejši NMRK, sledijo rak prostate, pljuč, dojke in DČD. SSS incidence za vse rake skupaj narašča pri mlajših in starejših od 50 let (PLS v 1961–2021 20–49 let +1,8%, 50+ let +1,7%). Rak DČD pri 20–49 let narašča, pri starejših pa od leta 2009 upada (20–49 let moški +1,9%, ženske +1,4%; 50+ let moški +3,4% pred in -3,9% v 2009–2021, ženske +3,0% pred in -3,0% v 2009–2021). Rak dojke narašča pri 20–49 let (+2,0%) in 50+ (1961–2000 med +2 in +5%, 2001–2021 +0,8). Nekateri drugi raki, kjer se med mladimi incidenca povečuje, so NMRK (PLS pri mladih in starejših podoben), MM (PLS podoben), rak mod (porast samo pri mladih) in rak ščitnice (PLS višji pri mlajših). 5-letno čisto preživetje je celokupno in pri najpogostejših rakih boljše pri mlajših kot starejših. Odstopata rak DČD, kjer je od vpeljave presejanja boljše v starosti 50–74 let kot 20–49 let, vendar neznačilno (2017–2021: 68,2%, IZ 66,4–70,0; proti 64,7%, IZ 60,2–69,5), in rak dojke, kjer je pri starih 50–74 letih in 20–49 let v zadnjih 10 letih podobno (2017–2021: 92,0%, IZ 90,9–93,0; proti 92,8%, IZ 91,4–94,2).

Čeprav je rak pogostejši pri starejših, SSS incidence narašča tudi pri mlajših, vendar s podobnim PLS. Pomembna odstopanja med mlajšimi in starejšimi so v trendu SSS incidence raka DČD, kjer pri 50+ let od vpeljave presejanja upada, pri 20–49 let pa narašča. Kljub podobni porazdelitvi stadijev raka DČD je preživetje boljše pri tarčni presejalni populaciji kot pri mladih. Vzroki povečanja raka DČD pri mlajših niso poznani; verjetno so takšni kot v celotni populaciji (postopne spremembe prehranjevanja in telesne dejavnosti v smer nezdravih vzorcev). Pri raku dojke, kjer za razliko od raka DČD ni možno odkrivati in zdraviti premalignih sprememb, je trend incidence v vseh starostnih skupinah pozitiven, v zadnjih 20 letih pa pri starejših bolj položen. Porazdelitev stadijev raka dojke je pri starejših bolj ugodna, verjetno zaradi zgodnejšega odkrivanja s presejanjem, a je preživetje pri mlajših in tarčni presejalni populaciji podobno. Pomemben vpliv na zbolevanje imajo generacijske

spremembe reproduktivnih vzorcev žensk (manjšanje števila otrok, vse višja starost pri prvem otroku). Rak mod, ki ima dobro prognozo, je značilen za mlajše moške in samo v tej starosti tudi porašča. Več rakov ščitnice je lahko posledica dobre dostopnosti UZ preiskav, s katerimi se morda odkrije več manj nevarnih rakov kot prej. V primerjavi s tujimi raziskavami so ugotovljeni trendi podobni. Za razliko od nekaterih raziskav pri nas v splošnem ne opažamo hitrejšega povečevanja incidence raka pri mlajših odraslih v primerjavi s starejšimi.

MEROSLOVNA PODPORA ZA IZBOLJŠANJE GENOMSKEGA PROFILIRANJA V DIAGNOSTIKI RAKA

Mojca Milavec ¹, Alexandra Bogožalec Košir ¹, Metka Novak ², Barbara Breznik ², Carole A. Foy ³, Carla Divieto ⁴

¹ Oddelek za biotehnologijo in sistemsko biologijo, Nacionalni inštitut za biologijo, Ljubljana, Slovenija

² Oddelek za genetsko toksikologijo in biologijo raka, Nacionalni inštitut za biologijo, Ljubljana, Slovenija

³ National Measurement Laboratory, LGC, Guildford, UK

⁴ Istituto Nazionale di Ricerca Metrologica (INRiM), Turin, Italy

Elektronski naslov: mojca.milavec@nib.si

Nedavni tehnološki napredek na področju molekularne biologije, zlasti na področju sekvenciranja nove generacije (NGS), je prinesel pomemben napredek v diagnostiki raka. NGS omogoča genomsko profiliranje, kar vodi do natančnejših diagnoz, prilagojenih načrtov zdravljenja in razvoja novih, ciljnih terapij. Kljub temu napredku se kakovost in zanesljivost genomskega profiliranja med različnimi laboratoriji zelo razlikujeta, kar lahko vpliva na izide zdravljenja pacientov in učinkovitost zdravstvenega sistema. Postopek je kompleksen, večstopenjski in odvisen od številnih dejavnikov kot so priprava vzorca, kvaliteta izolirane nukleinske kisline ali postopek za analizo rezultatov. Večjo zanesljivost genomskega profiliranja bi lahko dosegli z razvojem standardov in uvajanjem meroslovnih pristopov v kritičnih stopnjah postopka.

Meroslovje je znanost o merjenju. Njen namen je zagotoviti, da so rezultati meritev zanesljivi, ne glede na to, kje in kdaj so bile meritve opravljene. Mednarodni projekt Metrology for genomic profiling to support early cancer detection and precision medicine, na kratko GenomeMET, je namenjen razvoju meroslovne podpore za genomsko profiliranje in precizno medicino. V okviru projekta poteka razvoj referenčnih merilnih sistemov za podporo validaciji obstoječih in novih metod za genomsko profiliranje in za zagotavljanje kakovosti analize.

Kot modela za določanje kritičnih točk za kontrolo kakovosti v procesu genomskega profiliranja smo izbrali tkiva tumorjev nedrobnoceličnega pljučnega raka in vzorce tekočinskih biopsij raka prebavil. Genomsko profiliranje partnerji v projektu izvajajo na različnih platformah z različnimi komercialnimi kompleti in z metodami razvitimi v laboratorijih.

Za podporo validaciji metod in za vrednotenje kontrolnih in referenčnih materialov razvijamo in ocenjujemo merilne postopke za izbrane genetske označevalce raka na sledečih genih: *EGFR*, *KRAS*, *NRAS*, *MET*, *PIK3CA*, *TP53* in *ESR1*. Merilni postopki temeljijo na digitalnem PCR (dPCR), ki omogoča merjenje absolutne koncentracije izbranega označevalca. Te merilne postopke bomo uporabili kot kontrolne meritve za določanje deleža mutacij in kratkih izbrisov pri izbranih vzorcih za genomsko profiliranje, standardih WHO in materialih za zunanje sheme preverjanja kakovosti za INSTAND (*nem.* Gesellschaft zur Förderung der Qualitätssicherung in medizinischen Laboratorien e.V.; Društvo za spodbujanje zagotavljanja kakovosti v medicinskih laboratorijih) in GenQA (*angl.* Genomic Quality Assessment; Ocenjevanje kakovosti v genomiki).

Količina in kvaliteta DNA, ki jo izoliramo iz vzorca, sta ključnega pomena za uspešno genomsko profiliranje, zato razvijamo tudi referenčne merilne postopke za določanje količine in kvalitete DNA izolirane iz tkiva tumorja ali tekočinske biopsije. V postopku vrednotenja sta metodi na osnovi dPCR za sočasno določanje petih humanih referenčnih genov in za določanje fragmentacije DNA, s katerima bomo primerjali fluorimetrične in spektrofotometrične metode in metode na podlagi elektroforeze.

Posebno pozornost v projektu namenjamo razvoju zanesljivega načina za določanje merilne negotovosti. Medtem ko so pristopi za določanje merilne negotovosti pri merilnih postopkih za

posamezno tarčo že precej razviti tako na področju klinične kemije kot genetskega testiranja, je določanje merilne negotovosti za večparametričnih genomskih testih zelo slabo podprto, saj mora upoštevati kvantitativne (npr. število branj, pogostost variantnega alela) in kvalitativne (npr. identiteta zaporedja ali variante) parametre. S tem bomo laboratorijem pomagali razumeti vire merilne negotovosti in potencialen razpon napak pri analizah.

Rezultati bodo koristili pacientom, kliničnimi laboratorijem, podjetjem, ki razvijajo diagnostične teste, in regulatornim organom. S pridobivanjem zanesljivejših genomskih podatkov bo omogočena širša uporaba personalizirane medicine, kar bo na koncu izboljšalo rezultate zdravljenja pacientov in pomagalo zmanjšati stroške zdravstvenega varstva.

Zahvala

GenomeMET je prejel finančna sredstva iz Evropskega partnerstva za meroslovje, ki ga sofinancirajo program Evropske unije za raziskave in inovacije Obzorje Evropa ter sodelujoče države.

UČINKI ELEKTROKEMOTERAPIJE V KOMBINACIJI S SOTORASIBOM NA HUMANIH RAKAVIH CELICAH TREBUŠNE SLINAVKE

Maša Omerzel^{1,2}, Tanja Jesenko^{1,3}, Tina Živič¹, Gregor Serša^{1,2}, Maja Čemažar^{1,4}

¹ Onkološki inštitut Ljubljana, Ljubljana, Slovenija

² Zdravstvena fakulteta, Univerza v Ljubljani, Ljubljana, Slovenija

³ Medicinska fakulteta, Univerza Ljubljana, Slovenija

⁴ Fakulteta za zdravstvene vede, Univerza na Primorskem, Izola, Slovenija

Elektronski naslov: momrzel@onko-i.si

Elektrokemoterapija se najpogosteje uporablja za zdravljenje kožnih tumorjev. S tehnološkim napredkom pri razvoju elektrod se je začela uporabljati tudi za globoko ležeče tumorje. Ena izmed novejših aplikacij v klinični praksi je zdravljenje raka trebušne slinavke. Izvedljivost in varnost pristopa smo dokazali v predkliničnih študijah na prašičjem modelu, izvedena je bila tudi prva klinična študija. Kljub temu primanjkuje raziskav, ki bi ovrednotile medsebojno delovanje zdravil, ki se uporabljajo v klinični praksi za zdravljenje raka trebušne slinavke. V nekaj odstotkih obolelih za rakom trebušne slinavke je v proteinu KRAS prisotna mutacija G12C, ki se zdravi s KRAS inhibitorjem sotorasibom.

Namen raziskave je bil določiti učinke sočasne terapije s sotorasibom in elektrokemoterapijo *in vitro* na dveh humanih rakavih celicah trebušne slinavke, z in brez mutacije G12C v KRAS proteinu .

Ugotovili smo, da so mutirane celice bistveno bolj občutljive na samo elektrokemoterapijo s cisplatinom ali bleomicinom v primerjavi z nemutiranimi celicami. Dodatek sotorasiba pa je imel aditivni ali sinergistični učinek, odvisno od koncentracije citostatika, ki smo ga uporabili pri elektrokemoterapiji.

