

# 1. SLOVENSKI ZNANSTVENI SIMPOZIJ O RAZISKAVAH RAKA

*Rak trebušne slinavke*

***ZBORNİK PRISPEVKOV IN POVZETKOV***

11. oktober 2024

Onkološki inštitut Ljubljana



ONKOLOŠKI INŠTITUT  
INSTITUTE OF ONCOLOGY  
LJUBLJANA



Slovensko  
Zdravniško  
Društvo  
1861

Znanstveni odbor: Maja Čemažar, Onkološki inštitut Ljubljana & Univerza na Primorskem  
Mateja Krajc, 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  
Vesna Zadnik, Onkološki inštitut Ljubljana  
Simona Kranjc Brezar, Onkološki inštitut Ljubljana  
Sabina Lovšin, Onkološki inštitut Ljubljana

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

## **1. SLOVENSKI ZNANSTVENI SIMPOZIJ O RAZISKAVAH RAKA**

### *Rak trebušne slinavke*

### *ZBORNİK PRISPEVKOV IN POVZETKOV*

Urednice: Simona Kranjc Brezar, Maja Čemažar, Vesna Zadnik  
Recenzenti: Maja Čemažar, Gregor Serša  
Tehnična urednica: Simona Kranjc Brezar  
Oblikovanje: Simona Kranjc Brezar  
Izdano pri: Onkološki inštitut Ljubljana  
Združenje za radioterapijo in onkologijo pri Slovenskem zdravniškem društvu  
Tiskano pri: Fota-Cop d.o.o.  
Izdaja: 1. izdaja, 100 izvodov

CIP - Kataložni zapis o publikaciji  
Narodna in univerzitetna knjižnica, Ljubljana  
616.37-006(082)



SLOVENSKI ZNANSTVENI SIMPOZIJ O RAZISKAVAH RAKA  
(1 ; 2024 ; Ljubljana)

Rak trebušne slinavke : 1. slovenski znanstveni simpozij o raziskavah raka : zbornik prispevkov in povzetkov : 11. oktober 2024, Onkološki inštitut Ljubljana / organizatorja Onkološki inštitut Ljubljana in Združenje za radioterapijo in onkologijo pri Slovenskem zdravniškem društvu ; [urednice Simona Kranjc Brezar, Maja Čemažar, Vesna Zadnik]. - 1. izd. - Ljubljana : Onkološki inštitut : Združenje za radioterapijo in onkologijo pri Slovenskem zdravniškem društvu, 2024

ISBN 978-961-7029-86-4 (Onkološki inštitut)  
COBISS.SI-ID 210209539

# 1. SLOVENSKI ZNANSTVENI SIMPOZIJ O RAZISKAVAH RAKA

## *Rak trebušne slinavke*

11. oktober 2024

Onkološki inštitut Ljubljana

## *ZBORNIK PRISPEVKOV IN POVZETKOV*

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



ONKOLOŠKI INŠTITUT  
INSTITUTE OF ONCOLOGY  
LJUBLJANA



**Slovensko  
Zdravniško  
Društvo**  
1861

# SPONZORJI

---

AstraZeneca UK Limited, Podružnica v Sloveniji

---

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

---

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

---

Servier Pharma marketing in trgovina d.o.o.

---

Medison Pharma, podjetniško in poslovno svetovanje, d.o.o.

---

Ewopharma d.o.o.

---

Merck, d.o.o.

---

VWR International GmbH

---

# KAZALO VSEBINE

---

PROGRAM	5
SEZNAM PRISPEVKOV	9
SEZNAM POVZETKOV	11
PRISPEVKI	15
POVZETKI	41
INDEKS AVTORJEV	71
SPONZORJI	75



# PROGRAM

---

# PROGRAM

*Petek, 11. oktober 2024*

- 8:00 - 8:30 **Prijava udeležencev**
- 8:30 - 8:40 **Pozdravni nagovor**  
*Vesna Zadnik in Janja Ocvirk, Onkološki inštitut Ljubljana*
- 8:40 - 9:15 **Tropical Medicine: Trends in survival from pancreatic cancer**  
*Michel Coleman, London School of Hygiene*

## 1. del

*Moderator: Vesna Zadnik*

- 9:15 - 9:30 **Epidemiološki podatki o raku pankreasa**  
*Vesna Zadnik, Onkološki inštitut Ljubljana*
- 9:30 - 9:45 **Program presejanja in svetovanja nosilcem patogenih različic, ki ogrožajo za raka trebušne slinavke - primer nosilcev *CDKN2A***  
*Barbara Perić, Onkološki inštitut Ljubljana* Vabljen predavanje
- 9:45 - 10:00 **Regulatory Science Contribution to Patients Early Access to Oncology Medicinal Products & Medical Devices in the EU**  
*Irena Milobratović, Indaea OÜ*
- 10:00 - 10:15 **Krožne RNA in hepatocelularni karcinom**  
*Hana Trček, Univerza v Ljubljani, Medicinska fakulteta*
- 10:15 - 10:30 **Odmor**

## 2. del

*Moderator: Mateja Krajc*

- 10:30 - 10:45 **Rezultati genetskega testiranja pri bolnikih z adenokarcinomom pankreasa na Onkološkem inštitutu Ljubljana**  
*Ksenija Strojnik, Onkološki inštitut Ljubljana* Vabljen predavanje
- 10:45 - 11:00 **Genetske analize arhivskih vzorcev tkiva pokojnikov z namenom ugotavljanja dednih vzrokov raka**  
*Ana Blatnik, Onkološki inštitut Ljubljana* Vabljen predavanje

# PROGRAM

- 11:00 - 11:15** Silencing transcription factor E2F1 elicits potent antitumor effects in human colorectal carcinoma model: *in vitro* and *in vivo* insights  
*Simona Kranjc Brezar, Onkološki inštitut Ljubljana* Vabljeno predavanje
- 11:15 - 11:30** Katepsina B in X pri tumorskih matičnih celicah  
*Ana Mitrović, Institut Jožef Stefan*
- 11:30 - 12:15** Odmor

## 3. del

*Moderator: Erika Matos*

- 12:15 - 12:30** Učinkovitost kombiniranega zdravljenja kemoterapije in ablativne radioterapije (SBRT) v prvem redu zdravljenja lokalno napredovalega inoperabilnega raka trebušne slinavke - predstavitev protokola raziskave  
*Janja Ocvirk, Onkološki inštitut Ljubljana*
- 12:30 - 12:45** Določanje bakra in drugih elementov v sledovih v serumskih vzorcih bolnikov raki biliarnega trakta: Predstavitev klinične raziskave  
*Martina Reberšek, Onkološki inštitut Ljubljana* Vabljeno predavanje
- 12:45 - 13:00** Personalizirano zdravljenje adenokarcinoma trebušne slinavke  
*Tanja Mesti, Onkološki inštitut Ljubljana* Vabljeno predavanje
- 13:00 - 13:15** Vloga citopatologije pri diagnostiki raka trebušne slinavke  
*Margareta Žlajpah, Univerza v Ljubljani, Univerzitetni klinični center Ljubljana*
- 13:15 - 13:30** MAGEA3/6 Tumour Antigens Regulate Glycolytic Protein Hexokinase to Enhance Pancreatic Cancer Cell Survival Under Metabolic Stress  
*Vesna Jurjevič, Texas Tech University School of Veterinary Medicine*
- 13:30 - 13:45** Odmor

# PROGRAM

## 4. del

*Moderator: Barbara Perić*

- 13:45 - 14:00**    **Rezultati interkontinentalne študije ALL-IC REL 2016: izidi zdravljenja prve ponovitve akutne limfoblastne levkemije pri otrocih**  
*Marko Kavčič, Univerzitetni klinični center Ljubljana*
- 14:00 - 14:15**    **Imunospresija pri glioblastomu: vloga cistatina F in vpliv na celice NK**  
*Emanuela Senjor, Inštitut Jožef Stefan*
- 14:15 - 14:30**    **Metode določevanja cirkulirajočih tumorskih celic raka dojke na Onkološkem inštitutu Ljubljana**  
*Tanja Jesenko, Onkološki inštitut Ljubljana*
- 14:30 - 14:45**    **Vzpostavitev in karakterizacija mišjega tumorskega modela za raziskave s HPV povezanega raka glave in vratu**  
*Živa Pišljar, Onkološki inštitut Ljubljana*
- 14:45 - 15:00**    **SKUPAJ SMO V TEM! – Ozaveščanje o raku trebušne slinavke**  
*Ivka Glas, Združenje EuropaColon Slovenija*
- 15:00 - 15:10**    **Zaključek srečanja**  
*Tanja Marinko in Maja Čemažar, Onkološki inštitut Ljubljana*

# SEZNAM PRISPEVKOV

---

# SEZNAM PRISPEVKOV

1	<b>FoxP3<sup>+</sup> regulatory T-cell quantity in nodal T-follicular helper cell lymphomas and peripheral T-cell lymphomas, not otherwise specified and its correlation with overall survival</b> <i>Eva Erzar</i>	16
2	<b>Nodal T-follicular helper cell lymphomas and peripheral T-cell lymphomas, not otherwise specified in slovenian patients: mutational landscape, clinicopathological characteristics and outcomes</b> <i>Eva Erzar</i>	20
3	<b>Označevanje tumorjev s fluorescenčnimi barvili s ksantenskim tricikličnim strukturnim motivom in cianinskim fragmentom za raka trebušne slinavke</b> <i>Marko Jeran</i>	24
4	<b>Metode določevanja cirkulirajočih tumorskih celic raka dojke na Onkološkem inštitutu Ljubljana</b> <i>Tanja Jesenko</i>	29
5	<b>Katepsina B in X pri tumorskih matičnih celicah</b> <i>Ana Mitrović</i>	32
6	<b>Imunospresija pri glioblastomu: vloga cistatina F in vpliv na celice NK</b> <i>Emanuela Senjor</i>	37

# SEZNAM POVZETKOV

---

# SEZNAM POVZETKOV

- P1 **Vpliv resekcije adenokarcinoma trebušne slinavke na velikost zunajceličnih veziklov in raven miR-10b, miR-21 in miR-30c v plazmi bolnikov**  
*David Badovinac* 42
- P2 **Genetske analize arhivskih vzorcev tkiva pokojnikov z namenom ugotavljanja dednih vzrokov raka**  
*Ana Blatnik; vabljeno predavanje* 43
- P3 **Mapping sex steroid hormone signalling in fallopian tubes as sources of high-grade serous ovarian cancer precursors at single-cell resolution**  
*Marija Gjorgoska* 44
- P4 **SKUPAJ SMO V TEM! – Ozaveščanje o raku trebušne slinavke**  
*Ivka Glas* 45
- P5 **Vpliv disekcije trebušne slinavke s kavitacijskim ultrazvočnim sistemom za aspiracijo (CUSA) na pojavnost pooperativne pankreatične fistule (PANCUT): protokol za prospektivno randomizirano kontrolirano raziskavo**  
*Benjamin Hadžialjević* 46
- P6 **MAGEA3/6 tumour antigens regulate glycolytic protein hexokinase to enhance pancreatic cancer cell survival under metabolic stress**  
*Vesna Jurjevič* 47
- P7 **Rezultati interkontinentalne študije ALL-IC REL 2016: izidi zdravljenja prve ponovitve akutne limfoblastne levkemije pri otrocih**  
*Marko Kavčič* 48
- P8 **Ocena proliferacijskega indeksa Ki-67 v citoloških vzorcih nodalnih B-celičnih limfomov**  
*Veronika Kloboves Prevodnik* 50
- P9 **Protitumorsko delovanje utišanja transkripcijskega faktorja E2F1 na modelu humanega kolorektalnega karcinoma: *in vitro* in *in vivo* spoznanja**  
*Simona Kranjc Brezar; vabljeno predavanje* 51
- P10 **Analiza cirkulirajočih tumorskih celic v krvi bolnic z napredovalim rakom jajčnika visokega gradusa ob diagnozi**  
*Tanita Kranjc* 52
- P11 **Uporaba *in vitro* in *in vivo* modelov osteosarkoma za vrednotenje elektrokemoterapije**  
*Saša Kupčič* 53
- P12 **Validacija nanoteles za vezavo na specifične antigene mukoznega melanoma (MM)**  
*Urša Lampreht Tratar* 54

# SEZNAM POVZETKOV

P13	<b>Genski elektroprenos reporterske mRNA v B16F10 in CT26 celični liniji</b> <i>Ajda Medved</i>	55
P14	<b>Personalizirano zdravljenje adenokarcinoma trebušne slinavke</b> <i>Tanja Mesti; vabljeno predavanje</i>	56
P15	<b>Regulatory science contribution to patients early access to oncology medicinal products &amp; medical devices in the EU</b> <i>Irena Milobratović</i>	57
P16	<b>Učinkovitost kombiniranega zdravljenja kemoterapije in ablativne radioterapije (SBRT) v prvem redu zdravljenja lokalno napredovalega inoperabilnega raka trebušne slinavke - predstavitev protokola raziskave</b> <i>Janja Ocvirk</i>	58
P17	<b>Vzpostavitev in karakterizacija mišjega tumorskega modela za raziskave s HPV povezanega raka glave in vratu</b> <i>Živa Pišljarič</i>	60
P18	<b>Program presejanja in svetovanja nosilcem patogenih različic, ki ogrožajo za raka trebušne slinavke - primer nosilcev <i>CDKN2A</i></b> <i>Barbara Perić; vabljeno predavanje</i>	61
P19	<b>Določanje bakra in drugih elementov v sledovih v serumskih vzorcih bolnikov raki biliarnega trakta: Predstavitev klinične raziskave</b> <i>Martina Reberšek; vabljeno predavanje</i>	62
P20	<b>Rezultati genetskega testiranja pri bolnikih z adenokarcinomom pankreasa na Onkološkem inštitutu Ljubljana</b> <i>Ksenija Strojnik; vabljeno predavanje</i>	63
P21	<b>Vpliv radioterapije na aktivacijo tumorskih endotelijskih celic</b> <i>Iva Šantek</i>	64
P22	<b>Krožne RNA in hepatocelularni karcinom</b> <i>Hana Trček</i>	65
P23	<b>Epidemiologija raka trebušne slinavke</b> <i>Vesna Zadnik</i>	67
P24	<b>Vloga citopatologije pri diagnostiki raka trebušne slinavke</b> <i>Margareta Žlajpah</i>	68
P25	<b>Molekula DEBIO 1143 kot potencialna molekula za povečanje učinkovitosti elektrokemoterapije pri zdravljenju rakov glave in vratu</b> <i>Katarina Žnidar</i>	69



# PRISPEVKI

---

# ELL QUANTITY IN NODAL T-FOLLICULAR HELPER CELL LYMPHOMAS AND PERIPHERAL T-CELL LYMPHOMAS, NOT OTHERWISE SPECIFIED AND ITS CORRELATION WITH OVERALL SURVIVAL

Eva Erzar<sup>1,2</sup>, Alexandar Tzankov<sup>3</sup>, Janja Ocvirk<sup>1,2</sup>, Biljana Grčar Kuzmanov<sup>4</sup>, Lučka Boltežar<sup>1,2</sup>, Veronika Kloboves Prevodnik<sup>5,6</sup>, Gorana Gašljević<sup>4,5</sup>

<sup>1</sup> Division of Medical Oncology, Institute of Oncology Ljubljana, Ljubljana, Slovenia

<sup>2</sup> Faculty of Medicine, University of Ljubljana, Ljubljana, Slovenia

<sup>3</sup> Pathology, Institute of Medical Genetics and Pathology, University Hospital Basel, University of Basel, Switzerland

<sup>4</sup> Department of Pathology, Institute of Oncology Ljubljana, Ljubljana, Slovenia

<sup>5</sup> Faculty of Medicine, University of Maribor, Ljubljana, Slovenia

<sup>6</sup> Department of Cytopathology, Institute of Oncology Ljubljana, Ljubljana, Slovenia

## Abstract

**Background:** The tumor microenvironment (TME) plays an important role in lymphomas, varying in composition and the quantity of specific tumor-infiltrating immune cells (TICs) like FoxP3<sup>+</sup> regulatory T-cells (Tregs). The role of FoxP3<sup>+</sup> Tregs in T-cell lymphomas (TCL) is complex, and the correlation of FoxP3<sup>+</sup> Tregs' quantity and overall survival (OS) remains unclear. Therefore, we aimed to evaluate and compare the quantity of FoxP3<sup>+</sup> cells in nodal TCLs and reactive lymph nodes (LN), with a focus on investigating their correlation with OS.

**Patients and Methods:** Excisional LN biopsies (whole-tissue samples) from 105 lymphoma patients diagnosed with nodal T-follicular helper cell lymphoma (nTFHL), peripheral T-cell lymphoma, not otherwise specified (PTCL-NOS) and composite lymphoma (CL; co-occurrence of nTFHL and diffuse large B-cell lymphoma (DLBCL) or marginal zone lymphoma (MZL)), along with 17 reactive LN biopsies were immunohistochemically stained for FoxP3. Visual scoring was performed by counting FoxP3<sup>+</sup> cells under 400x magnification. Different cut-off values (125, 200, 255, and 400 FoxP3<sup>+</sup> cells/mm<sup>2</sup>) from previous publications and our model were used to categorize patients into high or low quantity groups, and their correlation with OS was calculated. Clinical data were collected from patients' records, and the analyses were conducted retrospectively.

**Results:** All cases contained FoxP3<sup>+</sup> cells in the TME, with a median of 255 (range 4–2037) FoxP3<sup>+</sup> cells/mm<sup>2</sup> except for 4 PTCL-NOS cases where FoxP3 was expressed in malignant cells. The quantity of FoxP3<sup>+</sup> cells did not significantly differ across the analysed subtypes, except between nTFHL, not otherwise specified (nTFHL-NOS) and CL subtypes. However, their quantity was significantly decreased in nTFHL, follicular type (nTFHL-F) (median of 173 FoxP3<sup>+</sup> cells/mm<sup>2</sup>), nTFHL, angioimmunoblastic type (nTFHL-AI) pattern 3 (median of 200 FoxP3<sup>+</sup> cells/mm<sup>2</sup>) and CL (median of 168.5 FoxP3<sup>+</sup> cells/mm<sup>2</sup>), compared to reactive LNs (median of 431 FoxP3<sup>+</sup> cells/mm<sup>2</sup>). Univariate analysis revealed a statistically significant difference in OS between groups with high and low FoxP3<sup>+</sup> cell quantity with three applied cut-off values. However, the Cox proportional hazards model demonstrated that the FoxP3<sup>+</sup> cell quantity is not statistically significantly associated (p=0.35) with the risk of death.

**Conclusions:** Our findings revealed that nodal TCL patients with high FoxP3<sup>+</sup> cell quantity had improved OS. However, we did not confirm the Treg value as an independent prognostic marker. Multicentre studies with larger patient cohorts are needed to fully evaluate their prognostic value in these lymphoma subtypes. These results underscore the potential of FoxP3<sup>+</sup> cell quantity as an added value in prognosis and highlight the potential use of Treg-stimulating therapies in TCLs.

Tumor microenvironment (TME) plays an important role in the development and progression of cancer, particularly in lymphoma (1). Tumor-infiltrating immune cells (TICs) are a promising resource for the development of new prognostic markers as they are easily detectable. One of these

are regulatory T-cells (Tregs) that express the transcription factor FoxP3 (forkhead box P3) (1, 2). They play an important role in regulating immune responses to self- and nonself-antigens via local immune suppression and may impair the antitumor response by reducing the activity and functions of T-cells and natural killer (NK) cells. Their prognostic value has attracted a substantial interest in the recent decades (2-7). In most solid malignancies there are contradictory data about association of high quantity of FoxP3<sup>+</sup> Tregs with decreased or increased survival, depending of the carcinoma type as well as in the different types of lymphoma (2-5). Nevertheless, in specific lymphoma subtypes, increased FoxP3<sup>+</sup> Tregs have been associated with conflicting survival outcomes (2-4). The presence of FoxP3<sup>+</sup> Tregs within the TME of nodal T cell lymphomas (nTCL) remains unexplored.

The aim of our study was to evaluate and compare the quantity and the prognostic value of FoxP3<sup>+</sup> cells in TME among 101 patients diagnosed with nodal T cell follicular helper lymphoma angioimmunoblastic type (nTFHL-AI (patterns 1,2,3)), nodal T cell follicular helper lymphoma, follicular type (nTFHL-F), nodal T cell follicular helper lymphoma not otherwise specified (nTFHL-NOS), peripheral T cell lymphoma not otherwise specified (PTCL-NOS) and composite lymphomas (CL) which were defined as nTFHL-AI with diffuse large B cell lymphoma (DLBCL) or marginal zone lymphoma (MZL), as well as those with reactive LN.

Study was performed on routinely collected histological samples. A total of 101 LN biopsies (whole-tissue samples) obtained from patients diagnosed with nTFHL-AI (n=72), nTFHL-F (n=3), nTFHL-NOS (n=13), PTCL-NOS (n=5), CL, i.e., co-occurrence of nTFHL-AI and DLBCL or MZL (n=8) and 17 reactive LN biopsies were retrieved from the archives of the Institute of Oncology Ljubljana (IOL). All patients were diagnosed between 2007-2022 and underwent treatment at the IOL in accordance with the valid clinical guidelines applicable at the time of diagnosis. Clinical data were obtained at the time of diagnosis or during patients' follow-up and were retrieved retrospectively from their medical records. Automated IHC slide staining for FoxP3 (clone EP340, Epitomics) was performed on 3-4  $\mu\text{m}$  thick whole sections on BenchMark Ultra (Roche Diagnostics, Tucson, Arizon) using the OptiView DAB IHC Detection Kit (Roche, Catal. No. 760-700). Two experienced pathologists (BGK, GG) independently evaluated the IHC staining. They performed visual scoring under 400x magnification, blinded to all clinical data, by counting FoxP3<sup>+</sup> cells in the hot-spot area with a higher quantity of FoxP3<sup>+</sup> cells. Cells with moderate or strong staining were included in the count, and the result was reported as the number of FoxP3<sup>+</sup> cells per square millimetre (FoxP3<sup>+</sup> cells/mm<sup>2</sup>).

To determine if there were statistical differences in FoxP3<sup>+</sup> cell quantity between the included nodal TCL subtypes and reactive LN, multiple comparisons were performed using Kruskal-Wallis nonparametric test, and pairwise comparisons were performed using Mann-Whitney U test. OS was defined as the time interval from the date of pathological diagnosis until the date of death from any cause. The vital status of the patients was retrieved from the Cancer Registry of the Republic of Slovenia on April 15, 2024. The median survival of the patients was expressed in months. Kaplan-Meier method with log-rank test was used to generate survival curves and to evaluate OS for patient groups with high or low FoxP3<sup>+</sup> cell quantity. We used two different cut-off values from previous studies (2,3) (125 and 200 FoxP3<sup>+</sup> cells/mm<sup>2</sup>) that investigated the impact of FoxP3<sup>+</sup> cells in different TCLs on survival and a median count of our cohort (FoxP3<sup>+</sup> cells/mm<sup>2</sup>) to categorize patients into high or low FoxP3<sup>+</sup> cell quantity groups. We also attempted to determine an appropriate cut-off value with testing the non-linear effect of data. Confirmation of the non-linear effect would establish that the value at the break of the graph is indeed the appropriate cut-off value. A potentially appropriate value that was suggested from the model (although non-linear effect was insignificant for our data) was also tested. For a variable of interest (Treg value), we built a Cox proportional hazards model using the diagnosis, IPI score (as an ordered variable) and the chosen variable (Treg value as a continuous variable) as independent variables, with OS as the dependent variable. We tested a non-linear association between the Treg value and OS using a 1 restricted cubic spline with 3 nodes. After showing that the non-linear effect was not statistically significant, we updated model to only

include the Treg value as a linear predictor to have a simpler model (the result of the model with the linear predictor remained similar). The proportional hazards assumption was tested using Schoenfeld residuals. Statistically significant result was defined as  $p \leq 0.05$ . The statistical analyses were conducted using IBM SPSS (v28.0.1.0), GraphPad Prism 9 and R (v4.2.2) with RStudio (v2023.06.0+241) using the packages survival (v3.5-7), rms (v6.6-0), ggplot2 (v3.4.2), blandr (v0.5.1), knitr (v1.42), kableExtra (v1.3.4), and their dependencies.

The analysed patient cohort comprised fifty-six (55%) males and forty-five (45%) females; median age at diagnosis was 69 (range 26–87) years. Most patients ( $n=93$ ; 92%) presented at advanced stages (Ann Arbor stage III-IV) at diagnosis. Two thirds presented with B-symptoms ( $n=69$ ; 68%) and a bit more had good Eastern Cooperative Oncology Group (ECOG) performance status (0–1) ( $n=70$ ; 70%) at diagnosis. Thirteen percent of patients were in the International Prognostic Index (IPI) low-risk group, 22% in low-intermediate, 39% in high-intermediate, and 25% in high-risk. Elevated serum lactate dehydrogenase (LDH) was detected in 53 patients (53%).

Approximately half of the patients ( $n=58$ ; 57%) received first-line treatment with chemotherapy, including cyclophosphamide, vincristine, prednisone (COP) or modified COP, or other low-dose treatments. Nineteen (19%) patients received chemotherapy with cyclophosphamide, doxorubicin, vincristine and prednisone (CHOP) or CHOP-like treatment as first-line treatment. Eighteen patients (18%) received other treatments (radiotherapy, corticosteroids etc.) and the remaining 6 patients did not receive any treatment at all ( $n=6$ ; 6%). Autologous stem cell transplantation was only undergone by 8 patients as consolidation treatment after the initial therapy.

FoxP3<sup>+</sup> cells were detected in the TME of all analysed samples ( $n=101$ ) in varying numbers, with a median of 255 (range 4–2037) FoxP3<sup>+</sup> cells/mm<sup>2</sup>. The staining consistently exhibited nuclear localization with high or moderate intensity.