INTERDISCIPLINARNE POTI RAZVOJA NOVE GENERACIJE FLUORESCENČNIH OZNAČEVALCEV ZA CILJNO DIAGNOSTIKO BURKITTOVEGA LIMFOMA

Maša Pelan^{1,2}, Tomaž Prelog³, Veronika Škrjanc², Gašper Tavčar¹, Janez Jazbec^{3,4}, Maja Čemažar^{2,5}, Tanja Jesenko^{2,6}, Marko Jeran¹

¹ Odsek za anorgansko kemijo in tehnologijo, Institut "Jožef Stefan", Ljubljana, Slovenija

² Oddelk za eksperimentalno onkologijo, Onkološki inštitut Ljubljana, Ljubljana, Slovenija

³ Pediatrična klinika, Klinični oddelek za otroško hematologijo in onkologijo, Univerzitetni klinični center Ljubljana, Ljubljana, Slovenija

⁴ Medicinska fakulteta, Katedra za pediatrijo, Univerza v Ljubljani, Ljubljana, Slovenija

⁵ Fakulteta za vede o zdravstvu, Univerza na Primorskem, Izola, Slovenija

⁶ Univerza v Ljubljani, Medicinska fakulteta, Katedra za onkologijo, Ljubljana, Slovenija

Elektronski naslov: marko.jeran@ijs.si

Burkittov limfom je zelo agresivna oblika ne-Hodgkinovega limfoma, ki lahko prizadene ljudi vseh starosti, najpogosteje pa se pojavlja pri otrocih in mladostnikih. Značilna je izjemno hitra rast tumorja, ki se lahko neopazno in hitro razširi po telesu, zato zahteva nujno medicinsko ukrepanje. Čeprav so simptomi pri bolnikih pogosto podobni – kot so otekanje bezgavk, bolečine v trebuhu, utrujenost ali izguba telesne teže – so ti znaki pogosto spregledani ali napačno interpretirani, kar lahko vodi v pozno diagnozo. Ob pojavu suma na Burkittov limfom ali Burkittovo levkemijo, o kateri govorimo, ko so maligne celice razširjen v kostnem mozgu (njegovo levkemično obliko), je tako ključnega pomena takojšen pričetek zdravljenja. Epidemiološko ločimo tri oblike Burkittovega limfoma: endemično, ki se pojavlja predvsem v podsaharski Afriki, sporadično, ki je pogostejša v zahodnem svetu, ter imunsko povezano obliko, ki je povezana z oslabilnim imunskim sistemom. Zdravljenje Burkittovega limfoma je kompleksno in se določa na podlagi več dejavnikov – med najpomembnejšimi je stadij bolezni. Zaradi njegove agresivnosti je zgodnja diagnoza ključna za uspeh zdravljenja, ki običajno vključuje intenzivno kemoterapijo in po potrebi imunoterapijo, vsekakor pa je zaradi intenzivnosti zdravljenja nujna tudi podporna terapija (običajno so na tem mestu mišljeni transfuzija krvi, antibiotično zdravljenje, ko je potrebno, in podobno).

Zaradi razvoja naprednih diagnostičnih orodij na področju onkologije, se v mislih za dobrobit pacientov, lotevamo interdisciplinarnega povezovanja. Na pričujočem področju, v okviru sinteze znanja, raziskujemo nove spojine vodnice, ki bodo na osnovi kemijskih in mikrobioloških lastnosti označevala tumorska stanja. Cilj, ki ga zasledujemo odraža tudi komercialni dostop in visoko ekonomijo same reakcije, kjer se nova učinkovina tvori. Fluorescenčna barvila zaradi svoje edinstvenosti posegajo na različna znanstvena kot tudi medicinska področja. Zaradi specifičnosti vezave na biološke molekule in njihove enostavne detekcije, so postali nepogrešljivo orodje pri diagnosticiranju in zdravljenju raka. Poleg medicine se njihova uporaba vrši tudi v kemiji, forenziki, kirurgiji, okoljevarstvu in podobno. Njihova ključna prednost je vizualizacija že pri zelo nizkih koncentracijah. Fluorescenčne označevalce lahko razvrstimo v tri splošne skupine: organska barvila, biološki fluoroforji in kvantne pike. Prva organska barvila na področju molekularne biologije so služila izboljšanju fotostabilnosti in z različnimi derivati tudi topnosti. Zaradi majhnosti omogočajo manj invazivno vezavo na makromolekule, kot so protitelesa. Biološke fluoroforje najdemo v nekaterih rastlinah in živalih – znan primer je zeleni fluorescenčni protein (GFP), izoliran iz meduze v 90. letih, in danes razpoložljiv v številnih različicah ter široko uporabljen v molekularni biologiji. Kvantne pike pa so fluorescenčni nanokristali, ki zaradi svojih posebnih optičnih lastnosti predstavljajo obetavno alternativo klasičnim fluoroforjem, predvsem v napredni bioanalitiki.

Prav zaradi omenjenega raziskovalno delo obravnava apliciranje fluorescenčnih barvil na zrele celice Burkittovega limfoma ter vrednotenje njihove citotoksičnosti. Z upoštevanjem načela polarnosti, je bilo pokazano, da učinkovine z lipofilnim karakterjem zaradi svojih edinstvenih kemijskih lastnosti učinkovito vstopajo v nepolaro membrano celic Burkittovega limfoma. V primerjavi z njimi, celice ob izpostavitvi učinkovini s stranskimi vodotopnimi substituenti kažejo v višjo intenzivnost jakosti fluorescence. Skladno z viabilnostjo je potrebno ob študiju na tovrstnih sistemih pozornost nameniti tudi morfološkim analizam heterogenih celičnih oblik in struktur različnih arhitektur.

Zahvala

Prispevek je nastal v okviru raziskav programov (P1-0045, P3-0003 in P3-0343) Javne agencije za znanstvenoraziskovalno in inovacijsko dejavnost Republike Slovenije (ARIS).

Literatura

1. Prelog T, et al. Burkitt lymphoma and diffuse large B-cell lymphoma in children. *Proc Socr Lect.* 2025;13:40–45.
2. Marinko K, et al. Fluorescence and fluorescein as pivotal tools in cancer diagnosis and therapy. *Proc Socr Lect.* 2024;11:7–19.
3. Pečan LI, Pečavar Nežmah P, Jeran M. Fluorescenca kot pomembno orodje v aplikativni naravoslovni znanosti. *Okapi.* 2022;2:18-19.

PRIMERJAVA SKLADNOSTI IN NAPOVEDNE VREDNOSTI NOVEGA PROLIFERACIJSKEGA PODPISA APIS Z ONCOTYPE Dx PODPISOM TER S KLASIČNO IMUNOHISTOKEMIČNO METODO DOLOČANJA KARAKTERISTIK RAKA DOJK

Nina Privšek, Petra Škerl, Barbara Gazić, Vida Stegel, Cvetka Grašič Kuhar

Onkološki inštitut Ljubljana, Ljubljana, Slovenija

Elektronski naslov: nprivsek@onko-i.si

Izbira zdravljenja pri raku dojk je odvisna od podtipa raka in tveganja ponovitve. Pri hormonsko pozitivnem (HR+)HER2- podtipu so na tržišču različni testi osnovani na analizi ekspresije genov (za določanje genskega podpisa), ki nam pomagajo pri odločitvi o izbiri dopolnilnega sistemskega zdravljenja: samo hormonska terapija (HT) ali kemoterapija in HT (KT-HT). Eden od testov, katerega uporaba je priporočena po mednarodno priznanih smernicah, je Oncotype Dx test. Na tržišču je nov test APIS, namenjen za določanje genskega proliferacijskega podpisa, ki ga je potrebno validirati pred morebitno uporabo v klinični praksi.

Prvi namen raziskave je preučiti skladnost rezultatov metod APIS, klasične imunohistokemične metode (IHK) in Oncotype Dx pri opredelitvi osnovnih značilnosti raka dojk. Drugi namen je preučiti prognostično in prediktivno vrednost metode APIS (za odgovor na sistemsko zdravljenje in prognozo raka dojk) v primerjavi z metodama IHK in Oncotype Dx.

V restrospektivni raziskavi, ki je potekala na Onkološkem inštitutu Ljubljana, smo vključili 99 bolnic s HR+ HER2- rakom dojk stadija I-IIB, primarno zdravljenih z operacijo, ki so pred odločitvijo o vrsti dopolnilnega sistemskega zdravljenja imele opravljen genski podpis Oncotype Dx. Iz vzorcev tumorskega tkiva vklopljenega v parafin smo izolirali RNA, in z uporabo testa Apis Breast Cancer Subtyping Kit, ki temelji na analizi mRNA z metodo RT-qPCR, določili podtip raka in proliferacijski podpis. Rezultate smo primerjali z metodama IHK in Oncotype Dx. Mediana starosti bolnic je bila 55 let (razpon 30-78), 52,5 % je imelo stadij IA, 41,4 % stadij IIA in 6,1 % stadij IIB. Test APIS jih je opredelil kot luminalni A podtip (76,8 %), luminalni B HER2- (23,2 %), pri treh vzorcih test ni uspel. 54,5 % bolnic je bilo pomenopavznih, 52,5 % je prejelo dopolnilno HT z zaviralci aromataze. Ugotovili smo močno korelacijo med testoma APIS in Oncotype Dx glede estrogenskih receptorjev ($\tau_B = 0,601$, $p < 0,001$), progesteronskih receptorjev ($\tau_B = 0,661$, $p < 0,001$) in zmerno korelacijo glede HER2 ($\tau_B = 0,462$, $p < 0,001$). Test APIS je močno koreliral z IHK pri progesteronskih receptorjih ($\tau_B = 0,595$, $p < 0,001$), zmerno pri HER2 ($\tau_B = 0,370$, $p < 0,001$) in šibko pri estrogenskih receptorjih ($\tau_B = 0,202$, $p = 0,015$). Test Oncotype Dx in IHK sta močno korelirala pri progesteronskih receptorjih ($\tau_B = 0,599$, $p < 0,001$), srednje pri HER2 ($\tau_B = 0,356$, $p < 0,001$) in šibko pri estrogenskih receptorjih ($\tau_B = 0,156$, $p = 0,086$). Glede na metodo IHK je bilo 46 bolnic (46,5 %) klinično z visokim tveganjem, glede na metodo Oncotype Dx 23 (23,2 %) in glede na metodo APIS 70 (70,7 %). Pri rezultatu metode Oncotype Dx ($RS \geq 26$) z visokim tveganjem je bilo 22 od 23 bolnic zdravljenih s KT-HT, pri metodi Oncotype Dx $RS < 26$ (nizko tveganje) je 5 bolnic prejelo KT-HT, 70 pa samo HT. Najbolj pravilno je ponovitev boleznih napovedal proliferacijski podpis APIS (vse ponovitve so bile v skupini z visokim tveganjem (9/9), $p = 0,041$), sledila je metoda IHK (3 ponovitve so bile v nizko- in 7 v skupini z visokim tveganjem, $p = 0,062$), najmanj natančna se je izkazala metoda Oncotype Dx ($p = 0,387$; 9 ponovitev je bilo v skupini z nizkim tveganjem ($RS < 26$), 1 ponovitev v skupini z visokim tveganjem ($RS \geq 26$)).