The overall FoxP3<sup>+</sup> cell quantity was significantly lower ( $p=0.01$ ) in the nTCL cohort (median 255, range 4–2037 FoxP3<sup>+</sup> cells/mm<sup>2</sup>) compared to the reactive LN cohort (median 431, range 199–791 FoxP3<sup>+</sup> cells/mm<sup>2</sup>). The FoxP3<sup>+</sup> cell quantity did not vary across different nTCL subtypes, except between nTFHL-NOS and CL (Kruskal-Wallis Test:  $p=0.02$ ; Mann-Whitney U Test:  $p<0.05$ ). However, FoxP3<sup>+</sup> cell quantity showed a significant decrease in nTFHL-F (median 173, range 79–177), nTFHL-AI (median 279, range 4–2037), and CL (median 168.5, range 117–403), compared to reactive LN (median 431, range 199–791 FoxP3<sup>+</sup> cells/mm<sup>2</sup>). When we subclassified nTFHL-AI into three patterns (pattern 1, 2 and 3), we observed differences compared to reactive LN. The FoxP3<sup>+</sup> cell quantity was statistically significantly reduced only in pattern 3 compared to reactive LN ( $p<0.01$ ), while pattern 2 nearly reached statistical significance ( $p=0.06$ ). Conversely, nTFHL-AI pattern 1 had a median FoxP3<sup>+</sup> cell quantity of 509 (range 23–1337) FoxP3<sup>+</sup> cells/mm<sup>2</sup>, which did not differ from reactive LN but was significantly higher ( $p<0.05$ ) compared to CL. When comparing patterns, there was an almost statistically significant difference between pattern 1 and 3 ( $p=0.05$ ).

At the end of follow-up period 76 out of 101 patients died (74.3%), 64 due to lymphoma. The mean OS of analysed nTCL cohort was 37.4 months, the median 24.9 months (range 0.3 – 156.4 months). The 1-year, 2-year and 5-year OS rates were 67.3%, 50.5% and 23.8%. When comparing patients with low and high FoxP3<sup>+</sup> cell quantity, determined using different cut-offs (125, 200, 255, or 400 FoxP3<sup>+</sup> cells/mm<sup>2</sup>), we observed a significant difference in OS between the two groups of patients with the first three cut-offs (log-rank test;  $p<0.001$ ,  $p=0.001$ ,  $p=0.004$ , and  $p=0.066$ ). Cox proportional hazards model showed no association between Treg value and risk for death ( $p=0.35$ ). A decreasing risk is indicated as the Treg value falls towards 400, and then a constant risk at Treg values from 400 onwards. The graph suggests that a value of 400 could be an appropriate cut-off value when confirming the non-linear effect of the data, a confirmation we did not obtain ( $p=0.44$ ). In the multivariate Cox proportional hazards model, only IPI was confirmed as an independent predictor for the risk of death ( $p<0.001$ ). The other included variables (diagnosis and Treg value) were not statistically significantly

associated with the risk of death ( $p=0.92$  and  $p=0.35$ ).

In this study, we assessed FoxP3<sup>+</sup> cell quantity in TME across 101 nTCL and in 17 reactive LN and analysed the impact of FoxP3<sup>+</sup> cell quantity on OS. A statistically lower FoxP3<sup>+</sup> cell quantity in the nTCL cohort compared to the reactive LN cohort was observed. Importantly, we are the first to demonstrate a statistically significant difference in overall survival (OS) among nTCLs based on FoxP3<sup>+</sup> cell quantity using various cut-off values obtained from previous publications (3,7). However, the Cox proportional hazards model did not indicate a significant correlation between FoxP3<sup>+</sup> cells (Treg value) and the risk of death.

Despite the potential of TICs as prognostic and predictive markers, there is a challenge in setting their cut-off values. The cut-off value serves as the basis for dividing patients into two groups (high *vs.* low quantity) and for evaluating their impact on OS. Differently chosen cut-off values can impact the final outcomes of different research groups and their subsequent comparison. Currently, cut-off values for the number of FoxP3<sup>+</sup> cells are not standardized across published articles that study FoxP3<sup>+</sup> cells and their impact on OS (2-7), and results are reported using different units, including percentages (%), cells per high-power field (cells/HPF), and cells per square millimetre (cells/mm<sup>2</sup>). To enable meaningful cross-study comparisons, it's vital for the scientific community to establish standardized cut-off values and units for TICs.

When comparing patients with low and high FoxP3<sup>+</sup> cell quantity, determined using different cut-offs (125, 200, 255 or 400 FoxP3<sup>+</sup> cells/mm<sup>2</sup>), we observed a significant difference in OS between the two groups in three instances, except when using the cut-off value of 400 FoxP3<sup>+</sup> cell/mm<sup>2</sup>.

This study revealed a decrease in FoxP3<sup>+</sup> cell quantity in nTFHL-F, advance phase of nTFHL-AI (pattern 3) and CL subtypes compared to reactive LN. This marks the first demonstration of such a difference between nTFHL-AI patterns. We illustrated the distinction in OS between groups with low and high FoxP3<sup>+</sup> quantity by applying various cut-off values. However, multivariate analysis did not confirm the correlation of Treg value with the risk of death. For future validation of our study's findings, prospective studies with larger sample size, consistent therapy protocols, uniform detection antibodies, and standardized criteria for determining cut-off values are essential. This rigorous approach is crucial to confirm the prognostic value of FoxP3<sup>+</sup> cells in the TME of nodal TCLs.

In conclusion, our findings suggest potential refinements in prognostic accuracy and indicate that Treg-suppressing drugs, such as cyclosporine, should not be used in nTFHL patients. Instead, the possibility of treating nTFHL with combined therapies, including immunomodulatory drugs that enhance Treg frequency and function, offers a promising strategy. Future efforts should focus on these combined approaches to effectively modulate the TME and improve patient outcomes.

## References

1. Menter T et al, Pathobiology 2019.
2. Kim et al, Annals of Oncology 2009.
3. Lundberg et al, Upsala J Med Sci 2019.
4. Liu et al, J Clin Pathol 2023.
5. Gjerdrum et al, Leukemia 2007.
6. Peng et al, Int J Biol Sci 2011.
7. Tzankov et al, Haematologica 2009.

# NODAL T-FOLLICULAR HELPER CELL LYMPHOMAS AND PERIPHERAL T-CELL LYMPHOMAS, NOT OTHERWISE SPECIFIED IN SLOVENIAN PATIENTS: MUTATIONAL LANDSCAPE, CLINICOPATHOLOGICAL CHARACTERISTICS AND OUTCOMES

Eva Erzar<sup>1,2</sup>, Vanesa Sindi-Ivanova<sup>3</sup>, Stefan Dirnhofner<sup>3</sup>, Lučka Boltežar<sup>2,4</sup>, Janja Ocvirk<sup>2,4</sup>, Veronika Kloboves Prevodnik<sup>5,6</sup>, Alexandar Tzankov<sup>3</sup>, Gorana Gašljević<sup>5,6</sup>

<sup>1</sup> Department of Cytopathology, Institute of Oncology Ljubljana, Ljubljana, Slovenia

<sup>2</sup> Faculty of Medicine, University of Ljubljana, Ljubljana, Slovenia

<sup>3</sup> Pathology, Institute of Medical Genetics and Pathology, University Hospital Basel, University of Basel, Switzerland

<sup>4</sup> Department of Medical Oncology, Institute of Oncology Ljubljana, Ljubljana, Slovenia

<sup>5</sup> Faculty of Medicine, University of Maribor, Maribor, Slovenia

<sup>6</sup> Department of Pathology, Institute of Oncology Ljubljana, Ljubljana, Slovenia

## Abstract

**Background:** Nodal T-follicular helper cell lymphomas (nTFHLs) are the most frequent mature nodal peripheral T-cell lymphomas (nPTCL). Understanding of mutational landscape and its correlation with survival outcomes remains limited. We aimed to better depict nPTCLs' features within a Slovenian cohort.

**Methods:** 108 patients diagnosed with nPTCL were studied; high-throughput sequencing with a lymphoma panel of 172 genes was performed. Survival analyses with clinical and mutational characteristics and correlation analyses were done

**Results:** Out of 108 patients (50 females, 58 males), 91 had nTFHL, 9 PTCL, not otherwise specified (PTCL-NOS) and 8 composite lymphomas [CLs; co-occurrence of nTFHL, angioimmunoblastic type (nTFHL-AI) and monoclonal B-cell proliferations]. The median follow-up time was 23 months (range 0-156). Most patients received COP/modified COP treatment. Mutations of *TET2* was present in 43%, *RHOA* in 26%, *IDH2* in 9%, *PLCG1* in 8%, *DNMT3A* in 6%, and *VPS13B* in 4% of the cases, in nTFHL only. Correlation analysis revealed an association between mutations in *RHOA* and the presence of mutations in *TET2*, *IDH2*, and *DNMT3A*. No statistically significant association was found between the main clinical characteristics and *TET2* or *RHOA* mutations. Patients with high International prognostic index (IPI), progressive disease after the first-line treatment, without autologous stem cell transplantation (ASCT) as consolidation therapy and  $\geq 2$  mutations had shorter overall survival (OS), all being independent adverse risk factors.

**Conclusion:** A variety of recurrent mutations were observed in our nPTCL cohort; simultaneous presence of  $\geq 2$  mutations portend a higher risk of death. Our results emphasize the importance of ASCT as consolidation therapy and need for prospective clinical trials for tailored therapeutic interventions like application of hypomethylating agents in *DNMT3A* and/or *TET2* mutated instances or IDH-inhibitors in *IDH2* mutated ones to improve patient outcomes.

Nodal peripheral T-cell lymphomas (nPTCLs) are rare and heterogeneous diseases with poor prognosis (1). Understanding of their pathogenesis have improved due to the recent advancements in mutational profiling research (1,2). Similar mutations can occur across different nPTCL subtypes but their distribution vary (2-4). Nodal T-follicular helper cell lymphomas (nTFHL), frequently exhibit mutations in epigenetic regulators (*TET2*, *DNMT3A*, *IDH2*) as well as mutations that lead to T-cell activation, such as *RHOA* (2-4). These mutations are present in other PTCL subtypes but at lower frequencies. Other less frequent mutations, present in several PTCLs, occur in co-stimulatory or TCR signalling genes such as *CD28*, *PLCG1*, *CARD11*, and *CTNNB1* (2-4).

Mutations in epigenetic regulators in nTFHLs have significant clinical implications as well. Respectively mutated lymphomas respond better to histone deacetylase (HDAC) and DNA

methyltransferase inhibitors in comparison to non-mutated one. Some of the gene mutations or the presence of co-mutations affect survival outcomes in PTCLs. However, the prognostic impact of these mutations remains largely unexplored. In PTCL-NOS, alterations in *TP53*, *PRDM1*, *PTEN*, *CDKN2A/B*, *STAT3*, and *MYC* are linked to the more aggressive PTCL-GATA3 subtype (5). In contrast, PTCL-TBX21, which harbours mutations in *TET1*, *TET3*, and *DNMT3A*, has a better prognosis (5).

There is limited information on the incidence, prognostic markers, mutational landscape, and survival outcomes of nTFHLs and PTCL-NOS in South-Eastern Europe. Our study aims to characterize molecular and clinical aspects in Slovenian patients diagnosed with nTFHL and PTCL-NOS.

Hundred-eight Slovenian patients diagnosed with nTFHL, PTCL-NOS, and composite lymphomas (CL, i.e. co-occurrence of nTFHL-AI and B-cell lymphoma) and who underwent treatment at the Institute of Oncology Ljubljana (IOL), Slovenia between 2007 and 2022 were included in the study. Clinical and laboratory data were obtained from the patients' electronic medical records in the hospital information system.

DNA was isolated from 10µm thick sliced untreated FFPE tissue samples by using the Invitrogen™ RecoverAll™ Multi-Sample RNA/DNA Workflow (#A26069 Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA). Only cases with a tumor cell content (TCC) >15% were deemed eligible for next-generation sequencing (NGS). NGS was performed using IonAmpliSeq™ customized, validated and ISO15189 accredited lymphoma panel comprising 4716 amplicons (size range: 125 – 175) of 172 genes (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA).

Descriptive statistics summarized the clinical data. Statistical analyses were conducted using SPSS software (version 28.0.1.0, IBM, Armonk, NY, USA) and RStudio. The R package “BioManager (maftools)” was used to create an oncoplot with a mutational hierarchy. Pearson Chi-square or Fisher's exact test were used for the correlation analyses of categorical variables, the Kaplan-Meier method (with log-rank test) to generate survival curves and to evaluate differences in overall survival (OS). OS was defined as the time from pathological diagnosis to death from any cause or end of follow-up. The Cox proportional hazards model was applied to assess the independent impact of potential prognostic factors on survival outcomes. Variables with  $p \leq 0.10$  in the univariate analyses were included in the multivariate analysis. We excluded potential confounding factors that were already part of other variables, such as ECOG PS and LDH, which are components of the IPI score. Differences with  $p < 0.05$  were considered statistically significant. Patient vital status was retrieved from the Cancer Registry of t Study cohort was comprised of 58 males (54%) and 50 females (46%), with a median age of 69 years and a range of 26–87 years. Elevated serum LDH levels were detected in 69 patients (64%), and 68 patients (72%) presented with B-symptoms. Three-quarters of patients ( $n=75$ ; 69%) had good ECOG PS (0–1) at diagnosis. Most patients ( $n=100$ ; 93%) were diagnosed at advanced stages (Ann Arbor stage III-IV), and 63% were in the IPI high-intermediate or high-risk group. Median patient survival was expressed in months.

Eight patients underwent autologous stem cell transplantation (ASCT) as consolidation therapy after initial treatment. No significant difference ( $p=0.522$ ) in OS was observed between patients receiving different first-line treatments. However, a significant difference ( $p<0.001$ ) was detected when comparing patients with different response rates to first-line treatment. Patients with ASCT consolidation therapy experienced prolonged OS compared to those who did not ( $p=0.006$ ). The multivariate Cox proportional hazards model revealed that ASCT as consolidation therapy was a favourable prognostic factor. In contrast, disease progression after first-line treatment was an adverse independent prognostic factor. Patients with progressive disease (PD) after first-line treatment had a 9.878 (95% CI 4.018-24.289,  $p<0.001$ ) times higher risk of death compared to patients with a complete response (CR) (Table 3). There was also a trend toward worse prognosis in patients with PR compared to those with CR (HR 2.024, 95% CI 0.935-4.425,  $p=0.079$ ).

Ninety-nine samples were sequenced, however, 9 were excluded due to DNA fragmentation. Among

the 90 patients with interpretable results, 22 had no detected clinically significant mutations, 24 had 1 mutation, and 53 had  $\geq 2$  mutations in different genes. Mutations in the *TET2* gene were the most common ( $n=43$ , 43%), followed by *RHOA* ( $n=26$ , 26%), with the *RHOA*G17V variant representing 88.5% of these mutations ( $n=23/26$ ). *IDH2* was mutated in 9%, *PLCG1* in 8%, *DNMT3A* in 6%, and *VPS13B* in 4% of patient samples. All these mutations were found exclusively in nTFHLs. Otherwise, heterogeneous mutations were present. Among them, only the *IDH2* mutation was subtype-specific, occurring solely in nTFHL-AI patients (12.3%).

We confirmed mutations in *TET2* and *RHOA* in nTFHL-AI in higher percentages (50% and 34%, respectively) than in other nTFHL subtypes (24% and 18%), while *PLCG1* (9% vs. 12%) and *DNMT3A* (4% vs. 18%) in lower percentages. In CL the percentage of *TET2* (63%) mutations was higher, with no detected mutations in *RHOA* and *DNMT3A*, whereas in *PTCL-NOS* ( $n=6$ ), mutations in any of these genes were not detected.

2 There was a significant association between the presence of mutations in *RHOA* and *IDH2* ( $\chi^2=27.796$ ,  $p < 0.001$ ), *TET2* ( $\chi^2=6.915$ ,  $p=0.009$ ), and *DNMT3A* ( $\chi^2=10.742$ ,  $p=0.004$ ). In 9 patient samples, *RHOA* mutations co-occurred with *IDH2*, in 17 with *TET2*, and in 5 samples with *DNMT3A*. All detected *IDH2* mutations ( $n=9$ ) were the *IDH2*R172X variant. In all 9 cases, *IDH2*R172X co-occurred with *RHOA*G17V mutations, and in 7 (78%) cases with *TET2* mutations. Altogether we identified 169 different mutations in all analysed genes included in the panel. Most of them were missense mutations (48%), followed by nonsense mutations (28%) and frameshift-INDELs (22%). The remaining 2% were non-frameshift deletions or splice site mutations. All mutations in the *RHOA*, *IDH2*, *DNMT3A*, and *PLCG1* genes were missense mutations. In contrast, *TET2* mutations included various types: nonsense (43%), frameshift-INDELs (39%), missense (15%), and others (3%).

At the end of the follow-up period, 81 out of 108 patients died (75%), 69 due to lymphoma. The median follow-up time was 23 months (range 0–156 months). Univariate analysis showed a statistically significant association between IPI risk groups, response rate to the first treatment and ASCT and OS. In contrast, no significant association between individual most frequent mutations of our cohort (*TET2*, *RHOA* and *IDH2*) and the OS was observed. Patients with *TET2/RHOA* or *TET2/IDH2* co-mutations showed no difference ( $p=0.739$  and  $p=0.811$ , respectively) in OS compared to those with *TET2* mutations alone. We conducted additional analysis to examine how the number of mutations affects OS, revealing a significant difference ( $p=0.01$ ) in OS across groups with cumulatively  $\geq 2$  mutations of different genes. Multivariate analysis revealed that a high IPI score (4 and 5) ( $p=0.002$ ), presence of 1 mutation ( $p=0.042$ ), but especially presence of  $\geq 2$  mutations ( $p=0.006$ ) were identified as independent adverse risk factors. Patients in the high-risk IPI group had a 5.319-fold higher risk of death (95% CI 1.823-15.521) compared to those in the low-risk group. Additionally, patients with 1 mutation or  $\geq 2$  mutations also faced a higher risk of death (HR 2.869, 95% CI 1.041-7.906 or HR 3.334, 95% CI 1.417-7.848) compared to those without mutations.

This study investigated the mutational landscape of nPTCL in a Slovenian cohort, providing additional data on mutations previously reported (2-5), and emphasis on the prognostic value of frequently mutated genes in these patients. Our results align with those of previous studies confirming a similar mutation profile for nTFHL-AI and other nodal lymphomas of TFH-cell origin. Differences in OS among patients were observed based on the number of mutations, response rates to first-line treatment, ASCT consolidation, LDH levels, and stratification into different ECOG PS or IPI risk groups. For the first time, we reported that nPTCL patients with particularly  $\geq 2$  mutations in different genes have a higher risk of death compared to those without mutations. This finding establishes the number of mutations as an independent adverse prognostic factor alongside a high IPI score, progressive disease after first-line treatment, or the absence of ASCT as consolidation treatment.

We observed frequent mutations in *TET2* (43%), *RHOA* (26%), *IDH2* (9%), *PLCG1* (8%), *DNMT3A* (6%), and *VPS13B* (4%) (Figure 2), being present in nTFHL only, and discovered that

*TET2* gene was in 42 % affected by more than one mutation, consistent with numerous publications. Correlation analysis showed a significant association between mutations of the *RHOA* gene with mutations in *IDH2* ( $p < 0.001$ ), *DNMT3A* ( $p = 0.004$ ), and *TET2* ( $p = 0.009$ ), as demonstrated in previous publications. We confirmed that *TET2*, *RHOA*, and *DNMT3A* mutations are more frequent in nTFHL-AI (50%, 34%, and 4%) compared to other nTFHL subtypes (24%, 18%, and 18%). In contrast, the proportion of *TET2* mutations is higher in CL (63%), while no mutations in these genes were detected in the six cases of PTCL-NOS.

The observed mutational profile in Slovenian patients appears to align closely with those reported in patient cohorts from Western Europe and Asia (2-6). This similarity suggests universal genetic nTFHL lymphomagenesis gate-keeping mechanisms that are rather tumor-specific than population specific.

The adverse impact of *TET2*, *RHOA*, and *DNMT3A* mutations on survival outcome in nTFHL has been documented in several studies (2-4). These studies observed shorter progression-free survival (PFS) in patients carrying mutations in these genes, but no effect of individual mutations on OS. Consistent with these findings, our study did not find any significant association between the most frequently observed individual mutations (*TET2*, *RHOA*, and *IDH2*) and OS.

Consistent with previous reports (2-4) a relatively high percentage of nTFHL patients in our study also presented without mutations ( $n=22/99$ ; 22.2%). This led us to investigate whether the accumulation of mutations affects OS. We found a significant difference in OS between groups of nPTCL patients with varying numbers of mutations (Figure 4). Multivariate analysis confirmed that patients with one mutation had a marginally significant 2.869-fold higher risk of death (95% CI 1.041-7.906,  $p=0.042$ ), while those with two or more mutations had a strongly significant 3.334-fold higher risk of death (95% CI 1.417-7.848,  $p=0.006$ ) compared to patients without mutations. Thus, our study promotes the number of mutations as an independent adverse prognostic factor for OS in nPTCL, and especially nTFHL. To our knowledge, no other studies have noted this association.

The present study for the first time suggests that the accumulation of mutations in nPTCL negatively impacts OS, with the number of mutations serving as an independent prognostic factor alongside the IPI, response to first-line treatment, and ASCT consolidation therapy. The mutational landscape in Slovenian patients' mirrors those observed in previous studies, with frequent mutations in *TET2*, *RHOA*, *IDH2*, *DNMT3A*, and *PLCG1* genes, and notable co-occurrence among some of them. Additionally, our results highlight the importance of genetic profiling in routine diagnostics, prognostication, and possibly for tailored treatment strategies in nPTCL.

## References

1. WHO classification of the tumors of hematopoietic and lymphoid tissue 5th Ed, 2022.
2. Feldman et al; Virch Arch 2023.
3. Chen HZ et al; Curr Med Sci 2022.
4. García-Sancho AM et al; Br J Hemat 2023.
5. Amador C et al; Blood 2019.
6. Fukumoto K et al; Cancer Sci. 2018.

# OZNAČEVANJE TUMORJEV S FLUORESCENČNIMI BARVILI S KSANTENSKIM TRICIKLIČNIM STRUKTURNIM MOTIVOM IN CIANINSKIM FRAGMENTOM ZA RAKA TREBUŠNE SLINAVKE

Luka Irenej Pečan <sup>1,2</sup>, Tine Tesovnik <sup>3,4</sup>, Julija Vodenik <sup>2</sup>, Gašper Tavčar <sup>5</sup>, Julian R Silverman <sup>6</sup>, Miroslav Petrovec <sup>7</sup>, Marko Jeran <sup>5</sup>

<sup>1</sup> Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Oddelek za zootehniko, Katedra za agrarno ekonomiko, politiko in pravo, Domžale, Slovenija

<sup>2</sup> University of Trieste, Department of Life Sciences, Trieste, Italy

<sup>3</sup> Univerzitetni klinični Center Ljubljana, Pediatrična klinika, Klinični inštitut za specialno medicinsko diagnostiko, Ljubljana, Slovenija

<sup>4</sup> Univerza v Ljubljani, Medicinska fakulteta, Katedra za pediatrijo, Ljubljana, Slovenija

<sup>5</sup> Institut "Jožef Stefan", Odsek za anorgansko kemijo in tehnologijo, Ljubljana, Slovenija

<sup>6</sup> Fashion Institute of Technology, Department of Science and Math, New York, USA

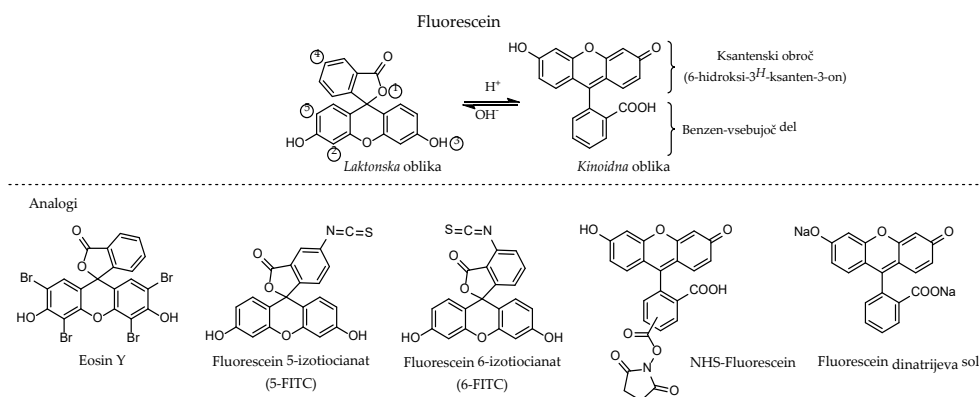
<sup>7</sup> Univerza v Ljubljani, Medicinska fakulteta, Inštitut za mikrobiologijo in imunologijo, Ljubljana, Slovenija

## Izvleček

Zaradi edinstvenih zmožnosti vizualizacije, analiz kompleksnih bioloških sistemov in vsestranskosti, so fluorescenčna barvila postala pomembna orodja na različnih znanstvenih in medicinskih področjih. V prispevku osvetljujemo njihovo vsestranskost in aplikativnost, posebno na področju raziskav različnih rakavih obolenj. V zadnjem delu se posvečamo tudi uporabi fluorescenčnih označevalcev pri raku trebušne slinavke.

## Uvod

Fluorescenčna barvila, so zaradi zagotavljanja edinstvenih zmožnosti za vizualizacijo in analizo kompleksnih bioloških sistemov, postala nepogrešljivo orodje različnih znanstvenih in medicinskih področij. Fluorescenčne molekule, vključno s fluoresceinom, absorbirajo svetlobo pri krajši valovni dolžini in oddajajo svetlobo pri višji valovni dolžini. Med takšna barvila, ki jih odražajo visoka intenziteta emisije fluorescenčne svetlobe in visoka aplikativnost, uvrščamo fluorescein in njegove derivate (Slika 1) (1).



Slika 1: Fluorescein in njegovi analogi.

Fluorescein je trden organski fluorofor, rumeno-oranžne barve, ki izpostavljen svetlobi absorbira svetlobo pri 460 nm ter oddaja zeleno-modro emisijo fluorescence pri 515 nm (2). Zaradi njegove izjemne intenzivnosti fluorescence, ga lahko zaznamo celo pri razredčitvi 1:50.000.000 (3). V primerjavi z natrijevo soljo, je sam fluorescein tako v vodi kot v organskih topilih slabo topna učinkovina. Vodne raztopine fluoresceina so zaradi procesa razgradnje občutljive na dolgotrajno izpostavljenost svetlobi (4). Uporablja se kot označevalec v medicinskih in bioloških aplikacijah, zlasti kot sonda za lokalizacijo

tumorskih tkiv (5). V nadaljevanju opisujemo nekaj primerov le-teh.