Pokazali smo, da proliferativni indeks APIS opredeli večji odstotek bolnic za bolnice z visokim tveganjem, obenem pa se je to na našem vzorcu izkazalo kot najbolj zanesljiv napovedni test ponovitve med vsemi tremi uporabljenimi testi.

p29

ELEMENTI V SLEDOVIH V SERUMU KOT POTENCIALNI BIOMARKERJI PRI BOLNIKIHZ RAKI BILIARNEGA TRAKTA- preliminarni rezultati

Martina Reberšek^{1,2}, Nežka Hribernik^{1,2}, Katarina Kozlica³, Katja Uršič Valentinuzzi^{4,5}, Maja Čemažar^{4,6}, Radmila Milačič Ščančar^{3,7}, Janez Ščančar^{3,7}

¹ Sektor internistične onkologije, Onkološki inštitut Ljubljana, Ljubljana, Slovenija

² Medicinska fakulteta, Univerza Ljubljana, Slovenija

³ Inštitut Jožef Stefan, Ljubljana, Slovenija

⁴ Oddelek za eksperimentalno onkologijo, Onkološki inštitut Ljubljana Slovenija

⁵ Biotehniška fakulteta, Univerza Ljubljana, Slovenija

⁶ Fakulteta za zdravstvene vede, Izola, Univerza na Primorskem

⁷ Mednarodna podiplomska šola Jožef Stefan, Ljubljana, Slovenija

Elektronski naslov: mrebersek@onko-i.si

p30 Raki biliarnega trakta (RBT) so redka in heterogena skupina rakov. Običajno jih odkrijemo v napredovali fazi, ko je bolezen neozdravljiva. Trenutno določamo tumorski marker CA 19-9 v krvi, ki pa ima omejeno diagnostično vrednost za RBT, zato nujno potrebujemo bolj občutljive in specifične biomarkerje za njihovo zgodnejše diagnosticiranje. Deregulacija homeostaze elementov v sledovih je vključena v kancerogenezo različnih vrst raka, vključno z RBT. Namen naše raziskave je bil oceniti potencialno vlogo elementov v sledovih kot biomarkerjev za RBT. V našo prospektivno, neintervencijsko, nerandomizirano klinično raziskavo (NCT06060990) je bilo vključenih dvajset zdravih prostovoljcev (ZP) (10 Ž/10 M) in 12 (9 Ž/3 M) bolnikov z napredovalim RBT. V vzorcih seruma ZP in bolnikov z RTB smo določili celotne koncentracije bakra (Cu), cinka (Zn), železa (Fe), selena (Se) in mangana (Mn) z masno spektrometrijo z induktivno sklopljeno plazmo (ICP-MS), s speciacijsko analizo na osnovi združene monolitne kromatografije v povezavi z ICP-MS pa deleže prostega Cu in Cu vezanega na ceruloplazmin (Cp). Na osnovi rezultatov smo želeli ugotoviti, ali lahko razmerja med celotnimi koncentracijami izbranih elementov in koncentracije Cu-Cp uporabimo kot potencialni napovedni biomarker odgovora na sistemsko terapijo (ST), v povezavi z radiološko CT oceno. Povprečna starost ZP je bila 60 let, bolnikov z RBT pa 62.4 let. Devet od 12 bolnikov (5 EHC/4 IHC/3 KŽ) je imelo primarno metastatsko bolezen. Izhodiščni CA19-9 je bil povišan pri 10 bolnikih. Sedem bolnikov je prejelo kemoimunoterapijo kot ST prve izbire. Najboljši radiološki odziv na ST je bil 1 popoln odgovor, 2 delna odgovora, pri 7 bolnikih je bila dosežena stabilna bolezen, pri 2 bolnikih je bilo ugotovljeno napredovanje bolezni. Srednja vrednost koncentracij Cu v serumu je bila pri ZP 1087 ng/ml, pri bolnikih z RBT pa 1283 ng/ml pred in 1214 ng/ml po ST. Delež Cu, vezanega na Cp, je bil pri ZP 89.5 % in pri bolnikih z RBT 90.5 % pred in 89.0 % po ST. Srednje vrednosti koncentracij Zn, Mn, Fe in Se v serumu ZP so bile 1010 ng/ml, 1.30 ng/ml, 1246 ng/ml in 133 ng/ml. Pri bolnikih z RBT pa so bile pred zdravljenjem Zn 749 ng/ml, Mn 0.89 ng/ml, Fe 934 ng/ml in Se 86.9 ng/ml, po zdravljenju pa Zn 831 ng/ml, Mn, 1.02 ng/ml, Fe 969 ng/ml Fe in Se 87.2 ng/ml. Srednja vrednost razmerij Cu/Zn je bila pri ZP 1.05, pri bolnikih z RBT pa 1.84 pred in 1.47 po ST. Koncentracije Cu so pri ZP nižje kot pri bolnikih z RBT, delež Cu, vezanega na Cp, pa se ne razlikuje med obema skupinama. Koncentracije Zn in Se pa so pri ZP višje kot pri bolnikih z RBT. Cu, vezan na Cp, ni primeren biomarker za RBT. Vrednosti koncentracij Cu in Zn in razmerje Cu/Zn imajo napovedno vrednost kot potencialni biomarkerji za RBT, za zgodnejše odkrivanje bolezni in spremljanje učinkovitosti sistemskega zdravljenja.

Zahvala

Raziskava je potekala v okviru internega projekta, ki ga financira Onkološki inštitut Ljubljana OI-1-24, v okviru projekta J7-50128 in programov P03-321, P1- 0143. P3-0003, ki jih financira Javna agencija za znanstvenoraziskovalno in inovacijsko dejavnost Republike Slovenije (ARIS).

OPREDELITEV MEHANIZMOV CELIČNE SMRTI PO ELEKTROKEMOTERAPIJI V POGOJIH *IN VITRO*

Lara Snoj^{1,2}, Gregor Serša^{1,3}, Maja Čemažar^{1,4}, Boštjan Markelc^{1,5}

¹ Oddelek za eksperimentalno onkologijo, Onkološki inštitut Ljubljana, Ljubljana, Slovenija

² Medicinska fakulteta, Univerza v Ljubljani, Ljubljana, Slovenija

³ Zdravstvena fakulteta, Univerza v Ljubljani, Ljubljana, Slovenija

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

⁵ Biotehniška fakulteta, Univerza v Ljubljani, Ljubljana, Slovenija

Elektronski naslov: lsnoj@onko-i.si

Elektrokemoterapija (ECT) je lokalna ablativna terapija, ki z uporabo električnih pulzov poveča vnos citostatikov, kot so bleomicin (BLM), cisplatin (CDDP) in oksaliplatin (OXA), v celice ter s tem poveča njihovo terapevtsko učinkovitost. Poleg neposrednih citotoksičnih učinkov, ECT sproži tudi imunogeno celično smrt (ICD) in tako prispeva k proti-tumorskemu delovanju. ICD je oblika celične smrti, ki omogoča aktivacijo pridobljenega imunskega odziva proti antigenom, sproščenim iz umirajočih tumorskih celic, katere v tem primeru delujejo kot *in situ* protitumorsko cepivo. Imunogene značilnosti ICD torej temeljijo na sproščanju signalnih molekul, imenovanih s poškodbo povezani molekulski vzorci (angl. »damage-associated molecular patterns«, DAMPs). Ločimo dve glavni skupini: konstitutivne DAMP molekule (cDAMPs), ki so normalno prisotne v zdravih celicah in se sprostijo ob poškodbi celične membrane, ter inducirane DAMP molekule (iDAMPs), ki se v celicah sintetizirajo kot odziv na stres. Med ključne predstavnike cDAMP molekul sodijo kalretikulin (CARL), adenozin trifosfat (ATP) in jedrni protein HMGB-1, med iDAMP pa citokini, katerih izražanje uravnava jedrni faktor NF- κ B, interferoni tipa 1 ter člani družine IL-1. Za to, da celično smrt opredelimo kot imunogeno, morajo umirajoče celice sprostiti ali izpostaviti DAMP signale v časovno usklajenem zaporedju, saj le tako lahko pride do učinkovite aktivacije pridobljene imunosti. Za popoln izkoristek potenciala ICD, ki jo sproži ECT, je zato nujno natančno opredeliti vrsto in časovni potek celične smrti ter raziskati dinamiko sproščanja in medsebojnih interakcij DAMP molekul pri vsakem citostatiku posebej. V ta namen smo s sistemom CRISPR-Cas9 pripravili celične linije, katerim smo odstranili gene, ključne za specifične poti celične smrti (Bax in Bak za apoptozo, RIPK3 in MLKL za nekroptozo, GSDME in GSDMD za piroptozo). Naši rezultati so pokazali, da inhibicija posameznih efektorskih poti apoptoze ali piroptoze ne prepreči celične smrti po ECT v celoti, kar potrjuje, da ti mehanizmi niso ključni za njen učinek. ECT verjetno sproži alternativne poti celične smrti, ki prispevajo k njenim citotoksičnim in imunogenim učinkom. Za popolno razumevanje teh procesov bodo potrebne nadaljnje raziskave.

p31

POOBSEVALNA KSEROSTOMIJA IN NJENO ZDRAVLJENJE Z ALOGENSKIMI MEZENHIMSKIM STROMALNIMI MATIČNIMI CELICAMI: REZULTATI PILOTNE ŠTUDIJE

Primož Strojjan^{1,2}, Marko Kokalj¹, Gaber Plavc^{1,2}, Goran Mitrović¹, Olga Blatnik¹, Luka Ležaič^{2,3}, Aljaž Sočan³, Aljosa Bavec², Nataša Tesić⁴, Katrina Hartman⁴, Urban Švajger^{2,4}

¹ Onkološki inštitut Ljubljana, Ljubljana, Slovenija

² Univerza v Ljubljani, Medicinska fakulteta in Fakulteta za farmacijo, Ljubljana, Slovenija

³ Univerzitetni klinični center Ljubljana, Klinika za nuklearno medicino, Ljubljana, Slovenija

⁴ Zavod RS za transfuzijsko medicino, Ljubljana, Slovenija

Elektronski naslov: pstrojjan@onko-i.si

Kserostomija je stanje, ko ustna sluznica zaradi pomanjkljivega delovanja ali nedelovanja žlez slinavk ni primerno navlažena. Eden najpomembnejših vzrokov za to stanje je radioterapija rakov glave in vratu. V Sloveniji za temi raki zbolijo 450-500 bolnikov letno in kar 80 % je zdravljenih (tudi) z radioterapijo. Kserostomija stopnje 2 (spremenjena prehrana, tj. lubrikanti, mehka hrana) oz. 3 (potrebno je hranjenje po sondi ali popolna parenteralna prehrana) po lestvici CTCAE v5.0 ameriškega Nacionalnega inštituta za raka (NCI) se je ob uporabi starejših obsevalnih tehnik razvila pri 60-70 % bolnikov in po IMRT/VMAT pri okoli 40 % bolnikov. Obstoječe možnosti zdravljenja kserostomije (holinergični agonisti, stimulansi, substituti, lubrikanti, HBO, električna živčna stimulacija, akupunktura) so neučinkovite.