### Možganski tumorji

Natrijeva sol fluoresceina se že dolgo uporablja pri diagnosticiranju tumorjev v možganih (6). Tumorji v možganih izvirajo iz nenormalne rasti celic v možganih ali bližnjih strukturah, kot so živci, hipofiza, epifiza in možganske membrane. Primarni tumorji izvirajo iz možganov, sekundarni tumorji pa so metastaze iz drugih delov telesa (7). Pred kraniotomijo, kjer se del kosti odstrani za dostop do možganov, bolniki prejmejo injekcijo natrijeve soli fluoresceina (6). Med posegom se možganska skorja pregleda pod UV svetlobo; površinski tumorji se obarvajo rumeno-zeleno, kar olajša njihovo prepoznavanje in določanje meje (6). Za globlje tumorje se uporabljajo biopsijski materiali, ki jih testirajo na pojav fluorescence, ki prikaže prisotnost ali odsotnost bolezensko spremenjenega tkiva (6). Benigni in počasi rastoči tumorji morda ne fluorescirajo, zaznamo pa lahko tudi bolezenske spremembe, ki motijo krvno-možgansko pregrado, kot so edem, kapsule abscesov in poškodovana tkiva (6,8). Metastatski tumorji običajno kažejo svetlo fluorescenco, tudi v primeru nekroze (6).

### Rak želodca

Rak želodca izhaja iz celic notranje plasti želodca, pri čemer je najpogostejši tip adenokarcinom, ki se razvije v celicah, ki proizvajajo sluz (9). Bhunchet je s sodelavci (10) preučil novo metodo za odkrivanje raka želodca z uporabo fluoresceinske elektronske endoskopije, namenjene odkrivanju raka v zgodnji fazi. Študija je zajemala 16 bolnikov z zgodnjim rakom želodca (diagnosticiranim z belo svetlobo endoskopije in kromoskopijo), ki so pred operacijo prejeli intravensko injekcijo natrijeve soli fluoresceina in nato opravili fluoresceinsko elektronsko endoskopijo. Opravljena je bila tudi temeljita histopatološka analiza odstranjenih vzorcev. Približno 10 sekund po injiciranju fluorescenčnega označevalca so opazili fluorescenco, ki se je hitro širila po notranji površini želodca. Rak želodca v zgodnji fazi, z večjim številom stromalnih celic, je pokazal izrazitejšo fluorescenco v primerjavi z rakom z manj stromalnimi celicami, ki je odražal šibkejšo fluorescenco. Močnejša fluorescenca je bila prisotna tudi pri nediferenciranih rakih z razširjeno stromo zaradi malignih invazij. Meje rakov v zgodnji fazi so bile jasno opazne, nekatere spremljajoče bolezenske spremembe, ki so bile pri rutinski endoskopiji spregledane, so bile zaznane med operacijo (10).

### Rak ustne votline

Rak ustne votline zajema rake, ki nastajajo v različnih delih ust, in se uvrščajo med rake glave in vratu. Zdravljenje raka ustne votline je pogosto podobno kot pri drugih rakih te skupine. Rak ustne votline se običajno začne v ploščatih celicah, imenovanih skvamozne celice, ki oblagajo notranjost ust in ustnic (11). V študiji Qaiserja s sodelavci (12) je sodelovalo 100 oseb, vključno z 42 z oralnimi potencialno malignimi spremembami (OPMD), 40 z oralnim skvamoznim celičnim karcinomom (OSCC) in 18 kontrolnih posameznikov z vnetnimi stanji, kot sta perikoronitis in benigni fibrozni polipi. Študija je prva dokumentirala vlogo fluoresceina pri odkrivanju raka ustne votline in OPMD. Bolniki so najprej opravili vizualni pregled ust z belo in nato še pregled z modro svetlobo v temni sobi za avtofluorescenco. Lezije, ki so kazale avtofluorescenco, so bile izključene. Nato je bil na bolezensko spremembo in okolico topikalno nanesena natrijeva sol fluoresceina, usta so bila sprana, sprememba pa pregledana glede fluorescenco. Raziskovalci so ugotovili, da fluorescein omogoča hitro in občutljivo prepoznavanje potencialno malignih motenj (OPMD) in oralnega skvamoznega celičnega karcinoma (OSCC), saj lahko razlikuje med zdravo ustno sluznico in displazijo/malignimi spremembami ustne votline (12).

### Rak sečnega mehurja

Rak sečnega mehurja je deseti najpogostejši rak na svetu, pogostejši pri moških kot ženskah (13). Pravilno presejanje in zgodnje zdravljenje lahko upočasni napredovanje bolezni ter izboljšata terapevtski izid (13). Zgodnje odkrivanje raka mehurja je ključno, kar je mogoče doseči s fluorescenčnimi metodami, ki vključujejo endogeno in eksogeno fluorescenco. Endogena fluorescenca ali avtofluorescenca temelji na svetlobi, ki jo oddajajo tkivni fluorofori, kot sta NADH in kolagen. Pri raku sečnega mehurja

pride do sprememb v avtofluorescenci zaradi večje absorpcije krvi, povečane debeline epitelijskih celic in zmanjšane vzbujenosti kolagena in NADH. Natančnejša diagnoza nadalje zajema obravnavo dveh ključnih valovnih dolžin (14). Vplivi debeline epitela in absorpcije krvi, lahko tako privedejo do nezanesljivosti pri avtofluorescenci (14). Eksogena fluorescenca vključuje vnos fluoroforjev v mehur in njihovo vzbujanje z vidno svetlobo (14). Fotodinamična terapija (PDT) temelji na uporabi fotosenzibilizatorjev, ki se kopičijo v tumorju in ob aktivaciji s svetlobo povzročijo njegovo nekrozo, pri čemer je deformacija zdravega tkiva minimalna. Uporaba hematoporfirinov za fluorescenčno vodenje diagnostike raka mehurja sega v leto 1976 (15). Koncept fotodinamične diagnostike (PDD) izkorišča fluorokrome, ki ob absorpciji svetlobe oddajajo fluorescenco, kar omogoča natančno lokacijo tumorskega tkiva. V rakavih celicah, 5-aminolevulinska kislina (ALA) sproži kopičenje fluorescenčnega protoporfirina IX (PPIX), kar ustvari kontrast med rdeče fluorescenčnimi malignimi lezijami in nefluorescenčno normalno sluznico (16).

## 3

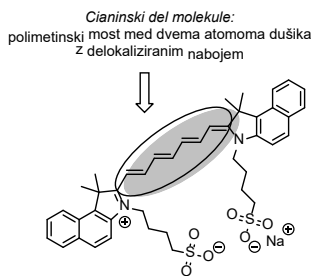
### Metastaze raka dojke v možgane

Natrijeva sol fluoresceina je bila uporabljena tudi pri operacijah metastaz raka dojke v možganih (17). Rak dojke je najpogostejša vrsta raka in glavni vzrok smrti zaradi raka pri ženskah (18). Prekomerna izpostavljenost estrogenom lahko prispeva k poškodbam DNA in genetskim spremembam, kar spodbuja napredovanje raka dojke (18). Mutacije v genih *BRCA1* in *BRCA2*, ki naj bi delovali kot genski supresorji, lahko povzročijo razvoj raka dojk in jajčnikov (19). Razsoj tumorja je odgovoren za 90 % smrti in je glavni vzrok smrti pri raku dojke (18). Rak dojke se najpogosteje širi v možgane, aksilarne bezgavke, kosti, pljuča in jetra. Rakave celice dojke lahko prodrejo v možgane preko krvožilnega sistema, kjer se razmnožijo, kar vodi do metastaz v možganih (18). Študija Xiao s sodelavci (17), izvedena med majem 2012 in junijem 2016, je zajela 38 bolnic z razsojem raka dojke v možgane. Cilj študije je zajemal primerajvo kirurškega posega ob uporabi fluoresceina, glede na standardno nevrokirurško metodo. Izsledki so pokazali, da je z natrijevo soljo fluoresceina (5 mg/kg, intravensko: po alergijskem testu in splošno anestezijo) voden poseg izboljšal vidnost tumorja in imel boljši vpliv na stanje bolnic v primerjavi s standardno mikrooperacijo. Poleg omenjenega je bilo skupno preživetje po zdravljenju metastaz v možganih nekoliko višje pri bolnikih, ki so prejeli fluorescenčni marker, kar kaže na varnost in izvedljivost postopka za odstranjevanje metastaz raka dojke v možganih (17).

### Rak trebušne slinavke

Fluorescenčna barvila so postala ključno orodje pri odkrivanju, slikovni diagnostiki in zdravljenju raka trebušne slinavke, saj pomenijo pomemben napredek tako v predkliničnih kot kliničnih okoljih. Rak trebušne slinavke ostaja ena najbolj smrtonosnih oblik raka zaradi pozne diagnoze in zapletenosti, povezanih s kirurškim zdravljenjem. V zadnjih letih se je uporaba fluorescenčnih barvil v bližnjem infrardečem spektru (NIRF) izkazala za obetavno pri izboljšanju natančnosti kirurškega odstranjevanja tumorjev in izboljšanju izidov za bolnike (20). Pomemben napredek zajema razvoj konjugatov hialuronske kisline, ki so natančno prirejeni za ciljno dostavo v celice raka trebušne slinavke. Kot so pokazali Qi in sodelavci (20), so ti konjugati zasnovani za izboljšanje intraoperativnega slikanja z zagotavljanjem izboljšanega kontrasta, kar omogoča kirurgom natančnejšo vizualizacijo mej tumorja med odstranitvijo. Ta natančna slikovna zmogljivost je ključna, kjer so čiste kirurške meje bistvenega pomena za zmanjšanje stopnje ponovitve bolezni in izboljšanje dolgoročnega preživetja.

Fluorescenčno barvilo indocianin zeleno (ICG) (Slika 2), ki ga je odobrila Ameriška uprava za hrano in zdravila (FDA), je bilo med drugim uporabljeno za izboljšanje kontrasta pri odkrivanju raka trebušne slinavke. Li in sodelavci (21) so raziskali uporabo slikovne diagnostike s fluorescenco z ICG v prvem in drugem bližnjem infrardečem oknu, kar znatno izboljša prikaz tumorjev v tkivu trebušne slinavke. Natančna sposobnost razlikovanja med malignimi in zdravimi celicami tako pripomore pri zgodnjem odkrivanju raka trebušne slinavke, povečuje tudi natančnost odstranjevanja tumorja, kar lahko vodi do boljših kirurških izidov.



*Slika 2: Indocianin zeleno (ICG) je heptametin cianinska spojina z več dolgimi konjugiranimi metinskimi verigami. V središču obeh dušikovih heterocikličnih motivov, ki ima lipofilne lastnosti, velik molarni absorpcijski koeficient, visok kvantni izkoristek fluorescence, hiter metabolizem v telesu in redke stranske učinke (22).*

Na področju zgodnjega odkrivanja so Kalubowilage in sodelavci (23) razvili ultraobčutljive fluorescenčne nanobiosenzorje, ki lahko preko tekočinskih biopsij prepoznajo raka trebušne slinavke v najzgodnejših fazah. Ti nanobiosenzorji izkoriščajo občutljivost fluorescenčnega odkrivanja za zajem in analizo biomarkerjev, povezanih z rakom trebušne slinavke, kar omogoča neinvazivno in zelo natančno diagnostično orodje. Zgodnje odkrivanje je še posebej pomembno pri raku trebušne slinavke, kjer se simptomi pogosto pojavijo šele, ko je bolezen že napredovala, in so učinkovite možnosti zdravljenja omejene. Velik napredek je bil dosežen pri razvoju konjugatov fluorescenčnih protiteles, ki ciljajo na specifične biomarkerje celic raka trebušne slinavke. Olson in sodelavci (24) so se osredotočili na preučevanje konjugata z bližnjo infrardečo fluorescenco, ki cilja na MUC16. Slednji je pokazal močno ojačanje fluorescence v rakavih celicah. Konjugat med operacijo omogoča boljšo vizualizacijo tumorjev, kar olajša njihovo popolnejšo odstranitev in zmanjšuje verjetnost preostalih rakavih celic, ki bi lahko povzročile ponovitev bolezni.

Prehod od predkliničnih raziskav h klinični uporabi je prikazan v študiji, ki so jo izvedli Lu in sodelavci (25), kjer so v kliničnem preizkušanju (faza 1) testirali konjugat panitumumab-IRDye800CW. Slednje je zaznamovalo pomemben korak k tumorsko specifičnemu kirurškemu vodenju s fluorescenco pri obravnavi raka trebušne slinavke. Konjugat cilja na receptor za epidermalni rastni faktor (EGFR), ki je prekomerno izražen v mnogih primerih raka trebušne slinavke. Nadaljnje bližnje infrardeče barvilo pa zagotavlja visoko kontrastno slikanje med operacijo. Študija je pokazala izvedljivost in varnost uporabe omenjenega konjugata za intraoperativno slikanje med kirurškim posegom, kar lahko izboljša natančnost odstranjevanja tumorjev in izide za bolnike. Drugi inovativen pristop vključuje razvoj konjugatov fluorescenčnih protiteles z zdravili (ADC) za molekularno slikanje in ciljno zdravljenje. Knutson in sodelavci (26) so razvili fluorescentni ADC, ki se specifično veže na celice raka trebušne slinavke, ki izražajo karcinoembrionski antigen (CEA). Dvojno funkcionalno sredstvo omogoča tako vizualizacijo tumorjev kot tudi dostavo citotoksičnih zdravil neposredno v rakave celice, s čimer se poveča terapevtska učinkovitost in zmanjša poškodba zdravih tkiv. Hoogstins in sodelavci (27) so pri fluorescenčno vodenem kirurškem posegu raziskovali uporabo novega karcinoembrionskega antigena SGM-101, ki cilja na fluorescenčno barvilo v bližnjem infrardečem spektru. Izsledki so pokazali potencial uporabljenega barvila za izboljšanje intraoperativnega prepoznavanja tumorjev trebušne slinavke, s čimer omogoča natančnejšo odstranitev tumorjev in izboljšanje stopnje preživetja bolnikov. Za utišanje genov pri raku trebušne slinavke je bila raziskana tudi uporaba polimernih nanodelcev z vezanim barvilom za emisijo, povzročeno z agregacijo (AIE). Hu in sodelavci (28) so razvili nanovektorje, ki so uspešno transfecirali siRNA v celice raka trebušne slinavke, kar je bilo potrjeno tudi s fluorescenčnim slikanjem. Pristop poudarja potencial kombiniranja fluorescenčnih barvil z gensko terapijo za ciljno zdravljenje raka trebušne slinavke na molekularni ravni.

### Zaključek

Vključitev fluorescenčnih barvil v diagnostiko in zdravljenje rakavih obolenj predstavlja pomemben

napredek vse od znanstvenih do kliničnih poti. Tovrstna barvila izboljšajo vizualizacijo tumorjev, omogočajo zgodnje odkrivanje z neinvazivnimi metodami in izboljšujejo natančnost kirurških posegov.

## Zahvala

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

## Literatura

1. Jun JV, Chenoweth DM, Petersson EJ. Rational design of small molecule fluorescent probes for biological applications. *Org Biomol Chem.* 2020;18(30):5747–5763.
2. Marinko K, Pečan LI, Vodenik J, et al. Fluorescence and fluorescein as pivotal tools in cancer diagnosis and therapy. *Proc Socrat Lect.* 2024;11:7–19.
3. Britannica TE of E. Fluorescein. 2018. <https://www.britannica.com/technology/fluorescein>.
4. Martínek M, Ludvíková L, Šranková M, et al. Common xanthene fluorescent dyes are visible-light activatable CO-releasing molecules. *Org Biomol Chem.* 2023;21(1):93–97.
5. Pothen A-G, Parmar M. Fluorescein. *StatPearls.* Treasure Island (FL): StatPearls Publishing; 2024. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK555957/>.
6. Moore GE, Kohl DA, Marvin JF, Wang JC, Caudill CM. Biophysical Studies of methods utilizing fluorescein and its derivatives to diagnose brain tumors. *Radiology.* 1950;55(3):344–362.
7. Mayo Clinic. Brain tumor – Symptoms and causes. 2023. <https://www.mayoclinic.org/diseases-conditions/brain-tumor/symptoms-causes/syc-20350084>.
8. Schebesch K, Brawanski A, Hohenberger C, Hohne J. Fluorescein sodium-guided surgery of malignant brain tumors: History, current concepts, and future projects. *Turk Neurosurg.* 2016.
9. National Cancer Institute. What is stomach cancer? n. d. <https://www.cancer.gov/types/stomach>.
10. Bhunchet E, Hatakawa H, Sakai Y, Shibata T. Fluorescein electronic endoscopy: A novel method for detection of early stage gastric cancer not evident to routine endoscopy. *Gastrointest Endosc.* 2002;55(4):562–571.
11. Mayo Clinic. Mouth cancer – Symptoms and causes. 2024. <https://www.mayoclinic.org/diseases-conditions/mouth-cancer/symptoms-causes/syc-20350997>.
12. Qaiser D, Sood A, Mishra D, et al. Novel use of fluorescein dye in detection of oral dysplasia and oral cancer. *Photodiagnosis Photodyn Ther.* 2020;31:101824.
13. World Cancer Research Fund International. Bladder cancer statistics. <https://www.wcrf.org/cancer-trends/bladder-cancer-statistics/>.
14. D'Hallewin M-A, Bezdetnaya L, Guillemin F. Fluorescence detection of bladder cancer: A review. *Eur Urol.* 2002;42(5):417–425.
15. Kelly JF, Snell ME. Hematoporphyrin derivative: A possible aid in the diagnosis and therapy of carcinoma of the bladder. *J Urol.* 1976;115(2):150–151.
16. Zaak D, Karl A, Knüchel R, et al. Diagnosis of urothelial carcinoma of the bladder using fluorescence endoscopy. *BJU Int.* 2005;96(2):217–222.
17. Xiao S, Zhang J, Zhu Z, et al. Application of fluorescein sodium in breast cancer brain-metastasis surgery. *Cancer Manag Res.* 2018;Volume 10:4325–4331.
18. Farahani MK, Gharibshahian M, Rezvani A, Vaez A. Breast cancer brain metastasis: from etiology to state-of-the-art modeling. *J Biol Eng.* 2023;17(1):41.
19. Casaubon JT, Kashyap S, Regan J-P. BRCA1 and BRCA2 mutations. *StatPearls.* Treasure Island (FL): StatPearls Publishing; 2024. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK470239/>.
20. Qi B, Crawford AJ, Wojtynek NE, et al. Tuned near infrared fluorescent hyaluronic acid conjugates for delivery to pancreatic cancer for intraoperative imaging. *Theranostics.* 2020;10(8):3413–3429.
21. Li Z, Li Z, Ramos A, et al. Detection of pancreatic cancer by indocyanine green-assisted fluorescence imaging in the first and second near-infrared windows. *Cancer Commun.* 2021;41(12):1431–1434.
22. Zhai J, Yang H, Wang Z, Li Y, Ning C. Multifunctional nanomaterials-enhanced synergistic sono-phototherapy: Breaking the limitation of monotherapy. *Smart Mater Med.* 2022;3:315–328.
23. Kalubowilage M, Covarrubias-Zambrano O, Malalasekera AP, et al. Early detection of pancreatic cancers in liquid biopsies by ultrasensitive fluorescence nanobiosensors. *Nanomedicine Nanotechnol Biol Med.* 2018;14(6):1823–1832.
24. Olson MT, Wojtynek NE, Talmon GA, et al. Development of a MUC16-Targeted Near-Infrared Fluorescent Antibody Conjugate for Intraoperative Imaging of Pancreatic Cancer. *Mol Cancer Ther.* 2020;19(8):1670–1681.
25. Lu G, Van Den Berg NS, Martin BA, et al. Tumour-specific fluorescence-guided surgery for pancreatic cancer using panitumumab-IRDye800CW: A phase 1 single-centre, open-label, single-arm, dose-escalation study. *Lancet Gastroenterol Hepatol.* 2020;5(8):753–764.
26. Knutson S, Raja E, Bomgarden R, et al. Development and evaluation of a fluorescent antibody-drug conjugate for molecular imaging and targeted therapy of pancreatic cancer. Hagemeyer CE, editor. *PLOS ONE.* 2016;11(6):e0157762.
27. Hoogstins CES, Boogerd LSF, Sibinga Mulder BG, et al. Image-guided surgery in patients with pancreatic cancer: First results of a clinical trial using SGM-101, a novel carcinoembryonic antigen-targeting, near-infrared fluorescent agent. *Ann Surg Oncol.* 2018;25(11):3350–3357.
28. Hu R, Yang C, Wang Y, et al. Aggregation-induced emission (AIE) dye loaded polymer nanoparticles for gene silencing in pancreatic cancer and their *in vitro* and *in vivo* biocompatibility evaluation. *Nano Res.* 2015;8(5):1563–1576.

# METODE DOLOČEVANJA CIRKULIRAJOČIH TUMORSKIH CELIC RAKA DOJKE NA ONKOLOŠKEM INŠTITUTU LJUBLJANA

Tanja Jesenko<sup>1,2</sup>, Simona Miceska<sup>1</sup>, Živa Pišljar<sup>1,2</sup>, Maja Čemažar<sup>1,3</sup>, Veronika Kloboves-Prevodnik<sup>1,4</sup>, Cvetka Grašič Kuhar<sup>1,2</sup>

<sup>1</sup> Onkološki inštitut Ljubljana, Ljubljana, Slovenija

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

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

<sup>4</sup> Medicinska fakulteta, Univerza v Mariboru, Maribor, Slovenija

## Izveček

Cirkulirajoče tumorske celice (CTC) so postale pomemben biološki označevalec pri raku dojk, saj ponujajo vpogled v potek in sledenje bolezni. Izolacija CTC predstavlja velik izziv zaradi njihove redkosti in kompleksnega okolja krvnih celic. Metode izolacije omogočajo obogatitev CTC iz vzorca krvi in olajšajo nadaljnjo analizo. Izolacija in analiza CTC postajata ključno raziskovalno področje vsakega onkološkega centra. Na Onkološkem inštitutu Ljubljana (OIL) smo prve korake naredili leta 2020. Iskali smo preprosto metodo za izolacijo in karakterizacijo CTC, ki bi omogočala prepoznavanje CTC s citopatološko analizo, ki je še vedno zlati standard v diagnostiki raka. Ocenili smo dve metodi za izolacijo CTC pri bolnicah z rakom dojk, ki temeljita na različnih pristopih. Ena od metod omogoča izolacijo CTC na podlagi njihovih bioloških značilnosti, izražanju epitelijskega markerja celične adhezije (EpCAM). Druga metoda pa omogoča izolacijo CTC na podlagi njihovih fizikalnih lastnosti, večje velikosti in stisljivosti napram ostalim krvnim celicam. Od ocenjenih metod se je za primernejšo izkazala fizikalna metoda, saj omogoča izolacijo večjih količin morfološko ohranjenih CTC. Po izolaciji CTC pripravimo citološke preparate, ki jih nato nadaljnje ovrednotimo z različnimi barvanji in citopatološko analizo. Na ta način lahko trenutno določimo število CTC v krvi, njihovo morfološko ohranjenost ter njihov fenotip (epiteljski, mezenhimski ali hibridni). Ob pridobivanju vzorcev tekočih kliničnih študij in načrtovano vzpostavitev translacijske platforme na mišjih modelih, pa v prihodnosti želimo nabor karakterizacije CTC še povečati, tudi z vzpostavitev gojenja CTC v laboratoriju *ex vivo*, kar bo odprlo vrata za nadaljnje kompleksne študije CTC.

CTC so postale pomemben biološki dejavnik pri raku, vključno z rakom dojk, saj ponujajo nepogrešljiv vpogled v proces napredovanja bolezni in odziva na terapijo (Cani & Hayes, 2024; Cortés-Hernández in sod., 2024). Ker CTC predstavljajo vmesno stopnjo v procesu metastaziranja, ima lahko spremljanje števila CTC v krvnem obtoku velik pomen pri spremljanju bolnikov med in po zdravljenju. V krvnem obtoku so CTC zelo heterogena populacija tumorskih celic. Zaradi neugodnega vpliva strižnih sil krvnega pretoka in napada imunskih celic je večina CTC v krvi mrtvih ali močno poškodovanih. CTC se pojavljajo tudi v različnih velikostih in z veliko epitelijsko-mezenhimsko plastičnostjo. Izražajo različne fenotipe, vključno s popolnoma epitelijskim (E), popolnoma mezenhimskim (M) ali hibridnim/delnim epitelijsko-mezenhimskim (E/M) fenotipom (Lozar in sod., 2019). Te celice izražajo značilnosti obeh fenotipov in predstavljajo CTC z najvišjim metastatskim potencialom, ki jih pogosto najdemo v obliki celičnih skupkov. CTC pri raku dojk imajo še posebno visoko stopnjo plastičnosti zaradi pogostih okvar mehanizmov homologne rekombinacije za popraviljanje DNA. Tumorske celice zato, da bi preprečile celično smrt zaradi nakopičenih napak pri okvarjeni homologni rekombinaciji, vključijo alternativne obhodne poti, ki še dodatno povečajo genomsko nestabilnost. CTC, ki nastanejo iz tumorjev dojk, zato pogosto razvijejo še večji nabor mehanizmov za pobeg, ki se lahko v različnih fazah njihove metastatske poti vklopijo in izklopijo glede na stresno spodbudo (Heitmeir in sod., 2022). CTC lahko najdemo v obliki posameznih celic ali skupkov celic. Skupki CTC so opredeljeni kot večcelični skupki CTC, sestavljeni iz dveh ali več celic, ki se držijo skupaj preko medceličnih povezav (Aceto in sod., 2014). Skupki so lahko sestavljeni samo iz tumorskih celic (tj. homotipski skupki CTC) ali pa poleg tumorskih tudi iz netumorskih celic (heterotipski skupki CTC), kar kaže na pomembno vlogo teh večceličnih agregatov v procesu metastaziranja (Aceto in

sod., 2020). Dokazano je bilo, da imajo skupki celic do 50-krat večji metastatski potencial v primerjavi s posameznimi CTC, kar je posledica večje viabilnosti tumorskih celic v skupku (Aceto in sod., 2014). Pri bolnicah z rakom dojke so opazili presenetljiv in nepričakovan vzorec sproščanja visoko metastatskih skupkov CTC. Sproščanje je temeljilo na cirkadianem ritmu, pri čemer se je večina spontanah intravazacijskih dogodkov CTC zgodila med spanjem (Diamantopoulou in sod., 2022).

Zaradi heterogenosti CTC so se razvile različne metode izolacije iz vzorca krvi, katerih cilj je ločiti CTC od okoliških krvnih celic. Strategije izolacije izkoriščajo biološke ali fizikalne lastnosti CTC. Biološke tehnike izolacije temeljijo na prisotnosti celičnih označevalcev in pogosto vključujejo pozitivno selekcijo na podlagi označevalcev epiteljskih celic ali negativno selekcijo na skupni levkocitni antigen CD45. Prva metoda za določanje števila CTC, ki jo je odobrila Ameriška agencija za hrano in zdravila (FDA), CELLSEARCH (Menarini Silicon Biosystems), temelji na izolaciji na podlagi bioloških lastnosti in uporablja fluorescenčno barvanje in slikanje za odkrivanje CTC epiteljskega izvora (CD45-, EpCAM+ in citokeratini 8, 18+ in/ali 19+) (Riethdorf in sod., 2018). Test je validiran za določevanje števila CTC kot prognostičnega dejavnika pri raku dojke, prostate in debelega črevesa. Poleg sistema CELLSEARCH, izkorišča pozitivno selekcijo na EpCAM tudi metoda MACS (z magnetom aktivirano sortiranje celic), ki omogoča izolacijo CTC z vezavo magnetih kroglic z vezanim protitelesom za EpCAM. Označene CTC z magnetnimi kroglicami se zadržijo v magnetu in jih na ta način lahko ločimo od ostalih celic. Glavna omejitev bioloških metod je izolacija le deleža celic CTC v krvi, saj omogočajo detekcijo le CTC, ki izražajo epiteljske markerje. Drugo platformo Parsortix (ANGLE plc.) je leta 2022 odobrila FDA kot diagnostični pripomoček *in vitro*, namenjen obogatitvi CTC iz periferne krvi pri bolnicah z diagnozo metastatskega raka dojke. Sistem Parsortix je mikrofluidni sistem, ki sortira celice v kapilarah v filtrirni kaseti in jih ločuje na podlagi fizikalnih lastnosti, njihove večje velikosti in manjše stisljivosti v primerjavi z drugimi komponentami krvi (Miller in sod. 2018). Kapilaram v filtrirni kaseti se manjša premer in na koncu se v kapilarah zadržijo večje celice, manjše krvne celice pa stečejo skozi njih v odpadni lonček. Na koncu obrnemo mikrofluidni tok in obogateno frakcijo večjih celic (CTC) zberemo v zbirno epruveto. Iz zbrane frakcije lahko pripravimo citološke preparate ali pa jo uporabimo za gojenje *ex vivo* in druge analize, na primer izolacijo nukleinskih kislin ali proteinov.

Na Onkološkem inštitutu Ljubljana smo ocenili sistema MACS in Parsortix tako na predkliničnem nivoju z dodajanjem celične linije raka dojke v kri zdravih prostovoljcev ter na kliničnem nivoju pri bolnicah z rakom dojke (odobritev št. 0120-133/2017-2 in 0120-150-2019/4) (Jesenko in sod., 2021; Lozar in sod., 2020). Za bolj ustreznega se je izkazal sistem Parsortix, ki izolira CTC na podlagi fizikalnih lastnosti. Naša raziskava je potrdila, da sistem omogoča izolacijo viabilnih CTC z ohranjenimi morfološkimi značilnostmi in tako omogoča identifikacijo CTC na podlagi citopatološke ocene (Jesenko in sod., 2021). Prednost citopatološke analize je, da je v kliničnem okolju lahko dostopna, saj so citopatologi sestavni del oskrbe bolnikov z rakom. Razvili smo tudi merila za identifikacijo in klasifikacijo za citopatološko vrednotenje CTC raka dojke, saj je velika večina CTC v krvi mrtvih ali močno poškodovanih, kar vodi v degeneracijo celic in oteženo identifikacijo s citopatološko analizo (Jesenko in sod., 2021). Merila za morfološko ohranjene CTC so: celice z morfološkimi značilnostmi malignosti, kot so velika jedra, visoko razmerje med jedrom in citoplazmo, pičla citoplazma, vidna struktura kromatina ali prisotnost mitoze. Kriteriji za opredelitev morfološko neohranjenih CTC so: celice z morfološkimi značilnostmi malignosti, kot so velika jedra, visoko razmerje med jedrom in citoplazmo, pičla citoplazma ter znaki hude degeneracije (izguba kromatinske strukture ali celovitosti jedrske membrane ter prisotnost citoplazemskih vključkov). Z imunofluorescenčnim barvanjem citoloških preparatov lahko določimo tudi fenotip celic. Na istem preparatu pobarvamo jedra, citokeratin, vimentin ter skupni levkocitni antigen CD45. CTC predstavljajo populacijo celic z jedrom, negativno na CD45 ter pozitivnim barvanjem na CK, VIM ali oboje.

S trenutno vzpostavljenimi metodami lahko torej trenutno določimo število CTC in skupkov CTC v krvi ter opredelimo njihovo morfološko ohranjenost ter njihov fenotip (epiteljski, mezenhimski ali

hibridni). Ob pridobivanju vzorcev tekočih kliničnih študij in načrtovano vzpostavitevijo translacijske platforme na mišjih modelih, pa v prihodnosti želimo nabor karakterizacije CTC še povečati, tudi z vzpostavitevijo gojenja CTC v laboratoriju *ex vivo*, kar bo odprlo vrata za nadaljnje kompleksne študije CTC.

### Literatura

1. Aceto, N. (2020). Bring along your friends: Homotypic and heterotypic circulating tumor cell clustering to accelerate metastasis. *Biomedical Journal*, 43(1), 18.
2. Aceto, N., Bardia, A., Miyamoto, D. T., Donaldson, M. C., Wittner, B. S., Spencer, J. A., Yu, M., Pely, A., Engstrom, A., Zhu, H., Brannigan, B. W., Kapur, R., Stott, S. L., Shioda, T., Ramaswamy, S., Ting, D. T., Lin, C. P., Toner, M., Cani, A. K., & Hayes, D. F. (2024). Breast Cancer Circulating Tumor Cells: Current Clinical Applications and Future Prospects. *Clinical Chemistry*, 70(1), 68–80.
3. Cortés-Hernández, L. E., Eslami-S, Z., Pantel, K., & Alix-Panabières, C. (2024). Circulating Tumor Cells: From Basic to Translational Research. *Clinical Chemistry*, 70(1), 81–89.
4. Diamantopoulou, Z., Castro-Giner, F., Schwab, F. D., Foerster, C., Saini, M., Budinjas, S., Strittmatter, K., Krol, I., Seifert, B., Heinzelmann-Schwarz, V., Kurzeder, C., Rochlitz, C., Vetter, M., Weber, W. P., & Aceto, N. (2022). The metastatic spread of breast cancer accelerates during sleep. *Nature*, 607(7917), 156–162.
5. Heitmair, B., Deniz, M., Janni, W., Rack, B., Schochter, F., & Wiesmüller, L. (2022). Circulating Tumor Cells in Breast Cancer Patients: A Balancing Act between Stemness, EMT Features and DNA Damage Responses. *Cancers*, 14(4).
6. Jesenko, T., Modic, Z., Kuhar, C. G., Cemazar, M., Matkovic, U., Miceska, S., Varl, J., Kuhar, A., & Kloboves-Prevodnik, V. (2021). Morphological features of breast cancer circulating tumor cells in blood after physical and biological type of isolation. *Radiology and Oncology*, 55(3), 292–304.
7. Lozar, T., Gersak, K., Cemazar, M., Kuhar, C. G., & Jesenko, T. (2019). The biology and clinical potential of circulating tumor cells. In *Radiology and Oncology* (Vol. 53, Issue 2, pp. 131–147). Sciendo.
8. Lozar, T., Jesenko, T., Kloboves Prevodnik, V., Cemazar, M., Hosta, V., Jericevic, A., Nolde, N., & Grasic Kuhar, C. (2020). Preclinical and Clinical Evaluation of Magnetic-Activated Cell Separation Technology for CTC Isolation in Breast Cancer. *Frontiers in Oncology*, 10.
9. Miller, M. C., Robinson, P. S., Wagner, C., & O'Shannessy, D. J. (2018). The Parsortix™ Cell Separation System—A versatile liquid biopsy platform. *Cytometry Part A*, 93(12), 1234–1239.
10. Riethdorf, S., O'Flaherty, L., Hille, C., & Pantel, K. (2018). Clinical applications of the CellSearch platform in cancer patients. *Advanced Drug Delivery Reviews*, 125, 102–121.

# KATEPSINA B IN X PRI TUMORSKIH MATIČNIH CELICAH

Ana Mitrović<sup>1,2</sup>, Damijan Knez<sup>2</sup>, Izidor Sosič<sup>2</sup>, Stanislav Gobec<sup>2</sup>, Janko Kos<sup>1,2</sup>

<sup>1</sup> Odsek za biotehnologijo, Inštitut Jožef Stefan, Ljubljana, Slovenija

<sup>2</sup> Fakulteta za farmacijo, Univerza v Ljubljani, Ljubljana, Slovenija

## Izvleček

Številni bolniki z rakom razvijejo odpornost na terapijo, kar vodi do ponovitve bolezni. Ponovni pojav raka lahko pripišemo predvsem populaciji tumorskih matičnih celic (TMC), ki predstavlja glavni izziv pri razvoju novih terapij za zdravljenje raka. Pri različnih procesih nastanka in napredovanja raka imajta pomembno vlogo lizosomski cisteinski peptidazi katepsina B in X. Njuno aktivnost lahko selektivno reguliramo na več ravneh, vključno z uporabo specifičnih nizko molekularnih zaviralcev, zato predstavljata obetavni molekularni tarči. V tej raziskavi smo pokazali, da sta v TMC povečana izražanje in aktivnost katepsinov B in X ter da lahko z zaviranjem njune aktivnosti vplivamo na fenotip TMC, s čimer bi lahko izboljšali učinkovitost protitumorne terapije.

## Uvod

Kljub napredku pri zdravljenju raka v zadnjih letih je ponovni pojav bolezni še vedno glavna težava pri učinkovitem zdravljenju in podaljšanju preživetja bolnikov z rakom. Učinkovitost zdravljenja raka je omejena z razvojem rezistence in s ponovnim pojavom raka (1). Vse več dokazov kaže, da znotraj heterogene populacije celic v tumorjih do pojavitja odpornosti na terapijo in ponovnega pojava raka pride zaradi prisotnosti majhne populacije tumorskih matičnih celic (TMC), ki so odporne na večino uveljavljene protitumorne terapije (2). TMC so sposobne samoobnovitve, diferenciacije in tvorbe novih heterogenih tumorjev ter so tako ključne za nastanek in vzdrževanje tumorjev ter tvorbo metastaz (2,3). Za premagovanje omejitev obstoječe protitumorne terapije in za podaljšanje obdobja brez ponovitve bolezni zato potrebujemo nove terapevtske pristope, ki bi bili učinkoviti tudi proti TMC.

Primerne tarče za razvoj novih terapevtskih pristopov, ki lahko zavirajo TMC, predstavljajo molekule, izražene v manj diferenciranih tumorskih celicah in TMC, ki jih je mogoče uravnavati s specifičnimi učinkovinami. Kot takšni so bili opredeljeni proteolitični encimi, vključno s skupino lizosomskih cisteinskih peptidaz, katepsinov (4). Cisteinski katepsini sodelujejo v vseh fazah nastanka in napredovanja raka. V rakavih celicah so cisteinski katepsini prekomerno izraženi, premeščeni iz lizosomov in endosomov na celično membrano ali izločeni iz celic. Poleg tega so bili prepoznani tudi kot pomemben del dinamičnega odziva na protitumorno terapijo, bodisi v tumorskih celicah bodisi v celicah tumorskega mikrookolja (5,6). Zaradi prekomerne proteolitične encimske aktivnosti, inhibicija cisteinskih katepsinov predstavlja učinkovito farmakološko orodje za zdravljenje raka, ki lahko zmanjša rast in napredovanje tumorja (4).

Pomembno vlogo pri napredovanju raka med cisteinskimi katepsini lahko pripišemo katepsinoma B in X. Zaradi svoje karboksipeptidazne aktivnosti sta ta dva katepsina edinstvena v skupini cisteinskih katepsinov (7,8). Poleg tega lahko katepsin B deluje tudi kot endopeptidaza, saj je njegova aktivnost opredeljena s položajem zaporne zanke, strukturnim elementom, ki uravnava dostop substratov do aktivnega mesta (7). Nasprotno katepsin X deluje izključno kot karboksimonopeptidaza zaradi vstavka, imenovanega "mini zanka", ki omejuje dostop večjih substratov do njegovega aktivnega mesta (8). Pri napredovanju raka katepsin B direktno razgrajuje proteine zunajceličnega matriksa (ZCM) in kot eden izmed osrednjih delov proteolitičnega omrežja interagira s številnimi drugimi peptidazami (5,6). Glede na nezmožnost katepsina X da direktno razgrajuje ZCM, so bili predlagani različni alternativni mehanizmi udeležnosti katepsina X pri napredovanju raka, vključno s kompenzacijo aktivnosti katepsina B, premostitvijo tumorske senescence, regulacijo integrinskih receptorjev in

regulacijo znanega tumorskega supresorja profilina 1 (8). Povečano izražanje obeh katepsinov B in X je povezano z manj diferenciranimi rakavimi celicami in so ga opazili tudi po kemoterapiji in radioterapiji (9–11).

Katepsina B in X sta bila prepoznana kot obetavni molekularni tarči, primerni za razvoj novih protitumornih terapij. Pokazano je bilo, da zaviranje njune aktivnosti zmanjša rast in invazijo tumorjev tako *in vitro* v funkcijskih testih na celičnih linijah kot tudi *in vivo* na tumorskih mišjih modelih (12–17). V fizioloških pogojih je njuna aktivnost uravnana na več nivojih, vključno z regulacijo z endogenimi zaviralci (7,14,18,19). Vendar ti mehanizmi ne zadostujejo za zmanjšanje škodljivega delovanja pri patoloških pogojih, zato je potrebna uporaba dodatnih eksogenih zaviralcev.

Do danes so bili identificirani številni zaviralci katepsina B. Z uporabo reverzibilnih zaviralcev bi se lahko izognili omejitvam, ki so značilne za ireverzibilne zaviralce in zaviralce s peptidno strukturo, pri katerih številni stranski učinki in nizka biološka uporabnost omejuje uporabo v klinični praksi (7). Takšen reverzibilni zaviralec katepsina B je nitroksolin (5-nitro-8-hidroksikinolin) (12,20). Za razliko od zaviralcev katepsina B je trenutno znanih le nekaj specifičnih zaviralcev katepsina X (8). Kot selektivni reverzibilni zaviralci katepsina X so bile identificirane spojine s triazolno strukturo (13).

Z namenom iskanja novih inovativnih pristopov za premagovanje omejitev, povezanih z odpornostjo tumorjev in preprečevanjem njihovega ponovnega pojava, s katerimi bi lahko izboljšali izide obstoječe protitumorne terapije in povečali njeno učinkovitost tudi proti manj diferenciranim celicam in TMC, smo v tej raziskavi ovrednotili izražanje katepsinov B in X v TMC in preverili vpliv zaviranja katepsinov B in X na fenotip TMC.

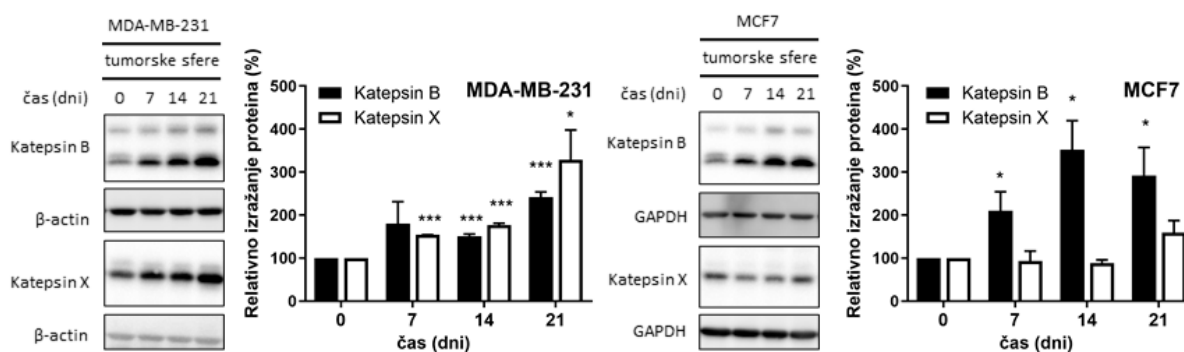
### Izolacija tumorskih matičnih celic

Tumorske matične celice se po svojih lastnostih razlikujejo od diferenciranih tumorskih celic, med drugim v izražanju površinskih označevalcev, sposobnosti samoobnavljanja in iniciacije tumorja. Te lastnosti izkoriščamo tudi za njihovo izolacijo. Ena izmed metod, ki jo lahko uporabljamo za izolacijo TMC, je tvorba tumorskih sfer, ki temelji na gojenju celic v suspenziji v gojišču brez seruma. Slednje omogoča proliferacijo in tvorbo tumorskih sfer celicam z lastnostmi TMC, medtem ko onemogoča rast diferenciranih tumorskih celic (21,22). V okviru raziskave smo izolirali TMC na podlagi njihove sposobnosti tvorbe tumorskih sfer iz celičnih linij raka dojke MDA-MB-231 in MCF7, ki se med seboj razlikujeta po stopnji diferenciacije, morfologiji, sposobnosti invazije, metastaziranja in vsebnosti celic s fenotipom TMC (23,24). V ta namen smo celice gojili v suspenziji v gojišču z dodatki, ki spodbujajo diferenciacijo TMC, kot so optimizirani brezserumski dodatek za rast matičnih celic B-27 in rastna faktorja bFGF in EGF. Celice smo za nastanek tumorskih sfer in izolacijo TMC gojili 7, 14 ali 21 dni v inkubatorju pri 37 °C. Čistost izoliranih TMC smo dodatno povečali s pripravo sekundarnih tumorskih sfer, tako da smo nastale tumorske sfere po 7 dneh pobrali, razbili in ponovno gojili 7 dni, da so nastale sekundarne sfere. Nastanek tumorskih sfer smo spremljali pod svetlobnim mikroskopom.

Uspešnost izolacije celic z lastnostmi TMC s tvorbo tumorskih sfer smo potrdili na podlagi izražanja označevalcev matičnosti in označevalcev mezenhimskega celičnega fenotipa tako na proteinskem nivoju s prenosom western kot na mRNA nivoju z metodo RT-qPCR z uporabo specifičnih oligonukleotidnih začetnikov za gene, katerih izražanje je spremenjeno v TMC. V TMC, izoliranih iz obeh celičnih linij raka dojke, smo s prenosom western pokazali povečano izražanje jedrnega transkripcijskega dejavnika matičnih celic SOX-2, ki je ključen za vzpostavitev in vzdrževanje matičnosti (25) in zmanjšanje izražanja epitelijskega označevalca E-kadherina oz. povečanje izražanja mezenhimskega označevalca vimentina. Povečano izražanje smo pokazali tudi na nivoju mRNA, kjer se je prav tako povečalo izražanje dejavnikov matičnosti, kot so jedrni transkripcijski dejavniki SOX2, OCT4 in NANOG, in označevalcev mezenhimskega celičnega fenotipa kot so vimentin in transkripcijski dejavniki epitelno-mezenhimskega prehoda TWIST, SNAIL1, ZEB1 in ZEB2.

## Izražanje katepsinov B in X se v tumorskih matičnih celicah poveča

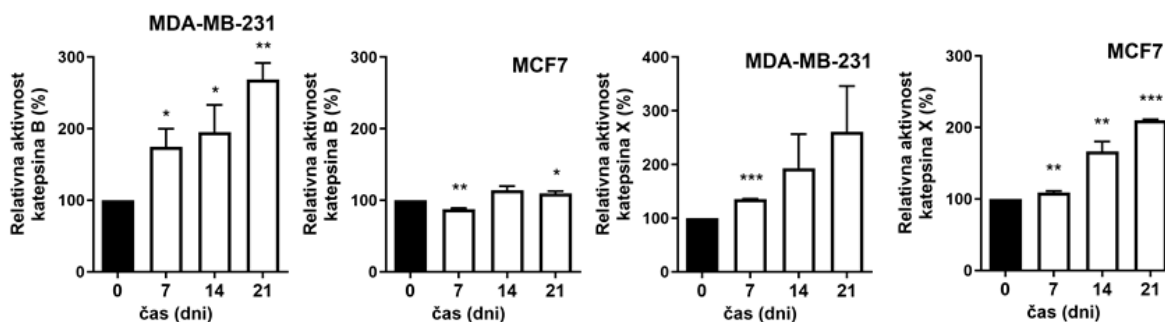
V TMC, izoliranih s tvorbo tumorskih sfer, smo nato ovrednotili izražanje katepsinov B in X. Izražanje katepsinov B in X smo spremljali v celičnih lizatih po ločitvi z elektroforezo z natrijevim dodecilsulfatom in prenosu western ter z metodo RT-qPCR z uporabo specifičnih oligonukleotidnih začetnikov za katepsina B in X. Izražanje katepsinov B in X se je v izoliranih TMC povečalo v primerjavi z njunim izražanjem v celičnih linijah pred izolacijo TMC tako pri celicah MDA-MB-231 kot pri celicah MCF7 (Slika 1). Izražanje katepsina B se je v TMC obeh celičnih linij povečalo za več kot 2-krat pri izolaciji TMC v vseh časovnih točkah tvorbe tumorskih sfer. Prav tako je tudi izražanje katepsina X v TMC celične linije MDA-MB-231 povečalo za več kot 50%, ko smo TMC izolirali iz tumorskih sfer po 7 dneh, medtem ko se je pri TMC celične linije MCF7 izražanje katepsina X povečalo šele, ko smo TMC izolirali iz tumorskih sfer po 21 dneh ali ko smo pripravili sekundarne tumorske sfere.



Slika 1. Izražanje katepsinov B in X v TMC, izoliranih s tvorbo tumorskih sfer iz celičnih linij MDA-MB-231 in MCF7, določeno s prenosom western. Histogrami predstavljajo relativno izražanje katepsinov B in X v TMC. Rezultati so podani kot povprečna vrednost  $\pm$  standardna napaka povprečne vrednosti dveh neodvisnih poskusov ( $n = 2$ ). \* $p < 0,05$ , \*\* $p < 0,01$ , \*\*\* $p < 0,001$ .

## V tumorskih matičnih celicah se poveča aktivnost katepsinov B in X

Nadalje smo z metodami encimske kinetike ovrednotili aktivnosti katepsinov B in X v celičnih lizatih TMC, izoliranih s tvorbo tumorskih sfer iz celičnih linij MDA-MB-231 in MCF7. Pri tem smo spremljali razgradnjo specifičnih fluorogenih substratov, za katepsina B Z-RR-AMC, za katepsina X pa Abz-FEK(Dnp)-OH. Aktivnost katepsinov B in X smo primerjali z njihovo aktivnostjo v celicah pred izolacijo TMC (Slika 2). Dobljeni rezultati kažejo, da se je pri TMC celične linije MDA-MB-231 aktivnost obeh katepsinov B in X povečala že pri njihovi izolaciji iz tumorskih sfer po 7 dneh. Aktivnost obeh katepsinov se je značilno povečala tudi pri TMC, izoliranih iz celične linije MCF7, vendar se tukaj aktivnost ni povečala, ko smo TMC izolirali iz tumorskih sfer po 7 dneh, ampak šele pri daljši inkubaciji in po pripravi sekundarnih sfer.



Slika 2. Aktivnost katepsinov B in X v TMC, izoliranih s tvorbo tumorskih sfer iz celičnih linij MDA-MB-231 in MCF7. Rezultati predstavljajo relativno aktivnost katepsinov B in X v TMC. Rezultati so podani kot povprečna vrednost  $\pm$  standardna napaka povprečne vrednosti dveh neodvisnih poskusov ( $n = 2$ ). \* $p < 0,05$ , \*\* $p < 0,01$ , \*\*\* $p < 0,001$ .

### Vpliv zaviralcev katepsinov B in X na fenotip tumorskih matičnih celic

V zadnjem delu raziskave smo preverili vpliv zaviranja katepsinov B in X na fenotip TMC. V ta namen smo TMC, izolirane po tvorbi tumorskih sfer iz celičnih linij MDA-MB-231 in MCF7, tretirali s selektivnimi, reverzibilnimi nizko molekularnimi zaviralci katepsinov B in X (13,20). Kot zaviralec katepsina B smo uporabili nitroksolin, kot zaviralec katepsina X pa triazolni derivat spojino Z9 (13,17,20). Določili smo vpliv zaviralcev katepsinov B in X na fenotip TMC c celičnih lizatih po ločitvi proteinov z elektroforezo in s prenosom western in z metodo RT-qPCR z uporabo specifičnih oligonukleotidnih začetnikov. Dobljeni rezultati kažejo, da zaviranje katepsinov B in X vpliva na fenotip TMC, kar se odraža v zmanjšanem izražanju označevalcev matičnosti, kot so jedrni transkripcijski dejavniki in označevalci mezenhimskega celičnega fenotipa.

### Zaključek

Pokazali smo, da sta katepsina B in X v večjih količinah prisotna v TMC, izoliranih iz celičnih linij raka dojke in predstavljata molekularni tarči, z regulacijo katerih bi lahko izboljšali terapijo, usmerjeno tudi proti TMC. Nadalje naši rezultati kažejo, da regulacija katepsinov B in X s njihovimi selektivnimi reverzibilnimi zaviralci vpliva na fenotip TMC in da poveča diferenciacijo TMC. Ti rezultati opredeljujejo katepsina B in X kot primerni tarči za protitumorno terapijo, usmerjeno proti TMC.

### Zahvala

Raziskava poteka ob finančni podpori Javne agencije za raziskovalno in inovacijsko dejavnost v okviru raziskovalnega projekta J3-3071 (A.M.) in raziskovalnega programa J4-0127 (J.K.).