Zdravljenje z mezenhimskimi stromalnimi matičnimi celicami (MSC) se je na živalskih modelih in kasneje pri ljudeh izkazalo za varno, pri živalih tudi kot učinkovito. Pri bolnikih s poobsevalno kserostomijo je bilo opravljenih le nekaj raziskav faze I ali II, kjer so uporabili bodisi autologne matične celice, pridobljene iz maščobnega tkiva ali iz kostnega mozga, bodisi alogene matične celice iz maščobnega tkiva.

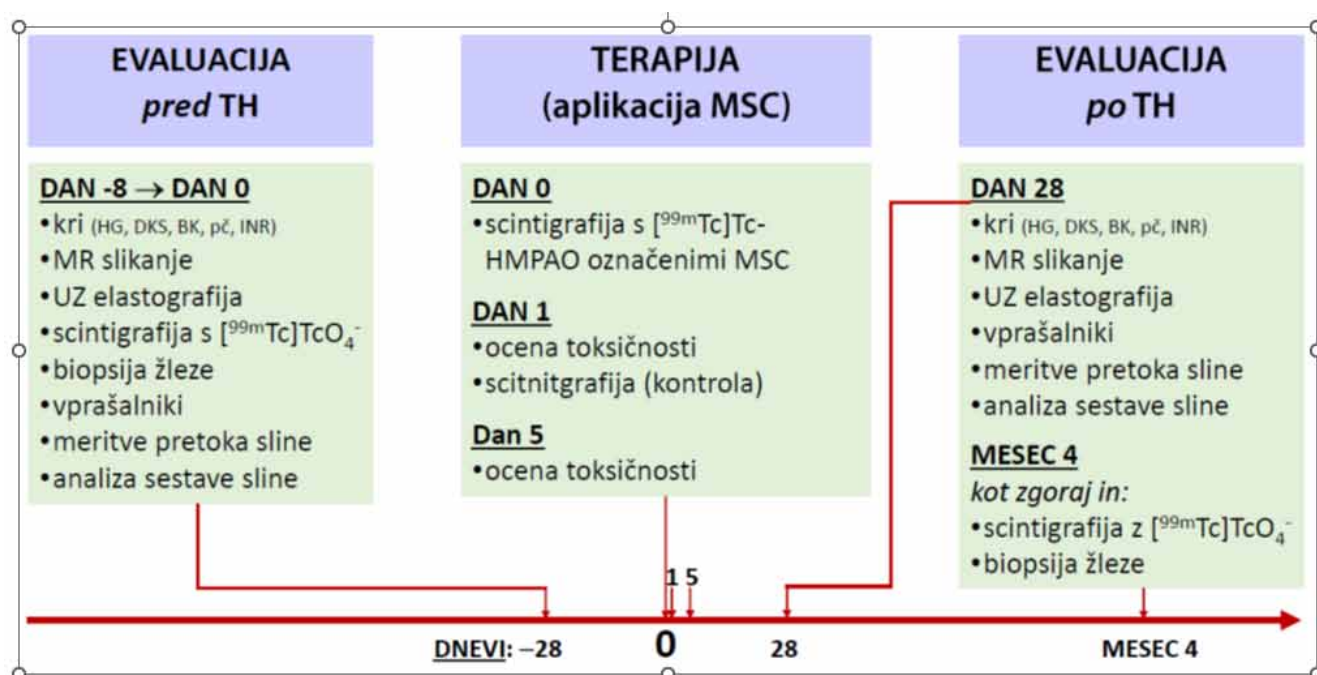
Z namenom preveriti varnost in preliminarno učinkovitost zdravljenja poobsevalne kserostomije z alogenskimi MSC, pridobljenimi iz tkiva popkovnice, je bila leta 2023 zastavljena nerandomizirana, enocentrična in odprta raziskava faze I, ki je preverjala hipotezo, da je zdravljenje kserostomije po (kemo)radioterapiji ploščatoceličnega karcinoma orofarinksa z alogenskimi MSC tkiva popkovnice varno in učinkovito. Primarni cilj raziskave je bila ocena varnosti intervencije, sekundarni cilji pa ocena njene učinkovitosti in sprememb v slinavkah po intervenciji. Protokol raziskave je prikazan na sliki. Vključitveni kriteriji so bili: bolniki obeh spolov, stari 18-75 let; ≥ 2 leti po zdravljenju ploščatoceličnega karcinoma orofarinksa UICC stadija $cT_1N_{2+}M_0$ ali $cT_{1-3}N_{0-3}M_0$ z radio(kemo)I) terapijo s kurativnim namenom; nekadilci ali bivši kadilci (≥ 2 leti); kserostomija stopnje 2 oz. 3 (CTCAE v5.0) ali pretok sline 0.05-0.20 ml/min; povprečna doza sevanja na vsako od parotidnih žlez > 26 Gy in submandibularnih žlez > 35 Gy. Intervencija je vključevala UZ vodeno aplikacijo 50×10^6 MSC v dve področji znotraj vsake izmed parotidnih žlez in aplikacijo 25×10^6 MSC v vsako izmed submandibularnih žlez. Kontrolno skupino je sestavljalo 10 zdravih prostovoljcev, primerljivih z bolniki po starosti in spolu: pri njih so bili opravljeni samo slinski testi in analiza sestave sline.

V obdobju od 18. 1. 2024 do 22. 5. 2025 je bilo vključenih 10 bolnikov, 9 moških in 1 ženska, starih 42,4-73,5 let (mediana, 55,3). Šest je bilo bivših kadilcev, 4 nekadilci; 6 tumorjev je bilo p16/HOPV pozitivnih. Interval med zaključkom onkološkega zdravljenja in aplikacijo MSC je znašal 2,1-6,3 leta (mediana, 2,9). Povprečna doza na desno in levo parotidno žlezo je bila 40,6 Gy (rang, 26,3-61) oz. 33,3 Gy (rang, 26-46,6) ter na desno in levo submandibularno žlezo 64,5 (rang, 48,9-70,7) oz. 63,1 (rang, 49,8-70,4). Klinična ocena stopnje kserostomije pred intevencijo je bila pri vseh bolnikih 2. Interval od vključitve v raziskavo do aplikacije MSC je znašal 6-28 dni (mediana, 17); od intevencije

p32

do prve in druge evaluacije je minilo 27-35 dni (mediana, 29.5) oz. 3,8-4,2 mesecev (mediana, 4,1). Zaradi tehničnih težav pri nobenem bolniku ni bilo mogoče izvesti scintigrafske ocene presaditve, retence in migracije alogenskih MSC, označenih s [^{99m}Tc]Tc-exametazime (HMPAO, Inštitut za nuklearno medicino, UKC Ljubljana). Pri enem bolniku zaradi kovinskega tujka brez znane specifikacije materiala ni bilo izvedeno slikanje z MR. Zadnji pregled z evaluacijskimi preiskavami (4 mesece po intervenciji) je opravilo 8/10 bolnikov.

V predavanju bodo predstavljeni prvi delni rezultati raziskave, ki je potekala po shemi predstavljeni v Sliki 1.



Slika 1: Shema zdravljenja poobsevalne kserostomije z alogenskimi mezenhimskimi stromalnimi matičnimi celicami (MSC). TH: terapija

SPREMEMBE TUMORSKEGA ŽILJA PO RADIOTERAPIJI: AKTIVACIJA TUMORSKEGA ENDOTELIJA POVEČA INFILTRACIJO IMUNSKIH CELIC V TUMOR

Iva Šantek, Tim Božič, Gregor Serša, Boštjan Markelc

Oddelek za eksperimentalno onkologijo, Onkološki Inštitut Ljubljana, Ljubljana, Slovenija

Elektronski naslov: isantek@onko-i.si

Radioterapija (RT) ne vpliva samo na tumorske celice, ampak tudi na tumorsko mikrookolje, vključno z endotelijskimi celicami (EC), pri čemer je odziv tumorskega žilja na RT še vedno neznan. Poleg apoptoze tumorskih endotelijskih celic (TEC) lahko IR povzroči tudi aktivacijo TEC, kar lahko poveča infiltracijo imunskih celic. S tumorjem-povezane visoke endotelijske venule (TA-HEV, angl. Tumor-associated high endothelial venules) so bile nedavno identificirane kot specializirane žilne strukture, ki olajšujejo vstop limfocitov v tumorje; vendar pa ostaja odprto vprašanje, ali jih je mogoče aktivirati z obsevanjem (IR). Zato je bil namen naše raziskave določiti spremembe v žilni strukturi in endotelijski aktivaciji, ki jih povzroča obsevanje (IR), ter kako so le te povezane z infiltracijo imunskih celic v tumor pri raku debelega črevesa.

Učinke IR na EC in TEC smo določili na nivoju *in vitro* v celičnih 2D kulturah in v modelu 3D žilja na čipu, ter na nivoju *in vivo* v mišjih modelih raka debelega črevesa CT26 in MC38. V poskusih *in vitro* smo v mišjih (bEnd.3, 2H11, SVEC4-10) in humanih (HUVEC, EA.hy926, HULEC-5a) EC linijah določili proliferacijo ter celično smrt po IR z 2–10 Gy, ter z RNA sekvenciranjem HUVEC celic 24 in 72 h po IR z 2 ali 5 Gy. V celičnih 2D kulturah in modelu 3D žilja na čipu smo nato z imunofluorescenčnim barvanjem določili aktivacijo EC po IR z 2 ali 5 Gy. V poskusih *in vivo* smo vpliv IR na TEC določili s prostorsko transkriptomiko in imunofluorescenčnim barvanjem v mišjih tumorjih po enkratni RT z dozo 15 Gy ali frakcionirani RT dozo 5 × 5 Gy. Z intravitalno mikroskopijo v modelu dorzalnega okna smo nato določili vpliv IR na interakcije med TEC in CD8⁺ citotoksičnimi limfociti T. Nazadnje smo vpliv IR na TEC določili s prostorsko transkriptomiko in imunofluorescenčnim barvanjem na bioptičnih vzorcih pacientov pred neoadjuvantno RT in vzorcih tumorjev po neoadjuvantni RT.

V mišjih in človeških EC linijah je IR (2–10 Gy) zmanjšala njihovo proliferacijo in povečala celično smrt v odvisnosti od doze. Sekvenciranje RNA obsevanih HUVEC EC je pokazalo utišanje signalnih poti povezanih s celičnim ciklom in podvojevanjem DNA ter aktivacijo p53 in FoxO signalnih poti. Ravno tako je pokazalo na zgodnjo aktivacijo prirojenih (NF- κ B, TNF α) in adaptivnih (Th1/Th2/Th17) poti imunskega odziva. V modelih žilja na čipu je IR s 5 Gy povečalo izražanje proteinov VWF in ICAM-1, translokacijo IRF9 v jedro in povečano izražanje IFN α / β , kar kaže na z IR-inducirano aktivacijo EC kar se je pokazalo v povečani interakciji med EC in limfociti. In vivo je IR s frakcionirano dozo 5×5 Gy povzročilo večjo aktivacijo Vwf, Icam-1 in Irf9 v TEC, ki jo je spremljala povečana infiltracija CD8⁺ in CD4⁺ limfocitov T v tumor. Prostorska transkriptomika v mišjih tumorjih je pokazala na obogatitev markerjev TA-HEV v TEC-pozitivnih regijah, ki so kolokalizirale z markerji imunskega odziva. Podobni rezultati so bili določeni tudi v vzorcih tumorjev pacientov po neoadjuvantni RT, pri čemer so s TA-HEV povezani markerji kolokalizirali z markerji imunskega odziva.