### Literatura

- Butti R, Gunasekaran VP, Kumar TV, Banerjee P, Kundu GC. Breast cancer stem cells: Biology and therapeutic implications. *International Journal of Biochemistry and Cell Biology*. 2019;107:38–52.
- Holohan C, Van Schaeybroeck S, Longley DB, Johnston PG. Cancer drug resistance: an evolving paradigm. *Nat Rev Cancer*. 2013;13(10):714–26.
- Matsui WH. Cancer stem cell signaling pathways. *Medicine (United States)*. 2016;95(1):S8–19.
- Turk B. Targeting proteases: successes, failures and future prospects. *Nat Rev Drug Discov*. 2006;5(9):785–99.
- Olson OC, Joyce JA. Cysteine cathepsin proteases: regulators of cancer progression and therapeutic response. *Nat Rev Cancer*. 2015;15(12):712–29.
- Pečar Fonović U, Kos J, Mitrović A. Compensational role between cathepsins. *Biochimie*. 2024; S0300-9084(24)00085-3
- Kos J, Mitrović A, Mirković B. The current stage of cathepsin B inhibitors as potential anticancer agents. *Future Med Chem*. 2014;6(11):1355–71.
- Kos J, Vižin T, Fonović UP, Pišlar A. Intracellular signaling by cathepsin X: molecular mechanisms and diagnostic and therapeutic opportunities in cancer. *Semin Cancer Biol*. 2015;31:76–83.

9. Gopinath S, Malla R, Alapati K, Gorantla B, Gujrati M, Dinh DH, et al. Cathepsin B and uPAR regulate self-renewal of glioma-initiating cells through GLI-regulated Sox2 and Bmi1 expression. *Carcinogenesis*. 2013;34(3):550–9.
10. Shree T, Olson OC, Elie BT, Kester JC, Garfall AL, Simpson K, et al. Macrophages and cathepsin proteases blunt chemotherapeutic response in breast cancer. *Genes Dev*. 2011;25(23):2465–79.
11. Mitrović A, Pečar Fonović U, Kos J. Cysteine cathepsins B and X promote epithelial-mesenchymal transition of tumor cells. *Eur J Cell Biol*. 2017;96(6):622–31.
12. Mirković B, Markelc B, Butinar M, Mitrović A, Sosič I, Gobec S, et al. Nitroxoline impairs tumor progression *in vitro* and *in vivo* by regulating cathepsin B activity. *Oncotarget*. 2015;6(22):19027–42.
13. Pečar Fonović U, Mitrović A, Knez D, Jakoš T, Pišlar A, Brus B, et al. Identification and characterization of the novel reversible and selective cathepsin X inhibitors. *Sci Rep*. 2017;7(1):11459.
14. Aggarwal N, Sloane BF. Cathepsin B: Multiple roles in cancer. *Proteomics Clin Appl*. 2014;8(5–6):427–37.
15. Ruan H, Hao S, Young P, Zhang H. Targeting Cathepsin B for Cancer Therapies. *Horiz Cancer Res*. 2015;56:23–40.
16. Gondi CS, Rao JS. Cathepsin B as a cancer target. *Expert Opin Ther Targets*. 2013;17(3):281–91.
17. Mitrović A, Završnik J, Mikhaylov G, Knez D, Pečar Fonović U, Matjan Štefin P, et al. Evaluation of novel cathepsin-X inhibitors *in vitro* and *in vivo* and their ability to improve cathepsin-B-directed antitumor therapy. *Cellular and Molecular Life Sciences*. 2022;79(1):1–14.
18. Kos J, Mitrović A, Perišić Nanut M, Pišlar A. Lysosomal peptidases—intriguing roles in cancer progression and neurodegeneration. *FEBS Open Bio*. 2022;12(4):708–38.
19. Breznik B, Mitrović A, T. Lah T, Kos J. Cystatins in cancer progression: More than just cathepsin inhibitors. *Biochimie*. 2019;166:233–50.
20. Mirković B, Renko M, Turk S, Sosič I, Jevnikar Z, Obermajer N, et al. Novel mechanism of cathepsin B inhibition by antibiotic nitroxoline and related compounds. *ChemMedChem*. 2011;6(8):1351–6.
21. Tirino V, Desiderio V, Paino F, De Rosa A, Papaccio F, La Noce M, et al. Cancer stem cells in solid tumors: an overview and new approaches for their isolation and characterization. *FASEB J*. 2013;27(1):13–24.
22. Min SO, Lee SW, Bak SY, Kim KS. Ideal sphere-forming culture conditions to maintain pluripotency in a hepatocellular carcinoma cell lines. *Cancer Cell Int*. 2015;15(1):95.
23. Chavez KJ, Garimella S V, Lipkowitz S. Triple negative breast cancer cell lines: one tool in the search for better treatment of triple negative breast cancer. Eng-Wong J, Zujewski JA, editors. *Breast Dis*. 2010;32(1–2):35–48.
24. Comşa Ş, Cîmpean AM, Raica M. The Story of MCF-7 Breast Cancer Cell Line: 40 years of Experience in Research. *Anticancer Res*. 2015;35(6):3147–54.
25. Weina K, Utikal J. SOX2 and cancer: current research and its implications in the clinic. *Clin Transl Med*. 2014;3(1).

# IMUNOSPRESIJA PRI GLIOBLASTOMU: VLOGA CISTATINA F IN VPLIV NA CELICE NK

Emanuela Senjor<sup>1,2</sup>, Ana Mitrović<sup>1,2</sup>, Marko Jukić<sup>2</sup>, Matic Proj<sup>2</sup>, Stanislav Gobec<sup>2</sup>, Barbara Breznik<sup>3</sup>, Janko Kos<sup>1,2</sup>, Milica Perišić Nanut<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Odsek za biotehnologijo, Institut Jožef Stefan, Ljubljana, Slovenija

<sup>2</sup> Univerza v Ljubljani, Fakulteta za farmacijo, Ljubljana, Slovenija

<sup>3</sup> Odsek za genetsko toksikologijo in biologijo raka, Nacionalni inštitut za biologijo, Ljubljana, Slovenija

## Izvleček

Glioblastom je najagresivnejša oblika možganskih tumorjev, za katero še vedno ni na voljo učinkovite terapije. Značilnosti glioblastoma so heterogenost, dediferenciranost tumorskih celic in invazivnost, ki jih spremlja imunosupresivno mikrookolje. Čeprav je imunoterapija izboljšala prognozo pri mnogih vrstah raka, pri glioblastomu še ni pokazala uspeha. Naravne celice ubijalke (celice NK) igrajo pomembno vlogo v protitumorskem imunskem odzivu, saj lahko inducirajo lizo rakavih celic brez predhodnega stika z antigenom. Ta proces vključuje sproščanje perforina in grancimov, ki povzročijo apoptozo tarčnih celic. Aktivacijo teh citotoksičnih molekul uravnavajo katepsini, aktivnost katepsinov pa endogeni zaviralci cistatini. V celicah NK cistatin F zavira katepsine, pomembne za aktivacijo grancim-perforinske poti in s tem zmanjšuje citotoksičnost celic NK. Pokazali smo, da se cistatin F povišano izraža v glioblastomu, kjer negativno vpliva na preživetje pacientov. Z zaviranjem katepsina V, ki aktivira cistatin F, smo uspeli povečati citotoksični potencial celic NK proti tumorskim celicam. Spojina 7, ki smo jo razvili, selektivno in reverzibilno zavira katepsin V, kar vodi v povečano citotoksičnost celic NK in zmanjšano proliferacijo glioblastomskih celic. Ta strategija predstavlja obetaven pristop za izboljšanje protitumorskega imunskega odziva pri pacientih z glioblastomom..

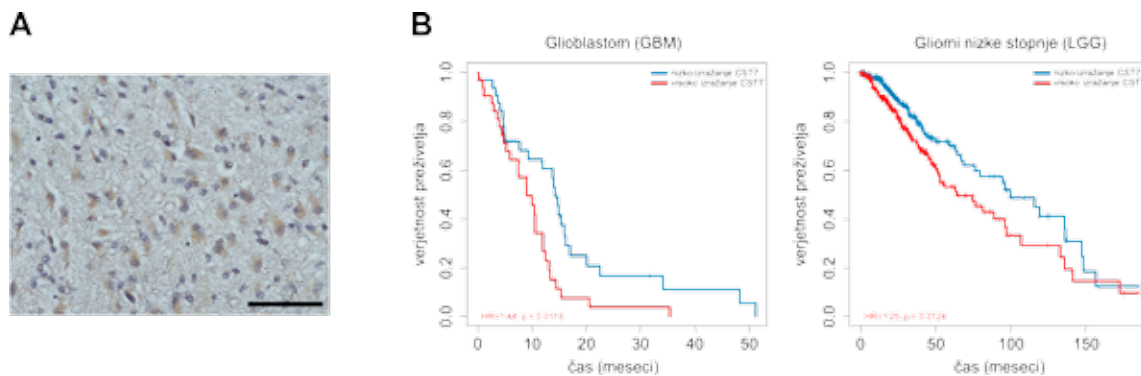
Glioblastom je najbolj agresivna oblika možganskih tumorjev, kjer kljub intenzivnim znanstvenim in kliničnim naporom v zadnjih letih pacienti nimajo obetavnih možnosti terapije. Glavne značilnosti glioblastoma so heterogenost in dediferenciranost tumorskih celic ter invazivnost. Prav tako je v tumorskem mikrookolju glioblastoma prisotnih veliko imunskih celic (celice mikroglije, monociti/makrofagi, ...), ki ustvarjajo imunosupresivno mikrookolje in tako še dodatno podpirajo rast in preživetje tumorskih celic. Preživetje pacientov kljub kirurški intervenciji, radio in kemoterapiji s temozolomidom ni obetavno, povprečno je doba preživetja le 15 mesecev (1). Pri drugih vrstah raka smo lahko v zadnjem času spremljali uspeh imunoterapije, kjer se z različnimi pristopi poskuša aktivirati pacientov lastni imunski odziv. Na tak način se je prognoza marsikatere vrste raka (npr. pri melanomu) bistveno izboljšala. Pri glioblastomu takega uspeha imunoterapija (še) ni uspela doseči (2).

Naravne celice ubijalke (celice NK) predstavljajo 5-20 % limfocitov v periferni krvi. Njihova lastnost je, da lahko sprožijo lizo tarčne celice (bodisi z virusi okužena celica, bodisi maligno spremenjena celica). V primerjavi s citotoksičnimi limfociti T imajo to prednost, da za lizo ne potrebujejo predhodnega stika z antigeni. Aktivira jih že porušeno ravnovesje med aktivirajočimi in zaviralnimi signali po srečanju s tarčno celico. Ena izmed pomembnih poti sprožanja lize tarčnih rakavih celic, ki jo uporabljajo celice NK, je grancim-perforinska pot. Celice NK po aktivaciji v imunsko sinapso sprostijo perforin, ki tvori pore v tarčni, maligno spremenjeni celici, ter grancime, ki vstopijo v tarčno celico preko novo nastalih por, ter sprožijo kaskado aktivacij kaspaz, kar vodi v apoptozo tarčne celice (3). Perforin in grancimi so v celicah NK shranjeni v neaktivni obliki. Za njihovo aktivacijo so pomembni katepsini. Bolj natančno, katepsina C in H aktivirata grancime, katepsin L pa pretvori perforin v njegovo aktivno obliko. Tudi aktivnost katepsinov je regulirana z različnimi dejavniki, kot so regulacija izražanja na genskem nivoju, glikozilacija, pH okolja, ki določa njihovo aktivnost, ter njihovimi endogenimi zaviralci- cistatini. V celicah NK je za regulacijo delovanja katepsinov še posebej pomemben cistatin F (4).

Cistatin F je endogeni zaviralec lizosomskih cisteinskih peptidaz, oz. cisteinskih katepsinov, ki spada v skupino cistatinov tipa II. Cistatin F je vpleten v uravnavanje citotoksičnega delovanja celic NK, saj prepreči aktivacijo perforina in grancimov v citotoksičnih granulah, kjer zavira delovanje katepsinov L in C. Za lokalizacijo cistatina F je ključna N-glikozilacija, saj se lahko nahaja znotrajcelično ali pa se izloča v medcelični prostor. Glikozilacija omogoča lokalizacijo cistatina F v endosomih in lizosomih, prav tako pa tudi privzem dimerne oblike cistatina F, ki se izloča iz celic, v sosednje celice. To omogoča, da cistatin F zavira delovanje katepsinov tudi v tistih celicah, ki ga ne izražajo, kar imenujemo tudi delovanje in trans (5,6).

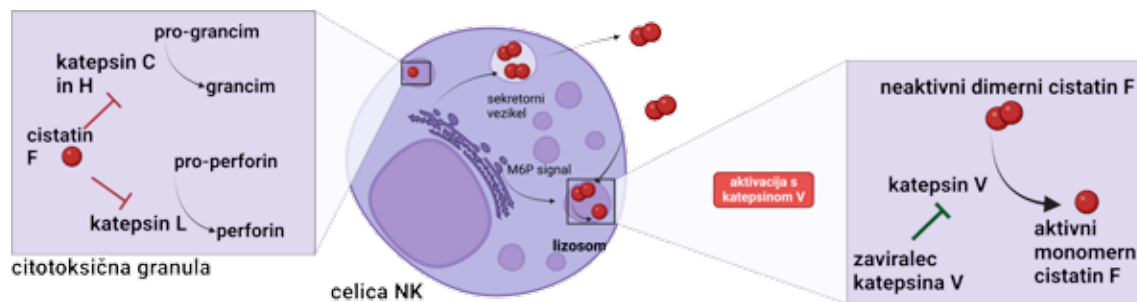
Cistatin F se v fizioloških pogojih nahaja v imunskih celicah (celice NK, citotoksični limfociti T, granulociti, dendritične celice...). Tako kot je značilno za druge cistatine, je njegovo izražanje pri raku deregulirano. Pri številnih vrstah raka se namreč cistatin F povišano izraža v tumorskem tkivu v primerjavi z normalnim tkivom (7,8).

Z uporabo imunohistokemije smo analizirali izražanje cistatina F pri glioblastomu (Slika 1). Ugotovili smo, da se ta ne izraža v normalnem (oz. nerakavem) možganskem tkivu, se pa povišano izraža v tkivnih rezinah pacientov z glioblastomom. Ugotovili smo tudi, da se cistatin F ne izraža le v imunskih celicah (mikrogliji) temveč tudi v tumorskih celicah, ki izražajo označevalce GFAP, SOX2 in CD44. Povišano izražanje cistatina F tudi negativno vpliva na preživetje pacientov z glioblastomom (9).



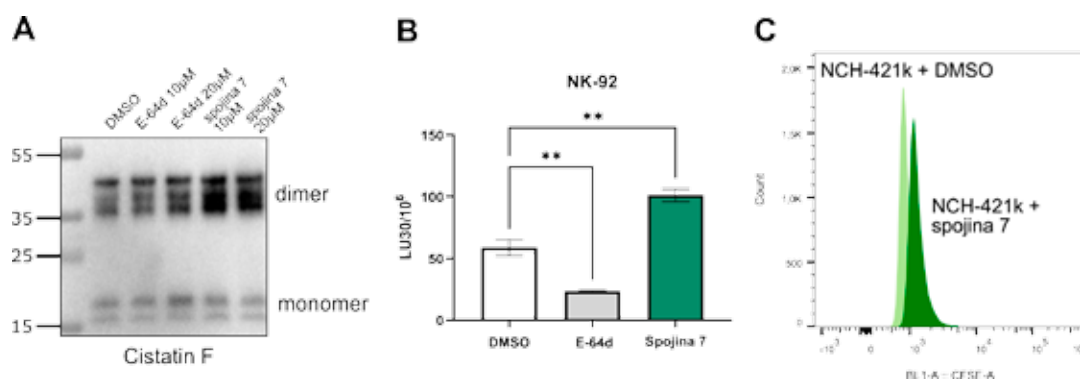
Slika 1. A: Imunohistokemijsko označevanje tkivne rezine glioblastoma za izražanje cistatina F (rjavo). Merilo predstavlja 50 µm. B: Krivulje preživetja pacientov z glioblastomom in gliomi nižje stopnje. Povišano izražanje cistatina F predstavlja slabšo prognozo za paciente. Podatki pridobljeni iz TCGA datoteke podatkov.

Povišano izražanje cistatina F ima negativni vpliv na delovanje protitumornega imunskega odziva. Če celice NK izpostavimo rekombinantnemu cistatinu F, se aktivnost katepsina C zmanjša, kar posledično vodi v zmanjšano aktivacijo grancimov ter nižji citotoksični potencial (5). Cistatin F smo tako opredelili kot enega izmed mediatorjev imunske supresije v tumorskem mikrookolju. Cistatin F ima pomembno lastnost, da katepsine zavira v njegovi monomerni obliki. Za njegovo delovanje je tako potrebna aktivacija iz dimerne v monomerno obliko, kar katalizira katepsin V (10). Izražanje katepsina V je tako kot izražanje številnih drugih katepsinov pri raku povišano. Poleg njegove vpletenosti v aktivacijo cistatina F je bilo pokazano, da ima katepsin V pomembno vlogo pri proliferaciji tumorskih celic, ter preurejanju tumorskega matriksa preko njegove elastazne aktivnosti (11). S ciljanjem aktivnosti katepsina V bi tako lahko preprečili aktivacijo cistatina F in njegove negativne učinke na delovanje celic NK (Slika 2).



Slika 2. Shematični prikaz delovanja cistatina F. Cistatin F v citotoksičnih granulah zavira delovanje katepsinov C, H in L ter tako prepreči aktivacijo perforin-grancimske poti ubijanja tarčnih celic. V tumorskem mikrookolju potrebujemo čimbolj aktivirane imunske celice. Če preprečimo aktivacijo cistatina F v monomerno obliko z zaviranjem delovanja katepsina V, lahko povečamo citotoksični potencial celic NK.

Za ta namen smo razvili nizkomolekularni zaviralec (spojina 7), ki selektivno in reverzibilno zavira katepsin V. Spojina 7 učinkovito zavira pretvorbo cistatina F iz monomerne v dimerno obliko. Na celični liniji celic NK smo pokazali da tretiranje celične linije NK-92 s spojino 7 poveča njihov citotoksični potencial proti tumorski celični liniji K-562 (12). Preliminarni rezultati kažejo, da spojina 7 tudi učinkovito zavira proliferacijo tumorskih celic, tako pri celicah, gojenih v dvodimenzionalnih pogojih, kot pri sferoidih, pripravljenih iz glioblastomskih celičnih linij (Slika 3).



Slika 3. A: Spojina 7 učinkovito zavira pretvorbo dimernega cistatina F v monomerno obliko v celični liniji U-937, medtem ko neselektivni zaviralec vseh katepsinov E64-d nima takega učinka. B: Celice NK-92, ki smo jih tretirali s spojino 7 (20  $\mu$ M, 18h) imajo višji citotoksični efekt proti celični liniji K-562. C: Glioblastomske celice tretirane s spojino 7 (20  $\mu$ M, 48h) proliferirajo manj kot kontrolne celice, ki smo jih tretirali s DMSO v testu proliferacije z uporabo pretočne citometrije in barvila CFSE.

Ciljanje katepsina V tako predstavlja obetavno strategijo za zmanjšanje škodljivih učinkov cistatina F na delovanje NK celic ter izboljšanje njihove citotoksičnosti proti rakavim celicam. Predtretiranje celic NK z zaviralcem katepsina V bi tako lahko povečalo odpornost celic NK na imunosupresivne dejavnike v tumorskem mikrookolju, ter omogočilo učinkovitejše ubijanje tarčnih tumorskih celic.

### Zahvala

Raziskave so potekale v okviru raziskovalnega programa P4-0127 in raziskovalnih projektov Z3-50102, J3-2516, J4-1776, ki jih financira Javna agencija za znanstvenoraziskovalno in inovacijsko

## dejavnost Republike Slovenije (ARIS).

## Literatura

1. Nørøxe DS, Poulsen HS, Lassen U. Hallmarks of glioblastoma: a systematic review. *ESMO Open*. 2017;1(6):e000144.
2. Medikonda R, Dunn G, Rahman M, Fecci P, Lim M. A review of glioblastoma immunotherapy. *J Neuro-Oncol* 2020 151(1):41–53.
3. Vivier E, Rebuffet L, Narni-Mancinelli E, Cornen S, Igarashi RY, Fantin VR. Natural killer cell therapies. *Nature*. 22. februar 2024;626(8000):727–36.
4. Perišić Nanut M, Sabotič J, Jewett A, Kos J. Cysteine cathepsins as regulators of the cytotoxicity of NK and T cells. *Front Immunol*. 2014;5.
5. Perišić Nanut M, Sabotič J, Švajger U, Jewett A, Kos J. Cystatin F affects natural killer cell cytotoxicity. *Front Immunol*. 2017;8:1459.
6. Senjor E, Pirro M, Švajger U, Prunk M, Sabotič J, Jewett A, idr. Different glycosylation profiles of cystatin F alter the cytotoxic potential of natural killer cells. *Cell Mol Life Sci*. 2024;81(1):1–19.
7. Yang C, Yu T, Liu Z, Ye X, Liao X, Wang X, idr. Cystatin F as a key family 2 cystatin subunit and prognostic biomarker for early-stage pancreatic ductal adenocarcinoma. *Oncol Rep*. 1. julij 2019;42(1):79–90.
8. Utsunomiya T, Hara Y, Kataoka A, Morita M, Arakawa H, Mori M, idr. Cystatin-like metastasis-associated protein mRNA expression in human colorectal cancer is associated with both liver metastasis and patient survival. *Clin Cancer Res Off J Am Assoc Cancer Res*. 2002;8(8):2591–4.
9. Senjor E, Perišić Nanut M, Breznik B, Mitrović A, Mlakar J, Rotter A, idr. Cystatin F acts as a mediator of immune suppression in glioblastoma. *Cell Oncol Dordr*. 2021;44(5):1051–63.
10. Maher K, Konjar Š, Watts C, Turk B, Kopitar-Jerala N, Konjar S, idr. Cystatin F Regulates Proteinase Activity in IL-2-activated Natural Killer Cells. *Protein Pept Lett*. 2014;21(9):957–65.
11. Lecaille F, Chazeirat T, Saidi A, Lalmanach G. Cathepsin V: Molecular characteristics and significance in health and disease. *Mol Aspects Med*. 2022;88. Dostopno na: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/35305807/>
12. Mitrović A, Senjor E, Jukić M, Bolčina L, Prunk M, Proj M, idr. New inhibitors of cathepsin V impair tumor cell proliferation and elastin degradation and increase immune cell cytotoxicity. *Comput Struct Biotechnol J*. 2022;20:4667–87.

# POVZETKI

---

# VPLIV RESEKCIJE ADENOKARCINOMA TREBUŠNE SLINAVKE NA VELIKOST ZUNAJCELIČNIH VEZIKLOV IN RAVEN miR-10B, miR-21 IN miR-30C V PLAZMI BOLNIKOV

David Badovinac, Hana Zavrtanik Čarni, Metka Lenassi, Aleš Tomažič

Univerzitetni klinični center Ljubljana, Ljubljana, Slovenija

Adenokarcinom trebušne slinavke (PDAC) kljub napredku diagnostičnih in terapevtskih postopkov še vedno sodi med malignome z najslabšo prognozo. Tekočinska biopsija z analizo zunajceličnih veziklov (ZV) in specifičnih mikro RNA (miRNA), ki izvirajo iz tumorja, bi lahko v prihodnosti služila kot pomembno orodje za zgodnje odkrivanje PDAC in sledenje odziva na zdravljenje. Na podlagi določenih plazemskih mikro RNA, miR-10b, miR-21 in miR-30c lahko ločimo PDAC od drugih bolezni oz. zdravih posameznikov. ZV sprošča večina celic in so prisotni v vseh telesnih tekočinah. Vključevanje proteinov in miRNA v ZV je reguliran proces, zato njihova sestava odraža tip in stanje celice izvora. S svojo raziskavo smo želeli ugotoviti, ali sta velikost ZV in povišana raven izražanja miR-10b, -21 in -30c v plazmi neposredno povezani s prisotnostjo PDAC in ali bi lahko služila kot biološki označevalec radikalnosti resekcije.

**p1** V prospektivno kohortno raziskavo smo vključili 83 bolnikov s PDAC, ki so prestali operacijo z namenom zdravljenja. Zbrali smo njihove klinične podatke. Pred posegom in v več časovnih točkah tekom sledenja po operaciji smo jim odvzeli še vzorce krvi za izolacijo in kvantifikacijo ZV iz plazme z metodo sledenja nanodelcev ter za določitev izražanja miR-10b, -21 in -30c v plazmi in ZV s kvantitativno verižno reakcijo s polimerazo.

Pri 50 bolnikih je bila narejena resekcija PDAC, pri 33 pa resekcija ni bila možna. Ugotovljena je bila statistično značilna razlika v predoperativni koncentraciji ZV med tistimi, ki so kasneje imeli resekcijo, in tistimi, ki resekcije niso imeli ( $p = 0,023$ ). 72,2 % bolnikov z resekcijo PDAC je en mesec po operaciji imelo večjo povprečno velikost ZV ( $p = 0,014$ ), enako v podskupini bolnikov z R0 resekcijo (77,3 %;  $p = 0,010$ ). Pri bolnikih z resekcijo smo pokazali značilno spremembo izražanja miR-10b-5p in miR-21-5p v ZV po operaciji, medtem ko sprememba izražanja miR-30c-5p ni bila statistično značilna. Značilna razlika v izražanju miR-21-5p pred operacijo in po enem mesecu ( $p = 0,002$ ) se je ohranila tudi pri podskupini z radikalno resekcijo. Tudi pri bolnikih z resekcijo R0 v primerjavi z bolniki z resekcijo R1/R2 je bilo značilno povišano izražanje miR-21-5p en mesec po operaciji v primerjavi z ravno pred operacijo ( $p = 0,031$ ). Direktno v plazmi je bila značilna le razlika v izražanju miR-10b-5p po resekciji.

Spremembe izražanja miRNA in velikosti ali koncentracije ZV v plazmi po resekciji PDAC bi lahko v prihodnosti uporabljali za natančnejšo opredelitev radikalnosti operacije. Na osnovi teh ugotovitev bi se lahko za adjuvantno kemoradioterapijo odločili tudi pri bolnikih, ki je sicer ne bi prejeli, in tako izboljšali uspešnost zdravljenja in preživetje bolnikov s PDAC. Poleg tega bi lahko tekočinska biopsija z ZV in miRNA pomagala pri sledenju bolnikov po resekciji, ocenjevanju odziva na zdravljenje in odkrivanju ponovitve bolezni.

## GENETSKE ANALIZE ARHIVSKIH VZORCEV TKIVA POKOJNIKOV Z NAMENOM UGOTAVLJANJA DEDNIH VZROKOV RAKA

Ana Blatnik, Vita Šetrajčič Dragoš, Vida Stegel, Olga Blatnik, Ksenija Strojnik, Srdjan Novaković, Mateja Krajc

*Onkološki inštitut Ljubljana, Ljubljana, Slovenija*

Vsem rakom je skupna nenadzorovana rast in delitev celic, ki je praviloma posledica pridobljenih, t.i. somatskih sprememb oz. različic v protoonkogenih in tumorskih supresorskih genih. Pri manjšem deležu onkoloških pacientov pa se rak razvije kot posledica zarodnih različic, ki so povezane z dedno predispozicijo za razvoj bolezni. Genetske preiskave z namenom dokazovanja dedne predispozicije praviloma izvajamo ob uporabi metodologije sekvenciranja naslednje/druge generacije (NGS). Rezultate genetskih preiskav skupaj s podatki o morebitnih drugih dejavnih tveganja uporabimo za celostno oceno posameznikove ogroženosti z rakom, ki je podlaga za nadaljnje preventivne ukrepe. V družinah, kjer se pojavljajo raki, ki bi lahko bili dedno pogojeni, a so pacienti, ki bi bili najprimernejši kandidati za genetsko testiranje, že pokojni, težje ocenimo ogroženost živečih družinskih članov. V teh primerih je možno opraviti testiranje vzorcev tkiva pacientov, ki ga tudi po smrti hranijo patohistološki laboratoriji. Namen naše raziskave je bil z uporabo NGS v vzorcih netumorskega tkiva pokojnih onkoloških pacientov ugotovljati prisotnost različic, ki ogrožajo za razvoj raka. Želeli smo raziskati uspešnost in uporabnost tovrstnih analiz ob uporabi metod, namenjenih testiranju tumorskih vzorcev, ter preveriti, ali so za genetske preiskave uporabni tudi vzorci, starejši od 30 let.

Raziskava je potekala v okviru Onkološkega inštituta Ljubljana med januarjem 2019 in junijem 2023. Primere, kjer bi bilo mogoče opraviti genetsko testiranje ob uporabi tkivnih vzorcev pokojnih onkoloških pacientov, smo v raziskavo vključili na podlagi podatkov o družinski anamnezi. Genetske analize smo opravljali z metodologijo NGS. Knjižnice so bile pripravljene s kompletom TruSight Tumor 170 (TST 170) ali TruSight Oncology 500 (TSO 500) (Illumina, San Diego, ZDA) v skladu z navodili proizvajalca. Sekvenčna analiza je potekala na sekvenatorju/sistemu NextSeq 550 (Illumina). Anotacija različic je bila opravljena s programsko opremo Variant Studio (Illumina) in programsko opremo Alamut Visual (Interactive BioSoftware, Rouen, Francija). Zarodne nukleotidne različice smo glede na klinični pomen klasificirali v pet razredov, v skladu s smernicami ACMG/AMP in kot klinično pomembne upoštevali patogene različice in verjetno patogene različice (PR/VPR). Od 160 vzorcev, poslanih na genetsko analizo, je bila ta neuspešna v 28 (17,5 %) primerih. Vzorci, ki so bili ob analizi starejši od 30 let, so bili uspešno analizirani v 29 primerih od 33 (87,9 %). Med 132 preiskovanci, kjer je bila analiza uspešna, smo v preiskovanih genih PR/VPR zaznali v 26 primerih (19,7 %). V vseh teh primerih je bilo nato opravljeno testiranje za prisotnosti družinske PR/VPR pri sorodniku, ki je bil v genetski obravnavi – 46,2 % jih je bilo nosilcev PR/VPR, ki je bila predhodno zaznana pri pokojnem svojcu. Vpliv rezultatov testiranja tkiv pokojnikov na preventivno obravnavo njihovih živečih svojcev smo ocenili v skupini 40 zdravih posameznic, ki so bile v obravnavo napotene zaradi diagnoze raka dojke pred 50. letom pri pokojni mami. Po opravljenem genetskem testiranju maminega tkivnega vzorca se je ocena ogroženosti z rakom dojke za 32,5 % vseh preiskovank pomembna spremenila.

V naši raziskavi smo v 82,5 % vseh primerov z NGS uspešno analizirali DNA vzorce, pridobljene iz tkiva pokojnikov. Ti rezultati so podobni ali celo boljši kot rezultati primerljivih predhodnih raziskav, sploh ko gre za vzorce, stare 30 let in več. Velika večina vseh PR/VPR, ki smo jih zaznali v okviru naše raziskave, je bila v slovenski populaciji predhodno že poročana v povezavi z dedno obliko raka – v skoraj polovici primerov smo jih potrdili tudi pri živečem sorodniku. V skupini 40-ih preiskovank, kjer smo testirali tkivo pokojne mame, se je po testiranju zmanjšalo število zmerno in močno ogroženih ter povečalo število populacijsko ogroženih, ki lahko mamografije opravljajo v okviru nacionalnega presejalnega programa.

# MAPPING SEX STEROID HORMONE SIGNALLING IN FALLOPIAN TUBES AS SOURCES OF HIGH-GRADE SEROUS OVARIAN CANCER PRECURSORS AT SINGLE-CELL RESOLUTION

Marija Gjorgoska, Tea Lanišnik Rižner

*Institute of Biochemistry and Molecular Genetics, Faculty of Medicine, University of Ljubljana, Ljubljana, Slovenija*

High-grade serous ovarian cancer (HGSOC) is the most lethal subtype of ovarian cancer, primarily because it is often diagnosed at advanced stages. The early molecular mechanisms driving ovarian carcinogenesis remain poorly understood, which complicates efforts to develop effective prevention and early detection strategies. Most HGSOCs originate from serous tubal intraepithelial carcinomas (STICs) at the distal (fimbrial) end of the fallopian tube (FT), which opens to and is in closest contact with the ovaries. STICs are believed to develop from secretory epithelial FT cells in a gradual, stepwise process over decades. During the evolutionary trajectory of HGSOC precursor lesions, which begins during the reproductive period of life, sex steroid hormone signalling may play an important role, as sex steroids circulate at higher concentrations than compared to older age and fluctuate monthly between high and low levels during the menstrual cycle. In our study, we investigate sex steroid hormone metabolism and signalling in FTs at a single-cell resolution.

p3

We analysed the gene expression of sex steroid receptors, as well as steroidogenic and steroid-metabolizing enzymes, across different cell populations in normal pre- and postmenopausal FTs using publicly available single-cell RNA sequencing datasets (1, 2).

Our gene expression analyses revealed that the co-expression patterns of sex steroid receptors, specifically oestrogen receptor  $\alpha$  (ESR1), progesterone (PGR) and androgen (AR) receptors in secretory epithelial cells differ between pre- and postmenopausal FTs. More specifically, in premenopausal FTs, over 75% of the secretory cell population displayed high positivity only for AR along the entire tube length, whereas in postmenopausal FTs, the high AR positivity of this cell population was accompanied with high ESR1 and PGR expression as well. These differences suggest that sex steroid hormone actions on secretory epithelial FT cells are regulated differently with age, potentially explaining the differing impacts of oral contraceptives and hormone replacement therapy on HGSOC risk. Additionally, secretory and stromal cells in both pre- and postmenopausal FTs expressed enzymes involved in the formation and inactivation of genotoxic catechol oestrogens. Alterations in the formation/inactivation mechanisms of these metabolites could contribute to the dysplastic transformation of secretory cells, ultimately leading to the development of HGSOC precursor lesions.

Secretory epithelial FT cells represent a key cell population where targeted modulation of sex steroid hormone metabolism and signalling could potentially prevent or limit the formation of precursor lesions for HGSOC.

## Acknowledgement

This study was funded by ARIS, grant number: J3-2535 and P3-0499 both to T.L.R.

## References

1. Ulrich ND, Shen Y-c, Ma Q, et al. Cellular heterogeneity of human fallopian tubes in normal and hydrosalpinx disease states identified using scRNA-seq. *Developmental Cell*. 2022/04/11/ 2022;57(7):914-929.e7.
2. Lengyel E, Li Y, Weigert M, et al. A molecular atlas of the human postmenopausal fallopian tube and ovary from single-cell RNA and ATAC sequencing. *Cell Reports*. 2022/12/20/ 2022;41(12):111838.

## SKUPAJ SMO V TEM! – OZAVEŠČANJE O RAKU TREBUŠNE SLINAVKE

Ivka Glas

*Združenje EuropaColon Slovenija*

Združenje EuropaColon Slovenija je neprofitna humanitarna organizacija, ki že 16 let združuje bolnike z raki prebavil, njihove svojce, zdravstveno osebje in drugo zainteresirano javnost. Pri svojem delu sledi smernicam vseevropskega združenja Digestive Cancers Europe (DiCE).

Programi in aktivnosti združenja so namenjeni 3 ciljnim skupinam: (1) zdravi splošni javnosti, (2) bolnikom in svojcem, ter (3) strokovni javnosti.

Med aktivnostmi za bolnike in svojce bi izpostavili: psiho-onkološko podporo (individualno svetovanje, podporna skupina za mlade bolnike do 55 let), prehransko svetovanje, telefonsko svetovanje in brezplačne posvete z zdravniki, spletna predavanja s strokovnjaki, programe in predavanja za svojce, ter Info točko na Onkološkem inštitutu Ljubljana.

Skozi pristen neposreden kontakt z bolniki in svojci v varnem okolju smo dobili dober vpogled v to, kar si bolniki in svojci želijo ter v zdravstveni obravnavi tudi pogrešajo, kar bi lahko strnili v šest točk:

1. Predolga pot od suma na bolezen do diagnoze;
2. Izguba osebnega zdravnika in dodatni izzivi zaradi izgube prvega stika zdravnika inbolnika;
3. Številne potrebne preiskave, večkrat samoplačniške zaradi dolge čakalne dobe v javnem zdravstvu;
4. Najhitreje do preiskav in diagnoze pridejo bolniki z urgentnimi zapleti, ki se zgledajo na urgenci;
5. Čakalna doba je več tednov od diagnoze do prvega zdravljenja, kar vzbuja dodatno skrb, da bodo pri zdravljenju kaj zamudili;
6. Nekateri so bili deležni zaustavitve oziroma prekinitve zdravljenja brez pojasni.

V letih 2019 – 2021 je združenje posebno pozornost posvetilo raku trebušne slinavke in izpeljalo obsežno nacionalno kampanjo SKUPAJ SMO V TEM o ozaveščanju civilne in strokovne javnosti o raku trebušne slinavke, ene najhujših oblik raka, za katero zboli v Sloveniji vsako leto okoli 400 novih bolnikov in ki ima eno najslabših prognoz preživetja. Namen je bil opozoriti ljudi na dokaj neznačilne znake in simptome te težke »pozabljene bolezni«, da bi postali bolj pozorni in se odpravili k zdravniku takoj, ko bi začutili težave, da bi se bolezen odkrila v čim bolj zgodnih stadijih, predvsem pa bolj zgodaj kot danes. Rak trebušne slinavke še vedno terja previsok davek in je ozdravljiv le v najzgodnejši fazi.

Prizadevanja združenja je podprlo 75 slovenskih občin, med katerimi so številne 21. novembra 2019 ob svetovnem dnevu raka trebušne slinavke osvetlile enega od pomembnih objektov v občini v vijolično barvo, objavile novice in intervjuje v lokalnih medijih (TV, radio, časopisi), na spletnih straneh in socialnih omrežjih.

p4

# VPLIV DISEKCIJE TREBUŠNE SLINAVKE S KAVITACIJSKIM ULTRAZVOČNIM SISTEMOM ZA ASPIRACIJO (CUSA) NA POJAVNOST POOPERATIVNE PANKREATIČNE FISTULE (PANCUT): PROTOKOL ZA PROSPEKTIVNO RANDOMIZIRANO KONTROLIRANO RAZISKAVO

Benjamin Hadžialjević, Hana Zavrtnik Čarni, Aleš Tomažič, David Badovinac

*Klinični oddelek za abdominalno kirurgijo, Univerzitetni klinični center Ljubljana, Ljubljana, Slovenija*

Zapleti po pankreatoduodenektomiji so pogosti in se pojavljajo pri 30% do 40% bolnikov. Pooperativna pankreatična fistula (angl. POPF) je najpogostejši zaplet po pankreatoduodenektomiji in je povezana s povišano pooperativno smrtnostjo in krajšim skupnim preživetjem bolnikov. Kavitacijski ultrazvočni sistem za aspiracijo (angl. CUSA) je kirurški instrument, ki se pogosto uporablja pri operacijah jeter in v nevrokirurgiji. CUSA selektivno preparira parenhimska tkiva, pri čemer ostanejo krvne žile in žolčni vodi nepoškodovani. Slednje se nato selektivno podveže ali spne s sponkami. Le nekaj študij je proučevalo povezavo med disekcijo tkiva trebušne slinavke z uporabo CUSA in nastankom POPF. Rezultati so bili nedosledni in so bili objavljeni pred posodobljenim konsenzom Mednarodne skupine za kirurgijo trebušne slinavke (angl. ISGPS) o definiciji POPF iz leta 2016.

Študija PANCUT je randomizirana kontrolirana študija, ki se izvaja na KO za abdominalno kirurgijo, UKC Ljubljana. Namen študije je ugotoviti, ali natančna disekcija tkiva trebušne slinavke z uporabo CUSA zmanjša pojavnost POPF. Bolniki, pri katerih je predvidena pankreatoduodenektomija, bodo naključno dodeljeni bodisi v eksperimentalno skupino, v kateri bo tkivo trebušne slinavke disecirano s CUSA, bodisi v kontrolno skupino, v kateri bo resekcija trebušne slinavke napravljena s skalpelom. V študijo bomo vključili skupno 180 bolnikov. Primarni izid je pojavnost POPF. Sekundarni izidi so operacijski čas, količina intraoperativne izgube krvi, pooperativni infekcijski zapleti, pooperativna krvavitev, dolžina hospitalizacije in smrtnost.

Po naših podatkih je študija PANCUT prva randomizirana kontrolirana študija, ki preiskuje vlogo CUSA pri resekciji tkiva trebušne slinavke med pankreatoduodenektomijo.

p5

# MAGEA3/6 TUMOUR ANTIGENS REGULATE GLYCOLYTIC PROTEIN HEXOKINASE TO ENHANCE PANCREATIC CANCER CELL SURVIVAL UNDER METABOLIC STRESS

Vesna Jurjevič<sup>1,2,3,4</sup>, Jerneja Koren<sup>1,2</sup>, Sima Tozandehjani<sup>1,2</sup>, Sara Uhan<sup>3</sup>, Lara Snoj<sup>1,2</sup>, Barbara Breznik<sup>1,2,3</sup>, Juan Sebastian Solano<sup>1,2</sup>, Klementina Fon Tacer<sup>1,2</sup>

<sup>1</sup> *Texas Tech University School of Veterinary Medicine, Amarillo, Texas, USA;*

<sup>2</sup> *Texas Center for Comparative Cancer Research (TC3R), Amarillo, Texas, USA*

<sup>3</sup> *Department of Genetic Toxicology and Cancer Biology, National Institute of Biology, Ljubljana, Slovenia*

<sup>4</sup> *University of Ljubljana, Biotechnical faculty, Ljubljana, Slovenija*

Melanoma antigen proteins (MAGEs) were the first tumor antigens identified over four decades ago. Despite the significant interest they have garnered as potential targets for cancer immunotherapy, a successful therapeutic approach remains elusive due to various side effects and limited efficacy. To better understand these challenges, we investigate their normal biological functions and how these are hijacked in cancer. Our data suggest that members of the MAGEA gene subfamily play a crucial protective role in male fertility and germ cell health, as they are typically expressed only in the testes. They appear to support spermatogenesis under various stress conditions, including nutrient deficiency. Here, we investigated the role of MAGEA3/6 in pancreatic cancer as they are detected in 10% of pancreatic cancers and their expression correlates with poor prognosis, aggressive tumor phenotype, and decreased survival. We hypothesized that pancreatic cancer cells hijack the normal protective role of MAGE-A3/6 to fuel unrestrained proliferation under nutrient stress.

To study the function of highly homologous MAGEA3 and MAGEA6 in pancreatic cancer cells, we utilized MIA PaCa-2 cells known for high rates of glucose consumption. We generated MAGEA6-expressing MIA PaCa-2 cell lines, which were subsequently exposed to different metabolic stressors such as glutamine depletion and glycolysis inhibition using 2-deoxy-D-glucose (2DG) treatment. The effects of MAGEA6 expression on viability and metabolism of MIA PaCa-2 cells were then studied using Western blotting, RNA sequencing, metabolic assays, and immunofluorescence (IF) staining with the MitoTracker, LysoTracker, and LysoTOX probes to label mitochondria, lysosomes, and the accumulated intracellular neutral lipids, respectively.

We found that, in comparison to control GFP-expressing cells, MAGEA6-expressing MIA PaCa-2 cells demonstrate increased resistance to glycolysis inhibition by 2DG but are more vulnerable to glutamine depletion, suggesting MAGEA6 role in the metabolic plasticity of pancreatic cancer cells. Further, we found that MAGEA6 expression promoted ATP production and oxidative phosphorylation of MIA PaCa-2 cells, particularly in response to 2DG. These findings were confirmed with the increased mitochondrial IF staining intensity in the MAGEA6-expressing MIA PaCa-2 cells. Furthermore, MAGEA6-expressing MIA PaCa-2 cells also had an increased number of but smaller lipid droplets. To understand the underlying molecular mechanism, we analyzed the expression of 2DG target enzyme hexokinase and other glycolysis proteins, including phosphofructokinase, lactate dehydrogenase A, pyruvate dehydrogenase, and numerous others. Our findings suggest that in pancreatic cancer MAGEA6 regulates glycolysis and oxidative phosphorylation to confer growth advantage under nutrient stress. This suggests that patients with MAGEA6-positive tumors may potentially benefit from a combination of chemotherapy with therapy targeting metabolic pathways.

p6

# REZULTATI INTERKONTINENTALNE ŠTUDIJE ALL-IC REL 2016: IZIDI ZDRAVLJENJA PRVE PONOVIŠTVE AKUTNE LIMFOBLASTNE LEVKEMIJE PRI OTROCIH

Marko Kavčič, Dániel J Erdélyi, Volkan Hazar, Andrea Reyes, Mirella Ampatzidou, Boryana Avramova, Anca Colita, Koray Yalçin, Monica Makiya, Sophia Polychronopoulou, Juan Tordecilla, Tomaž Prelog, Janez Jazbec

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

## Uvod

Študijska skupina za obravnavo otrok z akutno limfoblastno levkemijo Inter-Continental (ALL-IC) trenutno izvaja svojo tretjo akademsko randomizirano študijo za zdravljenje pediatrične ALL. S standardizacijo in posodabljanjem terapevtskih smernic ter uporabo pretočne citometrije za oceno minimalne preostale bolezni (MRD) za stratifikacijo zdravljenja so se pomembno izboljšali izidi zdravljenja. Kljub temu pa do ponovitve bolezni pride v 10-20% primerov.

## Cilji

V okviru opazovalne študije vzpostaviti enotno platformo za obravnavo otrok, ki doživijo prvo ponovitev ALL znotraj mreže ALL-IC. Analizirali smo izide po zdravljenju ponovitve ALL.

## Metode

Protokol IntReALL 2010 smo prilagodili tako, da je najbolje ustrezal državam ALL-IC. Bolnike smo razvrstili v skupino s standardnim (SR) ali v skupino z visokim tveganjem (HR) glede na značilnosti ponovitve in na genetski profil. Merila za visoko tveganje so vključevala: T-celični imunofenotip, zelo zgodnja ponovitev, zgodnja izolirana ponovitev v kostnem mozgu, ponovitev po presaditvi krvotvornih matičnih celic (PKMC) in specifične genetske spremembe. Vsi ostali so bili razvrščeni v skupino s standardnim tveganjem. Indikacija za zdravljenje s PKMC je bila razširjena na celotno skupino HR, pri bolnikih s SR pa na tiste s slabim odzivom na indukcijsko zdravljenje (MRD v kostnem mozgu  $\geq 0,1\%$  na 29. dan indukcije). Podatki so bili zbrani z uporabo registra na platformi REDCap.

## Rezultati

V projekt so bili vključeni otroci večine držav skupine ALL-IC: Argentina, Bolgarija, Čile, Grčija, Madžarska, Romunija, Slovenija in Turčija. Protokol ALL-IC REL so pričeli uporabljati tudi v Armeniji, Bosni in Hercegovini, na Hrvaškem, v Gruziji, Libanonu, Črni gori, Rusiji, Srbiji in Ukrajini, vendar te države niso prispevale podatkov v register. Nedavno so zanimanje pokazale dodatne države z Bližnjega vzhoda.

Od 500 registriranih bolnikov smo v končno kohorto vključili 473 bolnikov (povprečna starost 8,2 let, razpon 0,8 do 21; 38% deklic). Glede na imunofenotip je bilo 47 primerov T-ALL in 2 MPAL poleg 424 otrok z B-ALL. Ob začetni diagnozi je 91 % prejelo zdravljenje po protokolu ALL IC-BFM 2009. Med ponovitvami je do zelo zgodnje ponovitve prišlo v 25 % primerov, zgodnje ponovitve v 32 % in pozne ponovitve v 43 %. Kombiniran CNS relaps smo beležili pri 24 % ponovitev, relaps v testisih pa v 4 %.

Ob ponovitvi je bilo 48 % bolnikov razvrščenih kot SR in 52% kot HR. Po indukciji je stopnja popolne remisije doseglo 73 % bolnikov v SR skupini in 48 % bolnikov v HR skupini. MRD  $< 0,1\%$  ob koncu indukcije je doseglo 52,2 % SR in 28,7 % HR bolnikov. Celokupno preživetje je po 2 letih znašalo 55 %, 86 % v SR in 26 % v HR skupini.

Pomembno je poudariti, da so se bolniki v HR skupini soočili z močno neugodno prognozo s pomembno smrtnostjo zaradi napredovanja bolezni, zapletov povezanih z zdravljenjem in zapletov po PKMC. Presenetljivo majhen delež (39 %) HR bolnikov je bil deležen zdravljenja s PKMC, kar je verjetno posledica omejenega ali težavnega dostopa do tega postopka v nekaterih sodelujočih državah. Med HR bolniki, ki niso prejeli PKMC, skoraj ni bilo dolgoročno preživelih.

### **Zaključek**

V uvodnem poročilu Konzorcija ALL-IC REL izpostavljamo obetavne izide bolnikov v SR skupini. Gre za izide, ki so primerljivi z rezultati nekaterih največjih in najnaprednejših skupin v razvitem svetu. Izidi v skupini HR bolnikov so slabši kot v državah zahodne Evrope (npr. ALL REZ BFM 2002) – delno zaradi omejenega dostopa do PKMC v nekaterih državah. Boljša dostopnost novih zdravljenj, zlasti imunoterapije, bo v aktualnem protokolu ALL-IC REL 2024 dodatno zmanjšala stopnjo umrljivosti tako zaradi zaradi levkemije kot zaradi toksičnosti zdravljenja s standardno intenzivno kemoterapijo.

## OCENA PROLIFERACIJSKEGA INDEKSA Ki-67 V CITOLOŠKIH VZORCIH NODALNIH B-CELIČNIH LIMFOMOV

Veronika Kloboves Prevodnik, Simona Miceska, Mojca Založnik, Simon Buček, Nataša Nolde, Mojca Gjidera, Ulrika Klopčič, Zorica Čekić, Živa Pohar Marinšek, Gorana Gašljević

*Onkološki inštitut Ljubljana, Ljubljana, Slovenija*

Proliferacijski indeks (PI) Ki-67 je sestavni del diagnostike nodalnih B-celičnih limfomov (nBCL) vendar njegovo določanje v citoloških vzorcih ni standardizirano. Namen raziskave je bil vzpostaviti metodo za določanje PI Ki-67 v citoloških preparatih, ki bo omogočila zanesljivo razlikovanje med med indolentnimi in agresivnimi nBCL.

V raziskavo smo vključili bolnike z nBCL (N=86), pri katerih je bila za postavitev diagnoze najprej narejena aspiracijska biopsija s tanko iglo in nato še ekscizijska biopsija. Iz biopsijskih vzorcev smo pripravili celično suspenzijo za dvojno imunocitokemično (ICK) barvanje CD3/Ki-67 in pretočno-citometrično določanje števila limfomskih celic. PI Ki-67 smo ocenili s svetlobnim mikroskopom na citospinih z dvojnimi ICK barvanjem CD3/Ki-67 in sicer kvantitativno s štejetjem celic ter semikvantitativno z oceno deleža Ki-67 pozitivnih limfomskih celic. Semikvantitativno smo ocenili tudi delež Ki-67 pozitivnih limfomskih celic v histoloških vzorcih. Za vsako metodo smo določili mejne vrednosti PI Ki-67 za razlikovanje med agresivnimi in indolentnimi limfomi.

Pokazali smo močno korelacijo med štejetjem limfomskih celic s svetlobnim mikroskopom in določanjem števila limfomskih celic s pretočno-citometrično metodo (interklasni koeficient korelacije, IKK = 0,78), kar potrjuje zanesljivost rezultatov štetja celic. Prav tako smo ugotovili močno korelacijo med PI Ki-67, ki smo ga določili na citoloških in histoloških preparatih (IKK > 0,80). Na podlagi histopatološke preiskave smo 55 primerov razvrstili med indolentne in 31 med agresivne nBCL. Določili smo mejne vrednosti PI Ki-67, ki v citologiji (28,5% za kvantitativno in 27,5% za semikvantitativno metodo) in histologiji (35,5%) z visoko občutljivostjo ( $\geq 96,5\%$ ) in specifičnostjo ( $\geq 94,5\%$ ) omogočajo razlikovanje med agresivnimi in indolentnimi nBCL.

Določanje Ki-67 PI v citoloških preparatih z dvojnimi ICK barvanjem CD3/Ki-67 omogoča zanesljivo razlikovanje med indolentnimi in agresivnimi nBCL tako s kvantitativno kot semikvantitativno metodo.