IR inducira aktivacijo in funkcionalno reprogramiranje tumorskih endotelijskih celic v smeri proadhezivnega in imunsko podpornega fenotipa. RT prav tako spodbuja nastanek TA-HEV, kar lahko potencialno olajša infiltracijo limfocitov v tumorje.

p33

VZPOSTAVITEV MIŠJEGA MODELA TROJNO NEGATIVNEGA RAKA DOJK 4T1 ZA PROUČEVANJE CIRKULIRAJOČIH TUMORSKIH CELIC IN PROCESA ZASEVANJA

Veronika Škrjanc, Simona Kranjc Brezar, Maja Čemažar, Boštjan Markelc, Cvetka Grašič Kuhar, Simona Miceska, Veronika Kloboves-Prevodnik, Tanja Jesenko

Onkološki Inštitut Ljubljana, Ljubljana, Slovenija

Elektronski naslov: vskrjanec@onko-i.si

Cirkulirajoče tumorske celice (CTC) predstavljajo pomemben biološki označevalec pri raku dojk. Prispevajo k razumevanju razvoja in napredovanja bolezni ter spremljanju odziva na zdravljenje. Karakterizacija in izolacija CTC sta zaradi njihove redkosti ter kompleksne sestave krvi, v kateri se nahajajo, zahtevna procesa. Posebne metode izolacije omogočajo obogatitev CTC iz vzorca krvi ter njihovo nadaljnjo analizo. Parsortix® je eden izmed sistemov za izolacijo CTC, ki temelji na razlikah v fizikalnih lastnostih celic, kot sta velikost in sposobnost deformacije. V okviru raziskave smo želeli vzpostaviti mišji model raka dojke za proučevanje časovnega poteka sproščanja CTC v kri. Uporabili smo mišji tumorski model 4T1 na mišji liniji BALB/c. Tumorje smo inducirali s subkutano injekcijo 3×10^5 celic v 100 μ L fiziološke raztopine na desnem boku ali ortotopično v mlečno žlezo in spremljali rast tumorja. Ob dosegu različnih volumnov tumorjev (50, 100, 200 in 300 mm³), ki predstavljajo različne stopnje v progresiji tumorja, smo kri (0,5-1 mL) odvzeli s punkcijo srca, nato pa izolirali CTC s sistemom Parsortix® in pripravili citološke preparate s citocentrifugo. Izolirane celice smo za oceno morfoloških značilnosti pobarvali po metodi Giemsa ter analizirali glede na število posameznih CTC in skupkov, medtem ko smo izražanje specifičnih označevalcev CTC določili z imunofluorescenčnim barvanjem. Vzpostavitev mišjega modela za proučevanje CTC pri raku dojk nam bo omogočila nadaljnje translacijske raziskave CTC ter procesa zasevanja. Omogočilo nam bo tudi lažje pridobivanje CTC za vzpostavitev pogojev gojenja CTC v laboratoriju, kar bi omogočilo izvedbo funkcionalnih testov in transkriptomске analize posameznih celic, s čimer bi poglobili razumevanje CTC in procesa zasevanja ter dolgoročno prispevali k razvoju novih terapevtskih pristopov.

p34

RECOMBINANT CD30 NANOBODIES AS ROBUST AND COST-EFFECTIVE ALTERNATIVES TO CONVENTIONAL ANTIBODIES FOR DIAGNOSTICS OF HEMATOLOGIC MALIGNANCIES

Urša Štrancar¹, Ario de Marco¹, Tim Božič², Živa Pišljarič², Urša Lampreht Tratar^{2,3}, Maja Čemažar^{2,4}

¹ Laboratory for Environmental and Life sciences, University of Nova Gorica, Nova Gorica, Slovenia

² Department of Experimental Oncology, Oncology Institute Ljubljana, Ljubljana, Slovenia

³ Veterinary Faculty, University of Ljubljana, Ljubljana, Slovenia

⁴ University of Primorska, Faculty of Health Sciences, Izola, Slovenia

Elektronski naslov: ursa.strancar@ung.si

Human CD30 (TNFRSF8) is a transmembrane glycoprotein receptor of the tumor necrosis factor receptor superfamily, usually highly expressed on activated T and B lymphocytes. It serves as a positive regulator of apoptosis that limits the proliferative potential of autoreactive CD8 effector T cells, thereby protecting against autoimmunity. CD30 activation leads to diverse cellular responses including proliferation, survival, cytokine secretion, and cell death. CD30 serves as a selective biomarker in several cancers, including classical Hodgkin lymphoma, anaplastic large cell lymphoma (ALCL), embryonal carcinoma, diffuse large B-cell lymphoma (DLBCL) and T-cell lymphoma.¹ Detection of CD30 is based on the combination of conventional immunohistochemistry (IHC) and flow cytometry (FC). While IHC allows the detection of large and fragile Hodgkin and Reed-Sternberg cells, flow cytometry offers higher sensitivity and accuracy particularly for cells showing low CD30 expression levels. Therefore, the use of both methods is recommended for reliable assessment. Standardization of FC analysis has been successfully established for anaplastic large cell lymphomas, DLBCL and other rare lymphomas² using commercial IgG antibodies. Our data show that alternative detection reagents such as nanobodies may offer comparable specificity with respect to traditional antibodies but provide advantages in terms of stability and production costs. Nanobodies (VHHs) are small (~15 kDa), stable, single-domain antibody fragments derived from camelids characterized by low immunogenicity.³ VHHs achieve selective target recognition through their unique single variable domain. CD30-specific nanobody-derived CAR-T cells have been developed for treating lymphomas, showcasing as well the therapeutic potential of these agents.⁴ In our laboratory, nanobodies targeting CD30 have been isolated by panning a phage display naive library against the purified extracellular domain of CD30 used as the antigen. Their sequences were recovered and used for subcloning into expression vector and production in *E. coli* BL21 SOX. After purification, their binding characteristics and half maximal effective concentration were determined by ELISA on recombinant CD30 and by flow cytometry using human cell line expressing CD30. Our results demonstrate that the developed CD30-specific nanobodies are reliable reagents that allow obtaining results comparable to those recovered using conventional antibodies. However, their production in bacteria makes VHHs cheaper and their recombinant nature ensures excellent batch-to-batch consistency, reducing variability and enhancing reproducibility in both research and clinical settings. Additionally, they can be produced as Fc-fusions into IgG-like formats fully compatible with standardized protocols developed for commercial antibodies.

p35

Literatura

1. van der Weyden CA, et al. Understanding CD30 biology and therapeutic targeting: a historical perspective providing insight into future directions. Vol. 7, Blood Cancer J. Springer Nature; 2017.
2. Debliguis A, et al. Multicentric MFI30 study: Standardization of flow cytometry analysis of CD30 expression in non-Hodgkin lymphoma. Cytometry B Clin Cytom. 2021;100(4):488–96.
3. Alexander E, Leong KW. Discovery of nanobodies: a comprehensive review of their applications and potential over the past five years. Vol. 22, Journal of Nanobiotechnology . BioMed Central Ltd; 2024.
4. Xia B, et al. Nanobody-derived bispecific CAR-T cell therapy enhances the anti-tumor efficacy of T cell lymphoma treatment. Mol Ther Oncolytics. 2023;30:86–102.

ELEKTROKEMOTERAPIJA Z BLEOMICINOM, CISPLATINOM ALI OKSALIPLATINOM NA MIŠJIH TUMORSKIH MODELIH: OD ABLACIJE DO VAKCINACIJE *IN SITU*

Katja Uršič Valentinuzzi, Urška Kamenšek, Simona Kranjc Brezar, Chloe Heranney, Tilen Komel, Simon Buček, Maja Čemažar, Gregor Serša

Onkološki Inštitut Ljubljana, Ljubljana, Slovenija

Elektronski naslov: kursic@onko-i.si

Poleg neposrednih citotoksičnih učinkov lahko ablativne terapije, kot je elektrokemoterapija (EKT), sprožijo tudi posredne protitumorske učinke z aktivacijo imunskega sistema. V študiji smo celostno analizirali ta dvojni učinek intratumorske EKT z bleomicinom (BLM), oksaliplatinom (OXA) in cisplatinom (CDDP). Namen raziskave je bil ugotoviti, ali EKT deluje kot vakcinacija *in situ* in lahko sproži izventarčni učinek.

Na dveh mišjih tumorskih modelih, melanom B16-F10 in karcinom dojke 4T1, smo raziskali tako lokalne, kot sistemske (tj. izventarčne) protitumorske učinke primerljivo učinkovite intratumorske EKT z BLM, OXA in CDDP (dovoljenje U34401-3/2022/11). S histološkimi analizami ter uporabo imunske oslabiljenih in metastatskih mišjih modelov smo identificirali in primerjali tako citotoksične kot tudi imunske komponente protitumorske učinkovitosti EKT, kot so imunske prepoznavne celične smrti (imunogena celična smrt in nekroza) ter imunski infiltrat (CD11⁺, CD4⁺, CD8⁺, GrB⁺).

Razlike v imunskem odzivu po enako učinkoviti intratumorski EKT so se pokazale kot različna kinetika in obsega imunske prepoznavnih celičnih smrti in imunskega infiltrata v preučevanih tumorskih modelih. V tumorskem modelu 4T1 je bila vključenost imunskega sistema višja v primerjavi z modelom B16-F10. Razlike v imunske posredovanem protitumorskem odzivu smo opazili tudi glede na uporabljen citostatik pri EKT. Pokazali smo, da je EKT učinkovita pri indukciji vakcinacije *in situ* v obeh tumorskih modelih, vendar je bil izventarčni učinek opažen le pri modelu 4T1.

To je prva predklinična raziskava, ki sistematično primerja vključenost imunskega sistema po intratumorski EKT z uporabo treh različnih citostatikov v mišjih tumorskih modelih. Prikazana variabilnost imunskega odziva po EKT med različnimi tumorski modeli in citostatiki predstavlja osnovo za nadaljnje raziskave z namenom izboljšanja učinkovitosti kombiniranih terapij.

Zahvala

Raziskava je potekala v okviru raziskovalnega programa P3-0003 in podoktorskega projekta Z3-2651, ki ju financira Javna agencija za znanstvenoraziskovalno in inovacijsko dejavnost Republike Slovenije (ARIS).