# PROTITUMORSKO DELOVANJE UTIŠANJA TRANSKRIPCIJSKEGA FAKTORJA E2F1 NA MODELU HUMANEGA KOLOREKTALNEGA KARCINOMA: *IN VITRO* IN *IN VIVO* SPOZNANJA

Simona Kranjc Brezar<sup>1,2</sup>, Tanja Jesenko<sup>1,2</sup>, Monica Cazzato<sup>3</sup>, Živa Pišljarič<sup>1,2</sup>, Boštjan Markelc<sup>1</sup>, Tim Božič<sup>1</sup>, Gabriele Grassi<sup>3,4</sup>, Maja Čemažar<sup>1,5</sup>

<sup>1</sup> Oddelek za eksperimentalno onkologijo, Onkološki inštitut Ljubljana, Ljubljana, Slovenija

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

<sup>3</sup> Oddelek za znanosti o življenju, Univerzitetna bolnišnica Cattinara, Univerza v Trstu, Trst, Italija

<sup>4</sup> Oddelek za medicinske, kirurške in zdravstvene vede, Univerza v Trstu, Trst, Italija

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

Transkripcijski faktor E2F1 igra ključno vlogo pri raku debelega črevesa, saj uravnava ključne procese, ki so vključeni v začetek, napredovanje in metastaziranje tumorja. Njegova prekomerna izraženost je povezana z nenadzorovano celično proliferacijo, zaviranjem apoptoze, spodbujanjem angiogeneze in povečano invazivnostjo v celicah kolorektalnega karcinoma. V tem pogledu lahko transkripcijski faktor E2F1 predstavlja zanimivo tarčo za zdravljenje raka. Namen naše študije je bil raziskati protitumorsko učinkovitost utišanja transkripcijskega faktorja E2F1 z elektroporacijo majhnih interferenčnih RNA (siRNA), usmerjenih proti E2F1 (siE2F1), na človeškem modelu kolorektalnega karcinoma HT-29, tako *in vitro* na celični kulturi kot *in vivo* na subkutanih ksenograftih.

V *in vitro* pogojih smo določili terapevtski potencial siRNA molekul proti transkripcijskemu faktorju E2F1 po genskem elektroprenosu v humane celice kolorektalnega karcinoma HT-29 tako na nivoju določanja viabilnosti celic s testom PrestoBlue™ kot tudi na nivoju izražanja transkripcijskega faktorja E2F1 z metodo kvantitativne reverzne transkripcije (qPCR). Nadalje smo na modelu humanih tumorjev HT29 *in vivo* določili protitumorsko delovanje utišanja E2F1 po trikratnem intratumorskem genskem elektroprenosu siE2F1 s testom zaostanka v rasti tumorjev ter tudi raven izraženosti transkripcijskega faktorja E2F1 (qPCR) po terapiji. Poleg tega smo ocenili tudi delež proliferacije in nekroze ter ožiljenosti tumorjev po utišanju transkripcijskega faktorja siE2F1 z genskim elektroprenosom.

Rezultati kažejo, da utišanje transkripcijskega faktorja E2F1 po genskem elektroprenosu v tumorske celice zmanjša sposobnost preživetja celic HT-29 na 60 % v primerjavi s samo elektroporacijo in kaže na dobro protitumorsko učinkovitost. Utišanje transkripcijskega faktorja E2F1 po genskem elektroprenosu v tumorje *in vivo* je povzročila 15-dnevno zakasnitev rasti tumorja in ozdravili smo 12,5 % tumorjev v primerjavi s kontrolno skupino nezdravljenih tumorjev. Protitumorska učinkovitost utišanja transkripcijskega faktorja E2F1 je bila povezana z zmanjšano ravni izraženosti mRNA transkripcijskega faktorja E2F1 v celicah kolorektalnega raka tako *in vitro* kot *in vivo*. Na nivoju morfologije tumorjev utišanje transkripcijskega faktorja E2F1 48 ur po zadnji terapiji zmanjša delež proliferacije tumorskih za 40%, zviša delež nekroze za 34% in zmanjša delež ožiljenosti tumorjev za 41%.

Utišanje transkripcijskega faktorja E2F1 po genskem elektroprenosu se je izkazalo za obetaven pristop zdravljenja humanega kolorektalnega karcinoma zaradi neposrednih terapevtskih učinkov na tumorske celice. Vendar so potrebne dodatne študije za pojasnitev natančnih mehanizmov, ki so za to odgovorni.

## Zahvala

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

## ANALIZA CIRKULIRAJOČIH TUMORSKIH CELIC V KRVI BOLNIC Z NAPREDOVALIM RAKOM JAJČNIKA VISOKEGA GRADUSA OB DIAGNOZI

Tanita Kranjc, Simona Miceska, Erik Škof, Maja Krajec, Brigita Gregorič, Breda Škrbinc, Veronika Kloboves Prevodnik

*Onkološki inštitut Ljubljana, Ljubljana, Slovenija*

Serozni rak jajčnika visokega visokega gradusa (ang. high-grade serous ovarian cancer, HGSC) je najpogostejši in najbolj agresiven histološki tip raka jajčnika, ki ga običajno odkrijemo v napredovalnem stadiju (stadij FIGO III in IV). Kljub napredkom v diagnostiki in zdravljenju, ostaja 5-letno preživetje manjše od 40%, kar nakazuje potrebo po novih napovednih dejavnikov. Cirkulirajoče tumorske celice (CTC) se vse pogosteje uporabljajo kot pomemben biološki označevalec pri različnih vrstah raka, vključno z rakom jajčnika. Kljub temu podatki o prisotnosti posameznih CTC in skupkov pri bolnicah s primarnim, napredovalim HGSC še vedno manjkajo, zlasti pri uporabi metod, ki vključujejo vpogled v celično morfolologijo. Cilj raziskave je bil opisati ohranjenost CTC ter določiti njihovo število in prisotnost CTC skupkov pri tej skupini bolnic z uporabo metode Parsortix, ki omogoča analizo celične morfolologije.

**p10**

V raziskavi, ki trenutno poteka na Onkološkem inštitutu Ljubljana, smo vključili bolnice s primarnim, napredovalim HGSC ob postavitvi diagnoze. Pred začetkom zdravljenja smo bolnicam odvzeli 10 ml periferne krvi za izolacijo CTC. Izolacijo CTC od ostalih imunskih celic v vzorcu smo izvedli z napravo Parsortix (Angle, UK), optimalno v 4 urah, najkasneje v 24 urah po odvzemu vzorca. Iz izolata smo pripravili tri citospine s centrifugo Cytospin 4 (Thermo Shandon Inc., ZDA). En citospin smo posušili na sobni temperaturi, ga pobarvali po metodi May-Grünwald-Giemsa (MGG), ostala dva citospina smo fiksirali v 100 % metanolu in shranili za nadaljnja testiranja. MGG preparate smo skenirali s skenerjem Nanozoomer (Hamamatsu, Japonska), nato pa smo iz skeniranih preparatov določili število CTC in CTC skupkov.

V raziskavo smo vključili 12 bolnic s primarnim, napredovalim HGSC. Mediana starosti bolnic je bila 59 let (razpon 33-77 let). Devet bolnic je bilo v stadiju FIGO III, tri bolnice pa v stadiju FIGO IV. Pri analizi celične morfolologije smo opazili, da je bila morfolologija celic boljše ohranjena v vzorcih, ki so bili izolirani v prvih 4 urah (oz. v tekočem dnevu), v primerjavi z vzorci, pri katerih je bila izolacija izvedena naslednji dan. Pri enajstih bolnicah smo opazili prisotnost vsaj ene CTC, pri osmih bolnicah smo opazili  $\geq 5$  CTC v MGG preparatu. Morfolologija posameznih CTC v vzorcu bolnic se je razlikovala, kar nakazuje na polimorfno CTC v krvi bolnic. Pri dveh bolnicah smo opazili prisotnost enodimenzionalnih skupkov benignih celic z obilno citoplazmo in ovalnimi, enakovelikimi monokromnimi jedri, vendar skupkov CTC nismo zaznali. Poleg tega smo pri štirih bolnicah v krvi identificirali tudi prisotnost megakariocitov.

Ugotovili smo, da čas izolacije pomembno vpliva na ohranjenost morfolologije celic. CTC so bile prisotne pri večini bolnic s primarnim, napredovalim HGSC, pri čemer so izkazovale polimorfizem. Prav tako smo zaznali prisotnost skupkov benignih celic, medtem ko nismo opazili skupkov CTC. Za boljše razumevanje pomena in vpliva števila ter polimorfizma CTC, kot tudi prisotnosti benignih celičnih skupkov na potek bolezni, so nujno potrebne nadaljnje študije.

# UPORABA *IN VITRO* IN *IN VIVO* MODELOV OSTEOSARKOMA ZA VREDNOTENJE ELEKTROKEMOTERAPIJE

Saša Kupčič, Urša Lamprecht Tratar, Urška Kamenšek, Gregor Serša, Maja Čemažar

Onkološki inštitut Ljubljana, Ljubljana, Slovenija

Osteosarkom (OS) je eden najpogostejših primarnih rakov kosti pri ljudeh. Pojavlja se večinoma pri najstnikih in mladih odraslih. Primarno zdravljenje vključuje kirurški poseg in adjuvantno kemoterapijo. Petletno preživetje oseb s takim zdravljenjem je 70 %, pri bolnikih s pljučnimi metastazami pa le okoli 25 %. Elektrokemoterapijo so že uporabljali za zdravljenje kostnih metastaz, kjer se je izkazala kot zmerno uspešna pri zmanjševanju bolečine, vendar pa v teh primerih uporabljeni protokol zdravljenja ni bil prilagojen posebnostim kostnega tkiva. Za oceno elektrokemoterapije kot potencialnega zdravljenja OS smo morali najprej vzpostaviti ustrezen napovedni model bolezni. Uporaba različnih celičnih in živalskih modelov je ključnega pomena, kadar želimo pridobiti celovito razumevanje učinkovitosti in varnosti izbrane terapije. Zato smo v okviru te študije razvili 2D in 3D celične modele iz celične linije K7M2 za mišji OS in ortotopski mišji model *in vivo* s celično linijo K7M2-luc, ki izraža luciferazo. Za začetne preizkuse citotoksičnosti smo uporabili 2D celični model, ki pa kot drugi 2D modeli v celoti ne povzema ključnih lastnosti solidnih tumorjev, vključno z njihovo odpornostjo na citostatike. V ta namen smo vzpostavili tudi 3D večcelični tumorski sferoidi, saj njihova arhitektura spodbuja celično organizacijo, diferenciacijo in komunikacijo. Ti procesi vodijo do razvoja sferoidnega mikrookolja, ki povzema lastnosti *in vivo* čvrstih neožiljenih tumorjev; kinetiko rasti, presnovne procese in odpornost na citostatike. V rotacijskem inkubatorju Clinostar® smo gojili sferoide z različnim številom nasajenih celic ter jih iz inkubatorja odvzeli v različnih časovnih točkah. Nato smo določili odstotek apoptotičnih/nekrotičnih celic. Sferoidi, oblikovani iz 5000 celic in gojeni 1 teden, so bili izbrani kot primeren model za nadaljnje študije. Ker se tumorji OS običajno razvijajo na mestih intenzivne rasti kosti, kjer komunicirajo z elementi kostnega mikrookolja, je bila za ugotavljanje protitumorske učinkovitosti elektrokemoterapije potrebna uporaba ortotopičnega mišjega modela. Implantacija celic na isto anatomsko mesto kot ustreznemu humanemu rak (v tem primeru proksimalni del golenice) v primerjavi s standardnimi ektopičnimi (podkožnimi) modeli natančneje posnema mikrookolje in celične interakcije, ki jih najdemo v humanih tumorjih. Za študije *in vivo* smo celično linijo K7M2 najprej transducirali z genom za luciferazo. Celice smo nato z iglo 29G inokulirali v proksimalni del golenice tako, da smo z iglo prebili pokostnico in prišli v medularno območje, kamor smo injicirali celično suspenzijo. Rast tumorjev smo enkrat tedensko spremljali z In Vivo Imaging System (IVIS). Opazovali smo tako jakost bioluminiscenčnega signala, kot napredovanje degradacije kosti na mestu nasajenega tumorja. Miši smo evtanazirali približno 6 tednov po inokulaciji, ko je bila vidna liza kosti in so bili ugotovljeni klinični znaki, značilni za napredovano bolezen, kot so šepanje, hujšanje in dihalna stiska. Ta je bila prav tako pokazatelj razvoja za osteosarkom značilnih pljučnih metastaz. V okviru te študije smo uspeli vzpostaviti ustrezne modele *in vitro* in *in vivo* za nadaljnje raziskave.

## Zahvala

Raziskava je potekala v okviru raziskovalnega programa P3-0003, ki ga financira Javna agencija za znanstvenoraziskovalno in inovacijsko dejavnost Republike Slovenije (ARIS) ter internega projekta Onkološkega inštituta Ljubljana.

p11

## VALIDACIJA NANOTELES ZA VEZAVO NA SPECIFIČNE ANTIGENE MUKOZNEGA MELANOMA (MM)

Urša Lampreht Tratar<sup>1,2</sup>, Ario de Marco<sup>3</sup>, Urša Štrancar<sup>3</sup>, Tim Božič<sup>1</sup>, Barbara Perić<sup>1</sup>, Maja Čemažar<sup>1,4</sup>

<sup>1</sup> Onkološki inštitut Ljubljana, Ljubljana, Slovenija

<sup>2</sup> Univerza v Ljubljani, Veterinarska fakulteta, Ljubljana, Slovenija

<sup>3</sup> Univerza v Novi Gorici, Nova Gorica, Slovenija

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

Redki tumorji, kot so tumorji hematopoetskega sistema, ne-kožni melanomi ali mehkotkivni sarkomi, predstavljajo skoraj četrtino vseh tumorjev, ki prizadenejo ljudi v Evropi. Ker imajo slabšo prognozo kot pogostejše diagnosticirani tumorji, predstavljajo veliko socialno in ekonomsko breme. Med redke rake spada tudi mukozni melanom (MM), ki je agresiven tumor s slabo prognozo, nejasno etiologijo in še vedno v veliki meri nepoznano patogenezo. Zaradi nizke pojavnosti MM (1-2 % vseh melanomov) so možnosti za poglobljen študij bioloških vidikov te bolezni in za razvoj učinkovitih pristopov k zdravljenju precej omejene. Odkrivanje bolezni je ponavadi pozno, saj se MM pojavlja na skritih anatomskih predelih in brez očitnih začetnih kliničnih znakov. Zdravljenje MM zato običajno zahteva obsežno kirurško resekcijo primarnega tumorja, nemalokrat v kombinaciji z obsevanjem za lokalno kontrolo bolezni. Glede na znana dejstva, dajeta zgodnje odkrivanje teh oblik tumorjev in kirurški pristop (ko je možen) k zdravljenju primarnih tumorjev še vedno največje možnosti za uspešno kontrolo bolezni. Novi pristopi za slikanje *in vivo* in fluorescenčno vodenega kirurškega zdravljenja (angl. fluorescence image-guided cancer surgery (FGS)), kjer se uporabljajo molekularni označevalci tumorskih celic, bi lahko invazivnost kirurgije prilagodili vsakemu bolniku in izboljšali kirurške rezultate. V tem pogledu je ključnega pomena identifikacija molekularnih označevalcev tumorskih celic in njihova specifičnost vezave. Nanotelesa, ki se vežejo na takšne ločevalne molekularne označevalce, lahko nato uporabimo za označevanje posameznih celic v zelo heterogenih tumorjih. Zato je namen te klinične študije zbiranje vzorcev biopsij za validacijo nanoteles, specifičnih za MM. Sam protokol klinične študije bo zajemal zbiranje vzorcev petdesetih pacientov s citološko ali histološko potrjenim MM. Na parafinskih in zmrznjenih tkivnih rezih vzorcev bomo nato optimizirali protokol imunohistokemičnega barvanja nanoteles ter ovrednotili vezavo nanoteles na tkivnih rezih človeških biopsij. Vezavo bomo v vzorcih ocenili z lokalizacijo in stopnjo intenzivnosti izražanja označevalcev specifičnih za MM. Cilj te študije je optimizacija nanoteles specifičnih za MM, ki bi se nato lahko uporabila za specifično fluorescenčno vodeno kirurško zdravljenje.

### Zahvala

Raziskava je potekala v okviru raziskovalnega programa P3-0428, ki ga financira Javna agencija za znanstvenoraziskovalno in inovacijsko dejavnost Republike Slovenije (ARIS).

# GENSKI ELEKTROPRENOS REPORTERSKE mRNA V B16F10 IN CT26 CELIČNI LINIJI

Ajda Medved<sup>1,2</sup>, Urša Lamprecht Tratar<sup>1,3</sup>, Matjaž Peterka<sup>4</sup>, Urban Bezeljak<sup>4,5</sup>, Nastja Štemberger<sup>4</sup>, Tjaša Marušič<sup>5,6</sup>, Maja Čemažar<sup>1,7</sup>

<sup>1</sup> Onkološki inštitut Ljubljana, Ljubljana, Slovenija

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

<sup>3</sup> Univerza v Ljubljani, Veterinarska fakulteta, Ljubljana, Slovenija

<sup>4</sup> COBIK, Ajdovščina, Slovenija

<sup>5</sup> Sferogen d.o.o., Ajdovščina, Slovenija

<sup>6</sup> Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Ljubljana, Slovenija

<sup>7</sup> Univerza na Primorskem, Fakulteta za vede o zdravju, Izola, Slovenija

Interlevkin 12 (IL-12) je imunostimulatorni citokin, ki ima potencial za zdravljenje raka v kliniki, saj je vključen v različne mehanizme, ki izničujejo učinek imunosupresivnega tumorskega mikrookolja. Na sistemski ravni je IL-12 toksičen, zato je glavni interes predkliničnih raziskav razvoj dostavnih metod, kot je genski elektroprenos (GET), s katerim dosežemo optimalno koncentracijo IL-12 v tumorskem mikrookolju in hkrati zmanjšamo sistemsko izpostavljenost. Prvi korak pri uvajanju terapije v klinično prakso je neklinična *in vitro* ocena terapevtske molekule in metode dostave, ki služi kot osnova za nadaljnje *in vivo* testiranje. Plazmidna DNA (pDNA), ki kodira IL-12, se je že izkazala za skladno z Evropskimi smernicami glede kakovosti medicinskih izdelkov in je v kombinaciji z GET primerna za klinična testiranja (1). Genska terapija na osnovi mRNA služi kot alternativna metoda terapijam na osnovi pDNA. mRNA transkripti imajo v nasprotju s pDNA višjo stopnjo transfekcije, nižjo toksičnost in ne zahtevajo vstopa v jedro, saj prepis v protein poteka v citoplazmi, kar zmanjša tudi tveganje za insercijsko mutagenozo. mRNA molekule so bile zaradi dovzetnosti za hidrolitično razgradnjo predhodno obravnavane kot neprimerne za terapevtsko uporabo. Stabilnost molekul je zelo pomembna za nadzor genske ekspresije in jo je mogoče izboljšati s številnimi kemijskimi modifikacijami, kot so dodajanje kape (capping), optimizacija zaporedja in podaljšanje poliA repa (2). Namen naše raziskave je bil določiti učinkovitost transfekcije mRNA GET ter viabilnost melanomskih (B16F10) in karcinomskih (CT26) celic po mRNA GET. V ta namen smo zasnovali reportersko mRNA molekulo, ki kodira zeleno flourescirajoči protein (EGFP mRNA), s podaljšanim poliA repom in N7-metilgvanozinom (Cap 0) na 5'-koncu. EGFP mRNA v različnih koncentracijah (0,06, 0,125, 0,25, 0,5 in 1 mg/ml) smo dodali celicam in preko ploščate elektrode razmika 2 mm dovajali pulze, generirane z generatorjem električnih pulzov CLINIPORATOR® (IGEA S.P.A., Carpi, Italija). S pomočjo pretočne citometrije (FACSCanto II pretokovni citometer (BD Biosciences)) smo določili učinkovitost transfekcije ob različnih časovnih točkah (4 do 168 ur) po GET. Viabilnost celic je bila določena 3 dni po GET s PrestoBlue™ Cell Viability Reagent (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA ZDA) testom. Rezultati transfekcijske učinkovitosti in viabilnosti celic po GET z reportersko mRNA so pokazali najvišji delež transfekcije in najdaljše izražanje zelenoflourescirajočega proteina pri koncentraciji 0,5 µg/µl, ki pa ni imela velikega vpliva na viabilnost celic. Ti rezultati tako postavljajo osnovo za nadaljnje *in vitro* in *in vivo* poskuse s terapevtsko mRNA.

p13

## Zahvala

Raziskava je potekala v okviru raziskovalnega programa P3-0428 in raziskovalnega projekta L3-50111, ki ju financira ARIS.

## Literatura

1. Kos S, et al. *Pharmaceutics*. 2021; 13,10 1739.
2. Boo SH, et al. *Expert Mol Med*. 2020;52:3.

## PERSONALIZIRANO ZDRAVLJENJE ADENOKARCINOMA TREBUŠNE SLINAVKE

### Tanja Mesti

*Sektor internistične onkologije, Onkološki inštitut Ljubljana, Ljubljana, Slovenija  
Medicinska fakulteta, Univerza v Ljubljani, Ljubljana, Slovenija*

Duktalni adenokarcinom trebušne slinavke (PDAC) je smrtonosen pri 88 % bolnikov. Gre za rakavo slabo odzivno na vse vrste zdravljenja, z visoko stopnjo napredovanja in smrtnosti. Vendar pa je zadnje desetletje raziskovalnih dosežkov prineslo pomemben napredek na področju sistemskega zdravljenja PDAC, predvsem za podskupine bolnikov s potencialnimi tarčami, kot so mutacije v BRCA1, BRCA2, KRAS<sup>G12C</sup>, NTRK fuzije in RET fuzije ter visoko imunogeni tumorji z visokim bremenom mutacij, oz z deficitom v mehanizmu za popravilo pomanjkljivosti (mismatch repair deficiency) ali tumorji z visoko mikrosatelitsko nestabilnostjo (MSI-H), pri katerih je pričakovana učinkovitost imunoterapije zaviralcev kontrolnih točk (ZIKT). Dobrobit sodobnega individualiziranega pristopa v sistemskega zdravljenju je pridobitev sodobne tehnologije analize molekularnih lastnosti tumorjev – sekvenciranje naslednje generacije (NGS), in predvsem pri bolnikih z inoperabilnim ali razsejanim PDAC. Veliko se dogaja tudi na področju neoadjuvantnega zdravljenja PDAC in podatki študije faze 1 pri bolnikih po operaciji PDAC zdravljenjih najprej z mRNA cepivom cevumeran in subsekventno z ZIKT anti PD-L1 avelumabom ter standardnim trojčkom kemoterapije mFOLFIRINOXom so pokazali, da pri bolnikih pri kateri je bil dosežen dober odziv na cepljenje je čas do ponovitve bolezni bil daljši.

Personaliziran pristop sistemskega zdravljenja na podlagi bazalnih oz molekularnih lastnosti PDAC v primerjavi s klasičnim pristopom, kaže svetlejšo perspektivo z boljšim odzivom in daljšim preživetjem bolnikov s PDAC.

## REGULATORY SCIENCE CONTRIBUTION TO PATIENTS EARLY ACCESS TO ONCOLOGY MEDICINAL PRODUCTS AND MEDICAL DEVICES IN THE EU

Irena Milobratović

*Indaea OÜ*

Every medicine intended for patients in the EU must have marketing authorisation issued by the European Medicines Agency, or by the National Medicines Agencies and that way become eligible to come to the market in all or particular member state/s in the EU, respectively.

New oncology medicinal products are regulated by Regulation (EC) No 726/2004 or centralized procedure regulation, under its mandatory scope. However, to foster patients' early access to these medicines EMA creates different procedures such as accelerated assessment of a marketing application authorisation, a conditional marketing authorization, or ensures the availability of unauthorized medicines to patients through national patients' access programs even before a marketing authorization. To optimize the use of the above regulatory tools, EMA has also launched specific procedures, such as the PRIME scheme to support early and enhanced scientific and regulatory dialogue between developers and regulators, also has empowered scientific advice/clinical trial protocol assistance including the parallel dialog with Health Technology Application (HTA) bodies, Innovation Task Force (ITF), Micro- and Small- and Medium-sized-Enterprise (SME) Office Briefing meetings.

This poster intends to address all options, in terms of regulatory & development strategy, timelines, quality, non-clinical & clinical data, and dossiers completeness and incentives that EMA provides to developers and applicants in their journey to bringing the new oncology products to the EU market and have them as early as possible available to the patients in need.

**p15**

# UČINKOVITOST KOMBINIRANEGA ZDRAVLJENJA KEMOTERAPIJE IN ABLATIVNE RADIOTERAPIJE (SBRT) V PRVEM REDU ZDRAVLJENJA LOKALNO NAPREDOVALEGA INOPERABILNEGA RAKA TREBUŠNE SLINAVKE - PREDSTAVITEV PROTOKOLA RAZISKAVE

Janja Ocvirk

*Onkološki inštitut Ljubljana, Ljubljana, Slovenija*

Rak trebušne slinavke ima še vedno slabo prognozo ne glede na zdravljenje. Nove kombinirana sistemska terapija je omogočila daljša srednje preživetja, ki so lahko do dve leti in več. Novi podatki retrospektivnih študij kažejo, da se preživetje podaljša še bolj, ko sistemski terapiji sekvenčno priključimo lokalno zdravljenje z ablativno radioterapijo oz stereotaktično radioterapijo (SBRT). SBRT omogoča natančno aplikacijo visoke doze obsevanja na tumor oz. tarčo z 1 do nekaj frakcijami. Zaradi svojega ablativnega učinka preseže radiorezistenco karcinoma pankreasa in posledično omogoča odlično lokalno kontrolo, ki je nad 80% po 1 letu. V kombinaciji s kemoterapijo dosežemo dvoletno lokalno kontrolo pri tretjini bolnikov in pri skoraj 40% dvoletno preživetje. Podatki kažejo, da je zdravljenje s SBRT dovolj varno tudi za zdravljenje bolnikov z inoperabilnim rakom trebušne slinavke starejših od 80 let.

Na osnovi omenjenih podatkov smo zasnovali prospektivno nerandomizirano raziskavo pri bolnikih z inoperabilnim rakom trebušne slinavke zdravljenimi z kemoterapijo v prvi liniji na Onkološkem Inštitutu Ljubljana z naslednimi hipotezami:

1. Odgovor na sekvenčno zdravljenje s SBRT po inicijalni KT pri bolnikih z napredovalim inoperabilnim rakom trebušne slinavke je boljši v primerjavi s dosedanjimi podatki iz mednarodnih kliničnih raziskav pri bolnikih zdravljenih le s KT.
2. Sekvenčno zdravljenje s SBRT in inicijalni KT pri bolnikih z napredovalim inoperabilnim rakom trebušne slinavke ima sprejemljiv varnostni profil
3. Pri bolnikih z dobrim odgovorom na sekvenčno zdravljenje s SBRT in inicijalno KT bolezen lahko postane resektabilna

V raziskavo od septembra 2021 vključujemo bolnike starejše od 18 let, z lokalno napredovalim inoperabilnim rakom trebušne slinavke. Bolniki so zdravljeni s SBRT RT in inicijalno KT v prvi liniji na Onkološkem inštitutu Ljubljana. Predvidevamo, da bomo vključili 40 bolnikov. Podatki bolnikov bodo anonimizirani - datum rojstva, spol, datum diagnoze, stanje zmogljivosti ob uvedbi zdravljenja, tumorski markerji – LDH, Ca19-9, odgovor na zdravljenje, čas zdravljenja, neželeni učinki zdravljenja. Izključitveni kriteriji: Bolniki z razsejanim rakom trebušne slinavke ter bolniki z lokalno napredovalim inoperabilnim rakom trebušne slinavke, ki so že prejeli eno ali več redov sistemskega zdravljenja.