VZPOSTAVITEV ELEKTROPRENOSA SISTEMA TRANS-POMNOŽUJOČIH mRNA NA MODELU MIŠJEGA MELANOMA B16-F10 *IN VITRO* IN *IN VIVO*

Jaka Vrevc Žlajpah^{1,2}, Urška Kamenšek^{1,3}, Urša Lampreht Tratar^{1,4}, Maja Čemažar^{1,5}, Gregor Serša^{1,6}, Katja Uršič Valentinuzzi^{1,3}

¹ Oddelek za eksperimentalno onkologijo, Onkološki inštitut Ljubljana, Ljubljana, Slovenija

² Medicinska fakulteta, Univerza v Ljubljani, Ljubljana, Slovenija

³ Biotehniška fakulteta, Univerza v Ljubljani, Ljubljana, Slovenija

⁴ Veterinarska fakulteta, Univerza v Ljubljani, Ljubljana Slovenija

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

⁶ Zdravstvena fakulteta, Univerza v Ljubljani, Ljubljana, Slovenija

Elektronski naslov: jvrevc@onko-i.si

Genska terapija je eden izmed obetavnih pristopov zdravljenja raka. Pri nevirusnih dostavnih sistemih se kot nosilec genske informacije najpogosteje uporabljata plazmidna DNA in molekule mRNA. Slednje odlikuje odsotnost insercijske mutageneze in visoka učinkovitost transfekcije, vendar jih omejuje intrinzična nestabilnost in razgrajevanje z ribonukleazami.

V naši raziskavi želimo vzpostaviti elektroprenos dvo-komponentnega, trans-pomnožujočega sistema mRNA (angl. trans-amplifying, taRNA) za lokalno dostavo in znotrajcelično pomnoževanje molekul mRNA z namenom podaljšanega izražanja transgena na modelu mišjega melanoma B16-F10.

Sistem taRNA sestavljata dve ločeni molekuli mRNA: prva zapisuje izbrani protein (transgen, trRNA), druga pa nosi zapis za alfavirusno replikazo (nrRNA-REPL)1. Slednja na osnovi prepoznavnih zaporedij za replikazo v neprevedenih regijah na 5'- in 3'-koncu trRNA po prevodu v proteinski kompleks na ribosomih omogoča selektivno pomnoževanje transgena.

Za namene raziskave smo načrtovali dva transgena z zapisom za zeleni fluorescentni protein (angl. green fluorescent protein, trRNA-EGFP) in za luciferazo (trRNA-LUC2). Za določanje učinkovitosti transfekcije po elektroprenosu sistema taRNA s trRNA-EGFP na celicah B16-F10 (*in vitro*) smo uporabili pretočno citometrijo. V poskusih *in vivo* (dovoljenje U34401-3/2022/17) smo učinkovitost transfekcije določili z merjenjem jakosti bioluminiscentnega signala po intratumorskem elektroprenosu taRNA s trRNA-LUC2 na miših C57/Bl6 s tumorji B16-F10 s slikovnim sistemom IVIS®. Tako *in vitro* kot *in vivo* smo primerjali učinkovitost transfekcije po elektroprenosu različnih koncentracijskih razmerij komponent sistema taRNA (od 20 ng do 20 µg) in po uporabi različnih protokolov elektroporacije (EP1: 8 pulzov v trajanju 100 µs s frekvenco 1 Hz, razmerje med napetostjo in razdaljo med elektrodama 1300 V/cm; EP2: 8 pulzov v trajanju 100 µs s frekvenco 5000 Hz, razmerje med napetostjo in razdaljo med elektrodama 1300 V/cm; EP3: 8 pulzov v trajanju 5 ms s frekvenco 1 Hz, razmerje med napetostjo in razdaljo med elektrodama 600 V/cm; EP4: 2 pulza v trajanju 20 ms s frekvenco 1 Hz, razmerje med napetostjo in razdaljo med elektrodama 120 V/cm).

Po elektroprenosu taRNA *in vitro* v različnih koncentracijskih razmerjih smo zaznali populacijo visoko GFP⁺ celic, ki ni bila prisotna po elektroprenosu trRNA-EGFP v odsotnosti nrRNA-REPL. Ta populacija je bila največja pri uporabi EP3. V poskusih *in vivo* smo potrdili, da je intratumorski elektroprenos učinkovit dostavni sistem za dostavo mRNA v širokem koncentracijskem območju. Prav tako smo potrdili uspešno intratumorsko trans-pomnoževanje mRNA, kjer smo izmerili 4-kratno povečanje intenzitete bioluminiscentnega signala ob sočasnem elektroprenosu trRNA-LUC2 in nrRNA-REPL v primerjavi z elektroprenosom samo trRNA-LUC2 v odsotnosti nrRNA-REPL. Pomnoževanje je bilo najbolj izrazito pri uporabi nizkih odmerkov trRNA-LUC2 (v ng), medtem

p37

ko je višanje odmerkov transgena vodilo v manj izrazito pomnoževanje. Ob uporabi 10 μg in 20 μg nrRNA-REPL smo izmerili primerljive intenzitete bioluminescentnega signala, kar bi lahko nakazovalo na zasičenje ob uporabi višjih odmerkov nrRNA-REPL. Jakost bioluminescentnega signala je bila odvisna tako od uporabljenega odmerka komponent taRNA kot tudi od protokola elektroporacije, med katerimi je bil najbolj učinkovit EP3.

S predstavljenim delom smo potrdili uspešno trans-pomnoževanje mRNA tako *in vitro* kot *in vivo*. Trenutne raziskave so usmerjene v nadaljnje izboljšanje izražanja transgena v sistemu taRNA za vzpostavitev nove platforme za gensko terapijo raka.

Zahvala

Raziskava je potekala v okviru raziskovalnega programa P3-0003 in projekta J3-50110, ki ju financira Javna agencija za znanstvenoraziskovalno in inovacijsko dejavnost Republike Slovenije (ARIS).

Literatura

1. Perkovic M, et al. A trans-amplifying RNA simplified to essential elements is highly replicative and robustly immunogenic in mice. *Mol Ther.* 2023 Jun. 31;6: 1636-1646 .

PD-L1 BLOCKADE WITH NANOBODY REDUCES SURVIVAL OF GLIOBLASTOMA MODELS IN 2D AND 3D

Alja Zottel^{1,2}, Neja Šamec¹, Gloria Krajnc^{2,3}, Larisa Goričan², Boris Gole², Uroš Potočnik^{2,4}, Ivana Jovčevska¹

¹ CFGB, Institute of Biochemistry and Molecular genetics, Faculty of Medicine, University of Ljubljana, Ljubljana, Slovenia

² Centre for Human Molecular Genetics and Pharmacogenomics, Faculty of Medicine, University of Maribor, Maribor, Slovenia

³ Department for Science and Research, University Medical Centre Maribor, Slovenia

⁴ Laboratory for Biochemistry, Molecular biology and Genomics, Faculty of Chemistry and Chemical Engineering, University of Maribor, Maribor, Slovenia

Elektronski naslov: alja.zottel@um.si

Glioblastoma is the most common and aggressive primary brain tumor, with most patients dying within two years of diagnosis. Despite standard treatments such as surgery, chemotherapy, and radiotherapy, survival rates have remained low for decades.

In our study, we investigated the therapeutic potential of an anti-PD-L1 nanobody (Nb202) in 3D glioblastoma spheroids. Nanobodies, derived from the antigen-binding domains of heavy-chain-only antibodies found in camelids, offer several advantages as therapeutic agents.

We compared the effects of Nb202 with atezolizumab, a clinically approved anti-PD-L1 antibody. Spheroids were generated from five primary glioblastoma cell lines (HROG02, HROG05, HROG06, HROG10, HROG17) and the U251 glioblastoma cell line using ultra-low attachment plates. They were cultured without extracellular matrix, in Matrigel, or in collagen I (40, 200, and 800 µg/mL). Nb202 reduced spheroid survival by 20% in HROG02, 40% in HROG05, and 44% in HROG06, whereas atezolizumab showed weaker effects (21%, 20%, and none, respectively). Neither antibody affected HROG10, HROG17, or U251 spheroids. In comparison, 50 mM temozolomide had no effect on most cell lines, except for a 27% reduction in HROG06. In 2D cultures, Nb202 significantly decreased survival in HROG02 (33%), HROG05 (29%), and HROG17 (32%), with no effect on HROG06, HROG10, or U251. Importantly, the presence of collagen I or Matrigel did not alter treatment responses, as survival trends were consistent with matrix-free conditions. Live-cell imaging with FITC-labeled Nb202 and atezolizumab confirmed extensive binding to the spheroid surface. Together, these results suggest that Nb202 holds promise as a therapeutic strategy for selected glioblastoma subtypes, demanding further preclinical evaluation to clarify its clinical potential.

p38

INDEKS AVTORJEV

INDEKS AVTORJEV

A

Amant Frédéric 86
Annibali Daniela 86
Avsec Eva 62

B

Bavec Aljosa 103
Bezeljak Urban 88
Bhakdi Sebastian C. 91
Birk Mojca 92
Blatnik Ana 62
Blatnik Olga 103
Blažič Anja 64
Bogožalec Košir Alexandra 29, 94
Božič Tim 65, 75, 105, 107
Breznik Barbara 29, 64, 94
Bric Nika 92
Brišar Nuša 68
Brumec Neja 77
Buček Simon 108

C

Cimerman Damjana 66
Cör Andrej 68

Č

Čamernik Katja 80
Čemažar Maja 65, 71, 73, 74, 75, 76, 79, 88, 96, 97, 100,
102, 106, 107, 108, 109

D

de Marco Ario 107
Divieto Carla 94
Dolenc Jure 18
Dolžan Vita 33
Duratović Konjević Amela 92

F

Foy Carole A. 94

G

Gazić Barbara 99
Germšek Tina 89
Gjorgoska Marija 70
Gole Boris 111
Gorenjak Mario 54
Goričan Larisa 111
Goričar Katja 18, 33
Gorišek Nuša 22
Grad Klara 71
Grašič Kuhar Cvetka 71, 72, 73, 90, 99, 106

H

Hartman Katrina 103
Hawlina Simon 81
Heranney Chloe 108
Hotujec Simona 62
Hribernik Nežka 100

I

Irenej Pečan Luka 22, 77
Ivanova Stefanija 29

J

Jazbec Janez 97
Jeran Marko 22, 77, 97
Jesenko Tanja 65, 71, 73, 76, 90, 96, 97, 106
Jovčevska Ivana 111
Jurdana Mihaela 74
Jurtela Maja 92

K

Kamenšek Urška 75, 79, 108, 109
Kloboves Prevodnik Veronika 89, 90, 91
Kloboves-Prevodnik Veronika 71, 73, 106
Knafelj Teja 89
Kobal Ema 92
Kokalj Marko 103
Komel Tilen 108
Konc Janez 80
Kozlica Katarina 100
Krajc Mateja 62, 82
Krajnc 111
Kranjc Brezar Simona 65, 68, 76, 106, 108
Krekić Farah Edisa 73
Kuhar Anamarija 89
Kunstelj Karin 77
Kupčič Saša 79

L

Lambert Paul 81
Lampreht Tratar Urša 76, 79, 88, 107, 109
Lanišnik Rižner Tea 47, 70, 86
Ledinek Živa 91
Legiša Matic 80
Lešnik Samo 80
Ležaič Luka 103
Lisec Barbara 65, 76
Lokar Katarina 92
Ložar Taja 81

M

Maček Stela 22
Madorran Eneko 37

INDEKS AVTORJEV

M

Majc Bernarda 64
Marinčič Maja 33
Marinko Luka 82
Marinko Tanja 18, 33
Markelc Boštjan 65, 84, 102, 105, 106
Marolt Nika 86
Martens John 87
Marušič Tjaša 88
Matos Erika 71
Medved Ajda 88
Miceska Simona 71, 73, 89, 90, 91, 106
Mihevc Ponikvar Barbara 92
Mihor Ana 92
Milačič Ščančar Radmila 100
Milavec Mojca 29, 94
Mitrović Goran 103

N

Novak Metka 29, 64, 94

O

Oblak Teja 92
Ocvirk Janja 42
Omerzel Maša 76, 96
Ovčariček Tanja 71

P

Pagon Andreja 42
Pelan Maša 97
Perić Barbara 82
Peterka Matjaž 88
Pijšlar Živa 90
Pirc Manca 33
Pirš Boštjan 47, 70
Pišljarič Živa 65, 71, 73, 107
Plavc Gaber 103
Plestenjak Špela 33
Podlesnikar Tomaž 18
Potočnik Uroš 54, 111
Potokar Urška Karolina 80
Prelog Tomaž 97
Privšek Nina 99
Pukl Miha 81
Pušić Novak Maja 47

R

Reberšek Martina 100
Rems Lea 64
Ribnikar Domen 71
Roškar Luka 47

S

Serša Gregor 76, 96, 102, 105, 108, 109
Shapiro Daniel 81
Smrkolj Špela 47, 70
Snoj Lara 102
Snoj Nataša 71
Sočan Aljaž 103
Stegel Vida 62, 99
Strojan Fležar Margareta 66
Strojan Primož 103

Š

Šamec Neja 111
Šantek Iva 65, 105
Šauer Sara 71
Ščančar Janez 100
Škerl Petra 99
Škof Erik 90
Škrinjar Dominik 54
Škrjanc Veronika 71, 73, 97, 106
Štemberger Nastja 88
Štrancar Urša 107
Šuster Katja 68
Švajger Urban 75, 103

T

Tanšek Anja 22, 77
Tavčar Gašper 97
Tesić Nataša 103
Tomšič Sonja 92

U

Uršič Valentinuzzi Katja 100, 108, 109

V

Vodopivec Tina 80
Vrevc Žlajpah Jaka 109

Z

Zadnik Vesna 92
Zorc Minja 22, 77
Zottel Alja 111

Ž

Žagar Tina 92
Živič Tina 96
Žlajpah Margareta 66

SPONZORJI

ZA BOLNICE S HR+ HER2- RAKOM DOJKE Z VELIKIM TVEGANJEM
ZA PONOVIŠE BOLEZNI PRI ZGODNJEM RAKU ALI ZA BOLNICE Z MRD

ONA POTREBUJE VSE
upanje tega sveta
IN ŠE VEČ

Verzenios
abemaciclib
A Lilly Medicine

**DAJTE JI
VEČ KOT UPANJE**

SKRAJŠAN POVZETEK GLAVNIH ZNAČILNOSTI ZDRAVILA

IME ZDRAVILA: Verzenios 50 mg/100 mg/150 mg filmsko obložene tablete **KAKOVOSTNA IN KOLIČINSKA SESTAVA:** Ena filmsko obložena tableta vsebuje 50 mg/100 mg/150 mg abemacicliba. Ena filmsko obložena tableta vsebuje 14 mg/28 mg/42 mg laktoze (v obliki monohidrata). **Terapevtske indikacije:** Zgodnji rak dojke: Zdravilo Verzenios je v kombinaciji z endokrinim zdravljenjem indicirano za adjuvantno zdravljenje odraslih bolnikov z na hormonske receptorje (HR) pozitivnim, na receptorje humanega epidermalnega rastnega faktorja 2 (HER2) negativnim zgodnjim rakom dojke s pozitivnimi bezgavkami, pri katerih obstaja veliko tveganje za ponovitve. Pri ženskah v pred- ali perimenopavzi je treba endokrinno zdravljenje z zaviralcem aromataze kombinirati z agonistom gonadolibarina LHRH - luteinizirajočim hormone-releasirajočim hormone). **Napredovali ali metastatski rak dojke:** Zdravilo Verzenios je indicirano za zdravljenje žensk z lokalno napredovalim ali metastatskim, na hormonske receptorje (HR) pozitivnim in na receptorje humanega epidermalnega rastnega faktorja 2 (HER2) negativnim rakom dojke v kombinaciji z zaviralcem aromataze ali s fulvestrantom kot začetnim endokrinim zdravljenjem ali pri ženskah, ki so prejele predhodno endokrinno zdravljenje. Pri ženskah v pred- ali perimenopavzi je treba endokrinno zdravljenje kombinirati z agonistom LHRH. **Odmernjevanje in način uporabe:** Zdravljenje z zdravilom Verzenios mora uvesti in nadzorovati zdravnik, ki ima izkušnje z uporabo zdravil za zdravljenje rakavih bolezni. Priporočeni odmerek abemacicliba je 150 mg dvakrat na dan, kadar se uporablja v kombinaciji z endokrinim zdravljenjem. **Zgodnji rak dojke:** Zdravilo Verzenios je treba jemati neprekinjeno dve leti, ali do ponovitve bolezni ali pojavnosti nesprejemljive toksičnosti. Če bolnica bruha ali izpusti odmerek zdravila Verzenios, ji je treba naročiti, da naj naslednji odmerek vzame ob predvidenem času; dodatnega odmerka ne sme vzeti. Obvladovanje nekaterih neželenih učinkov lahko zahteva prekinitev in/ali zmanjšanje odmerka. Zdravljenje z abemaciclibom prekinite v primeru povišanja vrednosti AST in/ali ALT > 3 x ZMN SKUPAJ s celokupnim bilirubinom > 2,0 x ZMN v odsotnosti holestaze ter pri bolnicah z intersticijsko pljučno boleznijo (ILD)/pnevmonitis stopnje 3 ali 4. Sočasni uporabi močnih zaviralcev CYP3A4 se je treba izogibati. Če se uporabi močnih zaviralcev CYP3A4 ni mogoče izogniti, je treba odmerek abemacicliba znižati na 100 mg dvakrat na dan. Pri bolnicah, pri katerih je bil odmerek abemacicliba 100 mg dvakrat na dan in pri katerih se sočasno dajajo močnega zaviralca CYP3A4 ni mogoče izogniti, je treba odmerek abemacicliba dodatno znižati na 50 mg dvakrat na dan. Pri bolnicah, pri katerih je bil odmerek znižan na 50 mg abemacicliba dvakrat na dan in pri katerih se sočasno dajajo močnega zaviralca CYP3A4 ni mogoče izogniti, je mogoče z odmerkom abemacicliba nadaljevati ob natančnem spremljanju znakov toksičnosti. Alternativno je mogoče odmerek abemacicliba znižati na 50 mg enkrat na dan ali prekiniti dajanje abemacicliba. Če je uporaba zaviralca CYP3A4 prekinjena, je treba odmerek abemacicliba povečati na odmerek, kakršen je bil pred uvedbo zaviralca CYP3A4 (po 3-5 razpolovnih časih zaviralca CYP3A4). Prilaganje odmerka glede na starost in pri bolnicah z blago ali zmerno ledvično okvaro ter z blago (Child Pugh A) ali zmerno (Child Pugh B) jetno okvaro ni potrebno. Pri dajanju abemacicliba bolnicam s hudo ledvično okvaro sta potrebna previdnost in skrbno spremljanje glede znakov toksičnosti. **Način uporabe:** Zdravilo Verzenios je namenjeno za peroralno uporabo. Odmerek se lahko vzame s hrano ali brez nje. Zdravila se ne sme jemati z grenkivo ali grenkivim sokom. Bolnice naj odmerke vzamejo vsak dan ob približno istem času. Tableto je treba pogoltniti celo (bolnice tablet pred zaužitjem ne smejo gristi, drobiti ali deliti). **Kontraindikacije:** Preobčutljivost na učinkovino ali katero koli pomožno snov. **Posebna opozorila in previdnostni ukrepi:** Pri bolnicah, ki so prejemale abemaciclib, so poročali o nevtropeniji, o večji pogostosti okužb kot pri bolnicah, zdravljenih s placebom in endokrinim zdravljenjem, o povečani vrednosti ALT in AST. Pri bolnicah, pri katerih se pojavi nevtropenija stopnje 3 ali 4, je priporočljivo prilagoditi odmerek. Do primerov nevtropenične sepse s smrtnim izidom je prišlo pri < 1 % bolnic z metastatskim rakom dojke. Bolnicam je treba naročiti, naj o vsaki epizodi povišane telesne temperature poročajo zdravstvenemu delavcu. Bolnice je treba spremljati za znake in simptome globoke venske tromboze (VTE) in pljučne embolije ter jih zdraviti, kot je medicinsko utemeljeno. Glede na stopnjo VTE bo morda treba spremeniti odmerek abemacicliba. Pri bolnicah, pri katerih se pojavi resni arterijski tromboembolični dogodek (ATE), je treba oceniti koristi in tveganja nadaljnjega zdravljenja z abemaciclibom. Glede na povečanje vrednosti ALT ali AST je mogoče potrebna prilagoditev odmerka. Driska je najpogostejši neželeni učinek. Bolnice je treba ob prvem znaku tekočega blata začeti zdraviti z antidiaroički, kot je loperamid, povečati vnos peroralnih tekočin in obvestiti zdravnika. Sočasni uporabi induktorjev CYP3A4 se je treba izogibati zaradi tveganja za zmanjšano učinkovitost abemacicliba. Bolnice z redkimi dednimi motnjami, kot so intoleranca za galaktozo, popolno pomanjkanje laktaze ali malapsorpcija glukoze/galaktoze, tega zdravila ne smejo jemati. Bolnice je treba spremljati glede pljučnih simptomov, ki kažejo na ILD/pnevmonitis, in jih ustrezno zdraviti. Glede na stopnjo ILD/pnevmonitisa je morda potrebno prilaganje odmerka abemacicliba. **Medsebojno delovanje z drugimi zdravili in druge oblike interakcij:** Abemaciclib se primarno presnavlja s CYP3A4. Sočasna uporaba abemacicliba in zaviralcev CYP3A4 lahko poveča plazemsko koncentracijo abemacicliba. Uporabi močnih zaviralcev CYP3A4 sočasno z abemaciclibom se je treba izogibati. Če je močne zaviralce CYP3A4 treba dajati sočasno, je treba odmerek abemacicliba zmanjšati, nato pa bolnico skrbno spremljati glede toksičnosti. Pri bolnicah, zdravljenih z zmerimi ali šibkimi zaviralci CYP3A4, ni potrebno prilaganje odmerka, vendar jih je treba skrbno spremljati za znake toksičnosti. Sočasni uporabi močnih induktorjev CYP3A4 (vključno, vendar ne omejeno na: karbamazepin, fenitoin, rifampicin in šentjanževko) se je treba izogibati zaradi tveganja za zmanjšano učinkovitost abemacicliba. Abemaciclib in njegovi glavni aktivni presnovki zavirajo prenašalce v ledvicah, in sicer kationski organski prenašalec 2 (OCT2) ter prenašalca MATE1. *In vivo* lahko pride do medsebojnega delovanja abemacicliba in klinično pomembnih substratov teh prenašalcev, kot je dofetilid ali kreatinin. Trenutno ni znano, ali lahko abemaciclib zmanjša učinkovitost sistemskih hormonskih kontraceptivov, zato se ženskam, ki uporabljajo sistemske hormonske kontraceptive, svetuje, da hkrati uporabljajo tudi mehansko metodo. **Neželeni učinki:** Najpogostejši neželeni učinki so driska, okužbe, nevtropenija, levkopenija, anemija, utrujenost, navzea, bruhanje in zmanjšanje apetita. **Zelo pogosti:** okužbe, nevtropenija, levkopenija, anemija, trombotična okvara, limfopenija, zmanjšanje apetita, glavobol, disgevizija, omotica, driska, bruhanje, navzea, stomatitis, alopecija, pruritus, izpuščaji, pireksija, utrujenost, povečana vrednost alanin-aminotransferaze, povečana vrednost aspartat-aminotransferaze. **Pogosti:** povečano solzenje, venska tromboembolija, ILD/pnevmonitis, dispneja, spremembe na nohtih, suha koža, mišična šibkost. **Občasni:** febrilna nevtropenija, fotopsija, keratitis. **Rok uporabnosti:** 3 leta. **Posebna navodila za shranjevanje:** Za shranjevanje zdravila niso potrebna posebna navodila. **Imetnik dovoljenja za promet z zdravilom:** Eli Lilly Nederland B.V., Papendorpseweg 83, 3528BJ, Utrecht, Nizozemska. Datum prve odobritve dovoljenja za promet: 27. september 2018. Datum zadnje revizije besedila: 17. 7. 2025. **Režim izdaje:** Rp/Spec - Predpisovanje in izdaja zdravila je le na recept zdravnika specialista ustreznega področja medicine ali od njega pooblaščenega zdravnika.

Reference: 1. Povzetek glavnih značilnosti zdravila Verzenios, zadnja odobrena verzija.

Pomembno: Predpisovanje in izdaja zdravila je le na recept zdravnika specialista ustreznega področja medicine ali od njega pooblaščenega zdravnika. Pred predpisovanjem zdravila Verzenios si preberite zadnji javljivi Povzetek glavnih značilnosti zdravil. Podrobne informacije o zdravilu so objavljene na spletni strani Evropske agencije za zdravila <http://www.ema.europa.eu>

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

PP-AL-SI-0353, 20.8.2025. Samo za strokovno javnost.

Lilly
A MEDICINE COMPANY



Radovednost
spodbuja
inovacije.

Doživljamo vedno nove preboje
v izboljševanju življenj ljudi.
Prinašamo življenjske spremembe.

To je tisto, kar nas žene.

www.roche.si



ERBITUX®
CETUXIMAB

**VEČ MOŽNOSTI
MOČ IZBIRE**

Erbitux® je edino anti-EGFR tarčno zdravilo, ki omogoča odmerjanje enkrat na teden ali enkrat na dva tedna ob različnih režimih KT¹⁻⁴

©2024 Merck KGaA, Darmstadt, Nemčija in/ali podružnice. Vse pravice pridržane.

Vir in literatura: 1. Erbitux® SmPC, December 2024; 2. Bokemeyer C, et al. Future Oncol 2023, Epub; 3. Kasi PM. Oncologist 2022;27:336-337-4. Vectibix® SmPC, July 2022.

MERCK

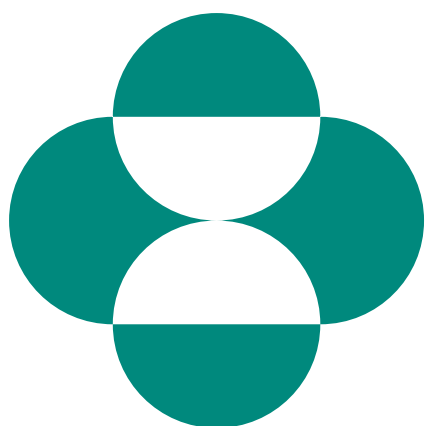
Erbitux 5 mg/ml raztopina za infundiranje

Skrajšan povzetek glavnih značilnosti zdravila

Sestava: En ml raztopine za infundiranje vsebuje 5 mg cetuksimaba in pomožne snovi. Cetuksimab je himerno monoklonsko IgG1 protiteleso. **Terapevtske indikacije:** Zdravilo Erbitux je indicirano za zdravljenje bolnikov z metastatskim kolorektalnim rakom z ekspresijo receptorjev EGFR in nemutiranim tipom RAS v kombinaciji s kemoterapijo na osnovi irinotekana, kot primarno zdravljenje v kombinaciji s FOLFOX in kot samostojno zdravilo pri bolnikih, pri katerih zdravljenje z oksaliplatinom in zdravljenje na osnovi irinotekana ni bilo uspešno in pri bolnikih, ki ne prenašajo irinotekana. Zdravilo Erbitux je indicirano za zdravljenje bolnikov z rakom skvamoznih celic glave in vratu v kombinaciji z radioterapijo za lokalno napredujočo bolezen in v kombinaciji s kemoterapijo na osnovi platine za ponavljajočo se in/ali metastatsko bolezen. **Odmerjanje in način uporabe:** Pred prvo infuzijo mora bolnik prejeti premedikacijo z antihistaminikom in kortikosteroidom najmanj 1 uro pred uporabo cetuksimaba. Zdravilo Erbitux se lahko daje v režimu odmerjanja enkrat na teden ali enkrat na dva tedna. Zdravilo Erbitux 5 mg/ml se daje z intravensko infuzijo, in sicer z infuzijsko črpalko, težnostno kapalno infuzijo ali črpalko za brizgo. Začetni odmerek je treba dati počasi, da se zmanjša tveganje za reakcije, povezane z infuzijo. **Kontraindikacije:** Zdravilo Erbitux je kontraindicirano pri bolnikih z znano hudo preobčutljivostno reakcijo (3. ali 4. stopnje) na cetuksimab. Kombinacija zdravila Erbitux s kemoterapijo, ki vsebuje oksaliplatin, je kontraindicirana pri bolnikih z metastatskim kolorektalnim rakom z mutiranim tipom RAS ali kadar status RAS ni znan. **Posebna opozorila in previdnostni ukrepi:** Pojav hude reakcije, povezane z infundiranjem, zahteva takojšnjo in stalno ukinitvev terapije s cetuksimabom. Če pri bolniku nastopi blaga ali zmerna reakcija, povezana z infundiranjem, lahko zmanjšate hitrost infundiranja. Priporočljivo je, da ostane hitrost infundiranja na nižji vrednosti tudi pri vseh naslednjih infuzijah. Poročali so o primerih intersticijske pljučne bolezni (IPB), med katerimi so bili tudi smrtni primeri. Take bolnike je treba skrbno spremljati. Če ugotovite intersticijsko bolezen pljuč, morate zdravljenje s cetuksimabom prekiniti, in bolnika ustrezno zdraviti. Če se pri bolniku pojavi kožna reakcija, ki je ne more prenašati, ali huda kožna reakcija (≥ 3. stopnje po kriterijih CTCAE), morate prekiniti terapijo s cetuksimabom. Z zdravljenjem smete nadaljevati le, če se je reakcija izboljšala do 2. stopnje. Zaradi možnosti pojava znižanja nivoja elektrolitov v serumu se pred in periodično med zdravljenjem s cetuksimabom priporoča določanje koncentracije elektrolitov v serumu. Pri bolnikih, ki prejemajo cetuksimab v kombinaciji s kemoterapijo na osnovi platine, obstaja večje tveganje za pojav hude nevtropenije. Takšne bolnike je potrebno skrbno nadzorovati. Pri predpisovanju cetuksimaba je treba upoštevati kardiovaskularno stanje in indeks zmogljivosti bolnika in sočasno dajanje kardiotskičnih učinkovin kot so fluoropirimidini. Če je diagnoza ulcerativnega keratitisa potrjena, je treba zdravljenje s cetuksimabom prekiniti ali ukiniti. Cetuksimab je treba uporabljati previdno pri bolnikih z anamnezo keratitisa, ulcerativnega keratitisa ali zelo suhih oči. Cetuksimaba ne uporabljajte za zdravljenje bolnikov s kolorektalnim rakom, če imajo tumorje z mutacijo RAS ali pri katerih je tumorski status RAS neznan. **Interakcije:** Pri kombinaciji s fluoropirimidini se je v primerjavi z uporabo fluoropirimidinov, kot monoterapije, povečala pogostnost srčne ishemije, vključno z miokardnim infarktom in kongestivno srčno odpovedjo ter pogostnost sindroma dlani in stopal. V kombinaciji s kemoterapijo na osnovi platine se lahko poveča pogostnost hude levkopenije ali hude nevtropenije. V kombinaciji s kapecitabinom in oksaliplatinom (XELOX) se lahko poveča pogostnost hude driske. **Neželeni učinki:** Zelo pogosti (≥ 1/10): hipomagneziemija, povečanje ravnih jetrnih encimov, kožne reakcije, blage ali zmerne reakcije povezane z infundiranjem, mukozitis, v nekaterih primerih resen. Pogosti (≥ 1/100 do < 1/10): dehidracija, hipokalcemija, anoreksija, glavobol, konjunktivitis, driska, navzeja, bruhanje, hude reakcije povezane z infundiranjem, utrujenost. **Posebna navodila za shranjevanje:** Shranjujte v hladilniku (2 °C - 8 °C). **Pakiranje:** 1 viala z 20 ml ali 100 ml raztopine. **Način in režim izdaje:** H-Predpisovanje in izdaja zdravila je le na recept, zdravilo pa se uporablja samo v bolnišnicah. **Imetnik dovoljenja za promet:** Merck Europe B.V., Amsterdam, Nizozemska. **Datum zadnje revizije besedila:** december 2024.

Pred predpisovanjem zdravila natančno preberite celoten Povzetek glavnih značilnosti zdravila. O domnevnem neželenem učinku lahko poročate neposredno nacionalnemu centru za farmakovigilanco, na način, kot je objavljeno na spletni strani www.jazmp.si ali na drug.safety.easterneurope@merckgroup.com. Samo za strokovno javnost.

Podrobnejše informacije so na voljo pri predstavniku imetnika dovoljenja za promet z zdravilom:
Merck d.o.o., Letališka cesta 29c, 1000 Ljubljana, tel.: 01 5603 800, faks: 01 5603 830, el. pošta: info@merck.si



MSD

Lilly



MERCK

AstraZeneca 

 ewo **pharma** 
since 1959



medilina