Po oceni stanja zmogljivosti po ECOG/WHO bodo bolniki s PS WHO 0-1 zdravljeni s trojčkom KT s fluoropirimidinom, oksaliplatinom in irinotekanom v 46h infuziji vsaka dva tedna ob podpori z rastnimi dejavniki (modificirani FOLFIRINOX), bolniki s PS WHO > 2 bodo zdravljeni z gemcitabinom in nab-paklitakselom v tedenskih odmerkih 1,8 in 15 dan, nato sledi teden pavze. Slikovna evaluacija bo opravljena pred začetkom zdravljenja za zamejitev bolezni, nato po 12 tednih (CT prsnega koša in trebuha). V primeru stagnacije bolezni (SD) oz delnega odgovora (PR) na zdravljenje, bo pri bolnikih planirano zdravljenje s SBRT po že utečenem protokolu, predvidoma bodo prejeli v 5 obsevalnih odmerkov z dnevno dozo 5-10 Gy. Po končani SBRT bo bolnik ponovno opravil kontrolni CT dvojček (prsnega koša in trebuha in/ ali MRI) 8-12 tednov po končani SBRT za oceno resektabilnosti. V kolikor je bolezen resektabilna, je bolnik predstavljen kirurgu za operacijo v

UKC Maribor ali UKC Ljubljana,

V 8 tednih po končani SBRT in do slikovne ocene morebitne resektabilnosti bolnik nadaljuje s sistemsko terapijo s katero je bil zdravljen pred SBRT.

V primeru neresektabilnosti, vendar SD ali PR, bolnik nadaljuje naprej s sistemskim zdravljenjem še tri mesece, nato sledi evaluacija stanja bolezni s CT dvojčkom. Ob še vedno prisotni SD/PR nadaljuje z rednimi kontrolami pri lečečem onkologu vsaka dva meseca. Kontrolni CT dvojček se ponovi na vsaka 3 meseca. Neresektabilnost in progres bolezni sta izključitve kriterija. Bolnik bo naprej nadaljeval z novim redom kemoterapije. Srednje preživetje in preživetje do napredovanje bolezni bomo izračunali po Kapler Maierjevi metodi.

### **Zahvala**

Raziskava je potekala v okviru raziskovalnega programa P3-0321, ki ga financira Javna agencija za znanstvenoraziskovalno in inovacijsko dejavnost Republike Slovenije (ARIS).

## VZPOSTAVITEV IN KARAKTERIZACIJA MIŠJEGA TUMORSKEGA MODELA ZA RAZISKAVE S HPV POVEZANEGA RAKA GLAVE IN VRATU

Živa Pišljari, Maja Čemažar, Boštjan Markelc, Gregor Serša, Simona Kranjc Brezar, Tanja Jesenko

Onkološki inštitut Ljubljana, Ljubljana, Slovenija

Ploščatocelični karcinom ustnega predela (PKU) vključuje raka ustne votline, ustnic ter ustnega dela žrela. Eden od dejavnikov tveganja za razvoj PKU je dolgotrajna okužba z visoko tveganimi genotipi človeškega papilomavirusa (HPV, angl. human papillomavirus). Ker lahko HPV okuži le humane celice, so tumorski modeli HPV-pozitivnega PKU na imunsko odzivnih miših redki, zato je predklinično preučevanje teh vrst tumorjev oteženo. Cilj naše raziskave je bil vzpostaviti in okarakterizirati HPV-pozitivni mišji model PKU s stabilnim izražanjem onkogenov E6 in E7 HPV-16. Iz mišje celične linije PKU MOC1 smo z retrovirusno transdukcijo vzpostavili dve monoklonski HPV-pozitivni celični liniji MOC1-HPV K1 ter MOC1-HPV K3, v katerih smo potrdili izražanje E6 in E7 na RNA in proteinskem nivoju. Na *in vitro* nivoju so se celične linije razlikovale v morfologiji ter hitrosti celične migracije. Določili smo tudi radioobčutljivost *in vitro* ter *in vivo*, ter z imunofluorescenčnim barvanjem zaledenelih tumorskih rezin opredelili razlike v tumorskem mikrookolju. Preučevali smo prisotnost hipoksije (EF5), proliferacije (EdU), ožiljenosti (CD31) ter infiltracijo CD4<sup>+</sup> in CD8<sup>+</sup> celic T in makrofagov (F4/80). Na *in vitro* nivoju nismo zaznali razlik v radioobčutljivosti celičnih linij. *In vivo* pa je bila po obsevanju z enkratno dozo 15 Gy radioobčutljivost tumorskega modela MOC1-HPV K1 večja, kar se je odražalo v daljšem zaostanku v rasti tumorjev v primerjavi z modeloma MOC1 in MOC1-HPV K3. V tumorskem modelu MOC1-HPV K1 smo zaznali tudi nižji nivo hipoksije ter večji delež proliferajočih celic, kar nakazuje na možen mehanizem povečane radioobčutljivosti tumorskega modela MOC1-HPV K1. Rezultati *in vitro* ter *in vivo* karakterizacije sovpadajo tudi z rezultati analize transkriptoma celičnih linij, kjer 20 najbolj obogatenih pojmov genske ontologije vključuje procese, povezane s celično migracijo in angiogenezo. Z raziskavo smo razvili mišji HPV pozitivni celični liniji PKU, ki ju lahko uporabimo za indukcijo tumorjev na imunsko odzivnih miših in nam omogočata raziskave z imunskim odzivom pogojenih pristopov zdravljenja.

### Zahvala

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

# PROGRAM PRESEJANJA IN SVETOVANJA NOSILCEM PATOGENIH RAZLIČIC, KI OGROŽAJO ZA RAKA TREBUŠNE SLINAVKE - PRIMER NOSILCEV *CDKN2A*

Vanessa Koračin <sup>1</sup>, Svetlana Novak <sup>2</sup>, Simona Hotujec <sup>3</sup>, Barbara Perić <sup>3,4</sup>

<sup>1</sup> Dermatološka ambulanta, Splošna bolnica Novo Mesto, Novo mesto, Slovenija

<sup>2</sup> Oddelek za onkološko klinično genetiko, Onkološki inštitut Ljubljana, Ljubljana, Slovenija

<sup>3</sup> Oddelek za onkološko kirurgijo; Onkološki inštitut Ljubljana, Ljubljana, Slovenija

<sup>4</sup> Univerza v Ljubljani, Medicinska fakulteta, Ljubljana, Slovenija

Rak trebušne slinavke (PANCR) je eden tistih redkih rakov s slabim preživetjem, kjer tako znanstvene raziskave kot napredek tehnologije postopoma izboljšujejo zdravljenje. Del tega napredka je tudi opredelitev družinske oblike PANCR in ukrepi namenjeni zgodnjemu odkrivanju bolezni. Predstavljen bo program presejanja in zgodnjega odkrivanja pri slovenskih nosilcih patogenih različic genov povezanih z nastankom PANCR.

V Sloveniji letno za PANCR zbolijo približno 420 oseb, pet-letno preživetje pa je zgolj 9.3 odstotno. Pri petih do desetih odstotkih bolnikov poleg dejavnikov okolja na nastanek bolezni vpliva tudi prisotnost patogene različice katerega izmed genov povezanih s PANCR. Med temi je tudi *CDKN2A* gen, katerega povezujemo sicer z družinsko obliko kožnega melanoma.

Na OI Ljubljana od leta 2001 izvajamo program presejanja in svetovanja nosilcem patogenih različic *CDKN2A*, od leta 2021 pa tudi presejanja na PANCR.

Do sedaj smo odkrili 57 nosilcev *CDKN2A*. Prihajajo iz 21 družin s pozitivno družinsko anamnezo. Pri 12 osebah je bila družinska anamneza negativna, prisotni pa so bili bodisi multipli kožni melanom, bodisi kateri od drugi raki – rak dojke. V sedmih družinah (7/21) se poleg kožnega melanoma pojavlja tudi PANCR. Najpogosteje odkrita različica *CDKN2A* v teh družinah je p.Ala148Thr. Med bolniki testiranimi zaradi potrjenega PANCR so najpogosteje odkrite patogene različice *ATM*, *BRCA* in *PALB2*.

Osebam s patogeno različico *CDKN2A* ponudimo program presejanja, ki vključuje redno slikovno diagnostiko in pregled pri gastroenterologu, v primeru sumljivih sprememb PANCR pa napotitev k hepatobiliranem kirurgu terciarnega centra. Do sedaj v sklopu presejanja slovenskih zdravih nosilcev PANCR nismo odkrili.

p18

# DOLOČANJE BAKRA IN DRUGIH ELEMENTOV V SLEDОВИH V SERUMSKIH VZORCIH BOLNIKOV RAKI BILIARNEGA TRAKTA: PREDSTAVITEV KLINIČNE RAZISKAVE

Martina Reberšek

*Onkološki inštitut Ljubljana, Ljubljana, Slovenija*

Raki biliarnega trakta (RBT) so redka in heterogena skupina rakov. Običajno jih odkrijemo v napredovali fazi, ko je bolezen neozdravljiva. Tumorski označevalci v krvi, ki jih trenutno določamo pri teh rakih, imajo omejeno diagnostično vrednost za RBT, zato nujno potrebujemo občutljive in specifične označevalce za njihovo zgodnejše diagnosticiranje. Deregulacija homeostaze elementov v sledovih je vključena v kancerogenezo različnih vrst raka, vključno z RBT. Baker, cink in železo (Cu, Zn in Fe) so med elementi v sledovih, ki so nujno potrebni za normalno delovanje človeškega organizma. Sodelujejo v številnih biokemijskih reakcijah, so kofaktorji encimov, z vezavo na specifične receptorje in transkripcijske faktorje uravnavajo pomembne biološke procese. Na njihovo koncentracijo v organizmu vplivajo številni dejavniki, kot so spol, starost, hrana, onesnaženost življenjskega okolja. Deregulacija homeostaze elementov v sledovih, tako na celičnem, kot tkivnem nivoju, je značilna za številne rake in tako lahko npr. pospeši transformacijo normalnih celic v rakave ter spremeni vnetni in protitumorski odgovor imunskih celic. Poznavanje vloge esencialnih elementov v sledovih pri raku je pomembno za razvoj sodobnih farmacevtskih in prehranskih pristopov za ponovno vzpostavitev ravnotežja elementov v sledovih v telesu. Že objavljeni rezultati sodobnih raziskav neravnovesja esencialnih elementov v sledovih kažejo na njihovo uporabnost v diagnostiki in terapiji raka. Glavni namen klinične raziskave je določitev celotne koncentracije izbranih elementov v sledovih (Cu, Zn, Fe), delež prostega bakra in bakra, vezanega na ceruloplazmin ter izotopskega razmerja med  $^{65}\text{Cu}$  in  $^{63}\text{Cu}$  v vzorcih krvnega seruma zdravih prostovoljcev in bolnikov z rakom z uporabo metod na osnovi masne spektrometrije z induktivno sklopljeno plazmo (ICP-MS). Rezultate bomo statistično ovrednotili in ocenili možnosti uporabe uporabljenih analiznih metod v diagnostiki in terapiji raka. V prospektivno, neintervencijsko, nerandomizirano klinično raziskavo bo vključenih 20 bolnikov in 20 zdravih prostovoljcev, da bi ugotovili ravni Cu, Zn in Fe v serumu ter izotopsko frakcionacijo Cu kot napovedni označevalec odgovora na sistemsko zdravljenje RBT, ki bo ocenjen z radiološko računalniško tomografijo. Novo razvite analitične metode, ki temeljijo na ICP-MS, bodo uporabljene za raziskave označevalcev na osnovi elementov v sledovih v onkologiji. V klinični raziskavi bo opravljena primerjava skupne koncentracije izbranih elementov v sledovih, deleža prostega Cu in Cu, vezanega na ceruloplazmin, ter izotopskega razmerja  $^{65}\text{Cu}/^{63}\text{Cu}$  v vzorcih seruma zdravih prostovoljcev in bolnikov z rakom, da bi zagotovili podlago za razvoj metodologije presejanja RBT in podatke o njihovi uporabnosti kot potencialnega napovednega označevalca RBT za odziv na sistemsko zdravljenje.

## Zahvala

Raziskava je potekala v okviru internega projekta, ki ga financira Onkološki inštitut Ljubljana.

# REZULTATI GENETSKEGA TESTIRANJA PRI BOLNIKIHZ ADENKARCINOMOM PANKREASA NA ONKOLOŠKEM INŠTITUTU LJUBLJANA

Ksenija Strojnik

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

Glede na podatke iz literature pri 4 do 20 % bolnikov z duktalnim adenokarcinomom pankreasa (DAP) zaznamo prisotnost zarodnih patogenih oz. verjetno patogenih različic (P/VPR) v genih, povezanih z dedno predispozicijo za raka. Genetsko testiranje pri bolnikih z DAP je pomembno za iskanje biomarkerjev za izbiro tarčnega sistemskega zdravljenja in za kaskadno testiranje krvnih sorodnikov za namen preventive.

V kohorti bolnikov z DAP smo želeli opredeliti prevalenco in spekter P/VPR v genih, povezanih z dedno predispozicijo za raka, ter oceniti pomen izvida genetskega testiranja za načrtovanje sistemskega zdravljenja.

Retrospektivo smo analizirali rezultate genetskega testiranja za zarodne P/VPR ter rezultate genotipizacije tumorjev pri bolnikih z DAP, ki so bili obravnavani na Oddelku za onkološko klinično genetiko v zadnjih 10 letih. Podatke o testiranih smo pridobili iz Državnega registra testiranih oseb iz družin obremenjenih z dednim rakom.

Od leta 2014 je genetsko testiranje za zarodne P/VPR opravilo 215 bolnikov (115 žensk in 100 moških). Število obravnavanih pomembno narašča od leta 2019 dalje. Mediana starost ob diagnozi DAP je bila 63 let (30 - 87 let). Stopnja detekcije zarodnih P/VPR je bila 17,7 % (38/215). Ugotovljene so bile P/VPR v genih *BRCA2* (12/38), *BRCA1* (8/38), *ATM* (7/38), *PALB2* (4/38), *CDKN2A* (3/38), *MLH1* (1/38), *MSH2* (1/38), *STK11* (1/38) ter homozigotni P/VPR v genu *BLM* (1/38). Deset nosilcev zarodnih P/VPR v *BRCA1* ali *BRCA2* z metastatskim DAP je prejelo tarčno terapijo z olaparibom, ena bolnica z neresektabilnim dMMR (angl. mismatch repair deficient) DAP pa pembrolizumab. Pri 35/215 bolnikih je bila opravljena tudi genotipizacija tumorja: pri 29/35 so bile ugotovljene P/VPR z možnim kliničnim pomenom, in sicer je bilo 5 zarodnih (v genih *BRCA2*, *BRCA1*, *PALB2* in *BLM*), preostale so bile somatske (najpogosteje v genih *KRAS*, *TP53* in *CDKN2A*).

Stopnja detekcije zarodnih P/VPR v največji slovenski kohorti bolnikov z DAP je visoka in primerljiva s podatki v mednarodni literaturi. Genetsko testiranje za zarodne P/VPR ima velik pomen za izbiro sistemskega tarčnega zdravljenja, kar je razvidno tudi iz naraščujočega števila obravnavanih od leta 2019 dalje. Glede na podatke o incidenci raka pankreasa iz Registra raka Republike Slovenije je delež genetsko testiranih še vedno nizek, o čemer poročajo tudi genetski centri v tujini. Čeprav niso vsi bolniki z DAP kandidati za sistemsko tarčno terapijo, pa ima lahko njihov rezultat genetskega testiranja veliko pomen za testiranje krvnih sorodnikov za namen personaliziranega spremljanja pri nosilcih.

## Literatura

1. K. Strojnik. Presejanje za raka trebušne slinavke pri bolj ogroženih – pomen presejanja v varnem raziskovalnem okolju. Personalizirana preventiva raka, XXXI. seminar "In memoriam dr. Dušana Reje": Ljubljana, 7. december 2023;77-86.
2. Controy T, et al. Pancreatic cancer: ESMO Clinical Practice Guideline for diagnosis, treatment and follow-up. *Ann Oncol.* 2023 Nov;34(11):987-1002.
3. Crowley F, et al. Adherence to NCCN Genetic Testing Guidelines in Pancreatic Cancer and Impact on Treatment. *Oncologist.* 2023;28(6):486-493.

p20

## VPLIV RADIOTERAPIJE NA AKTIVACIJO TUMORSKIH ENDOTELIJSKIH CELIC

Iva Šantek, Tim Božič, Gregor Serša, Boštjan Markelc

Onkološki inštitut Ljubljana, Ljubljana, Slovenija

Aberantno tumorsko žilje povzroča nastanek hipoksičnih območij, ki so odporna na radioterapijo (RT). Obsevanje ne cilja samo rakavih celic, ampak tudi mikrookolje tumorja, vključno s tumorskim žiljem. Poleg apoptoze tumorskih endotelijskih celic (TEC) lahko obsevanje povzroči tudi normalizacijo/preoblikovanje žil ali aktivacijo TEC, kar lahko zmanjša hipoksijo in poveča infiltracijo imunskih celic. Še vedno pa je odziv tumorskega žilja in TEC na obsevanje slabo poznan. V ta namen želimo natančneje določiti učinek obsevanja na aktivacijo TEC in normalizacijo tumorskega žilja. V naši raziskavi smo pokazali, da *in vitro* obsevanje človeških endotelijskih celic HUVEC, EA.hy926 in Hulec5a ter mišjih endotelijskih celic bEnd.3, 2H11 in SVEC4-10 z enkratnimi odmerki sevanja od 0 do 10 Gy povzroči od doze odvisno zmanjšanje proliferacije in povečanje smrti endotelijskih celic (EC). Transkriptomaska analiza celic HUVEC, obsevanih z enkratno dozo 2 ali 5 Gy, in TEC, izoliranih iz tumorjev mišjega karcinoma debelega črevesa MC38 po obsevanju z enkratno dozo 15 Gy je pokazala povečano izražanje genov sodelujočih v imunskem odzivu in aktivaciji EC ter zmanjšano regulacijo celičnega cikla. Ravno tako je prostorska transkriptomaska analiza podkožnih tumorjev karcinoma debelega črevesa CT26 po frakcioniranem obsevanju s 5 x 5 Gy pokazala povečano izražanje genov sodelujočih v imunskem odzivu in aktivaciji EC. Opažene spremembe na transkripcijskem nivoju so bile nato potrjene z imunohistokemičnim in imunofluorescenčnim barvanjem na *in vivo* in *in vitro* nivoju. Opažene spremembe na EC *in vitro* ter mišjih TEC izoliranih iz mišjih tumorjev smo nato s prostorsko transkriptomiko in imunohistokemičnim barvanjem potrdili na vzorcih tumorjev pacientov, ki so prejeli neoadjuvantno (predoperativno) radioterapijo (RT), pri čemer je bil režim obsevanja 5 x 5 Gy. Uporabljeni so bili vzorci tumorjev bolnikov kliničnega TNM stadija: cTNM stadij II in cTNM III, ki so bili fiksirani v formalinu in vklopljeni v parafinu (FFPE). Pri vsakem pacientu je bil vključen vzorec bioptičnega vzorca tumorja pred RT, ter vzorec tumorja iz resekcije rektuma po RT. Odziv EC na obsevanje trenutno raziskujemo tudi na modelu žilja na čipu. V naši raziskavi smo pokazali, da obsevanje zmanjšuje rast in preživetje EC. Poleg tega, vpliva tudi na transkriptom EC in TEC, kar vodi v njihovo aktivacijo ter posledično povečano infiltracijo imunskih celic v tumor, s čimer se lahko izboljša protitumorski imunski odziv.

### Zahvala

Raziskava je potekala v okviru raziskovalnega projekta J3-2529, ki ga financira Javna agencija za znanstvenoraziskovalno in inovacijsko dejavnost Republike Slovenije (ARIS).

## KROŽNE RNA IN HEPATOCELULARNI KARCINOM

Hana Trček<sup>1</sup>, Benjamin Bajželj<sup>1</sup>, Rok Razpotnik<sup>1</sup>, Blaž Trotovšek<sup>2</sup>, Arpad Ivanecz<sup>3</sup>, Miha Petrič<sup>2</sup>, Mihajlo Đokić<sup>2</sup>, Boštjan Plešnik<sup>2</sup>, Irena Plahuta<sup>3</sup>, Martin Zaplotnik<sup>4</sup>, Linda Cellner<sup>4</sup>, Rado Janša<sup>4</sup>, Robert Vidmar<sup>5</sup>, Marko Fonović<sup>5</sup>, Uršula Prosenc Zmrzljak<sup>6</sup>, Petra Hudler<sup>1</sup>, Damjana Rozman<sup>1</sup>, Tadeja Režen<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Univerza v Ljubljani, Medicinska fakulteta, Inštitut za biokemijo in molekularno genetiko, Center za funkcijsko genomiko in biočipe, Ljubljana, Slovenija

<sup>2</sup> Univerzitetni klinični center Ljubljana, Kirurška klinika, Klinični oddelek za abdominalno kirurgijo, Ljubljana, Slovenija

<sup>3</sup> Univerzitetni klinični center Maribor, Klinični oddelek za splošno in abdominalno kirurgijo, Maribor, Slovenija

<sup>4</sup> Univerzitetni klinični center Ljubljana, Interna klinika, Klinični oddelek za gastroenterologijo, Ljubljana, Slovenija

<sup>5</sup> Inštitut Jožef Štefan, Odsek Biokemija, Molekularna in Strukturna Biologija, Ljubljana, Slovenija

<sup>6</sup> BIA Separations CRO, Labena d.o.o., Ljubljana, Slovenija

Hepatocelularni karcinom (HCC) je najpogostejša oblika primarnega raka jeter in predstavlja enega glavnih vzrokov z rakom povezanih smrti na globalni ravni. S trenutno diagnostiko (slikovne tehnike, biopsija jeter, krvni  $\alpha$ -fetoprotein) ta tip raka pogosto odkrijemo v že napredovanem stadiju. V zadnjem desetletju so krožne RNA (circRNA) prišle v ospredje raziskav na področju raka. Večina študij o izražanju circRNA v tumorjih HCC v primerjavi z oddaljenim netumorskim tkivom, ki so trenutno na voljo v podatkovni zbirki Gene Expression Omnibus, je bila izvedena na vzorcih pacientov, zdravljenih v kitajskih zdravstvenih ustanovah. V teh regijah je okužba s hepatitis B virusom za razliko od zahodnega sveta še vedno glavni dejavnik tveganja za razvoj HCC. V povzetku poročamo o karakterizaciji krožne RNA hsa\_circ\_0062682 in ocenjujemo njen diagnostični potencial na pacientih, zdravljenih v slovenskih zdravstvenih ustanovah Univerzitetnega kliničnega centra Ljubljana in Maribor (UKC LJ, UKC MB) (1) ter transkriptomu circRNA 10 pacientov z uporabo metodologije sekvenciranja dolgih branj tehnologije Oxford Nanopore.

p22

Z analizo že objavljenih podatkov, pridobljenih z uporabo mikromrež, smo identificirali 38 (32 nadizraženih, 6 znižano izraženih) spremenjeno izraženih circRNA v tumorjih HCC. Izbrani kandidatni circRNA hsa\_circ\_0062682 smo potrdili onkogeni potencial z uporabo funkcionalnih testov na modelnih celičnih linijah HCC. S pomočjo biotiniliranih oligonukleotidov v kombinaciji z masno spektrometrijo ter RNA imunoprecipitacijo smo potrdili vezavne partnerje, med drugim z YBX1, znanim onkogenom. Zanimivo je dognanje, da je izražanje hsa\_circ\_0062682 v naši kohorti pacientov, ki imajo metabolno in z alkoholom povezavo etiologijo bolezni, obratno kot v pacientih, zdravljenih v kitajskih ustanovah. Razlike v izražanju hsa\_circ\_0062682 med kohortama nakazujejo na možen vpliv etiologije in molekularnih podtipov HCC pacientov, vključenih v študijo. Z metodama RT-qPCR in ddPCR smo določili nivo hsa\_circ\_0062682 v plazmi in tako ocenili njen diagnostični potencial neinvazivnega biomarkerja.

Z uporabo tehnologije sekvenciranja dolgih branj Nanopore smo ovrednotili transkriptom circRNA tumorskega in oddaljenega netumorskega tkiva 10 pacientov s primarnim HCC, zdravljenih v UKC LJ in UKC MB. Knjižnico circRNA smo pripravili po modificiranem protokolu Rahimi in sod. (2). V prvem koraku smo uporabili biotinilirane DNA probe proti ribosomalni RNA, čemur je sledila razgradnja linearnih RNA s pomočjo encima RNaza R. Tako pridobljen nabor obogateneh circRNA smo linearizirali, prepisali in pomnožili po Nanopore protokolu »cDNA-PCR Sequencing Kit« (SQK-PCS111). Z opisanim protokolom smo skupno sekvencirali 323 milijov branj, ki so presegle določeno mejno vrednost kvalitete (Q score  $\geq$  9). Med temi smo identificirali 21261 molekul circRNA, katerih mesta povratnega spoja sovpadajo bodisi z eksonskimi mejami ali pa so ta poročana v prostodostopnih podatkovnih zbirkah. Znotraj teh 21261 circRNA branj smo identificirali 9672 različnih mest povratnega spoja. Z metodo RT-qPCR smo na 60 vzorcih RNA zaenkrat potrdili 7 circRNA, ki se v tumorskem tkivu spremenjeno izražajo v primerjavi z okoliškim netumorskim

tkivom. V prihodnje bomo izražanje circRNA ovrednotili na večjem številu FFPE vzorcev slovenskih pacientov. Izbranim kandidatnim circRNA bomo ocenili onkogeno oz. tumor supresorsko vlogo na modelnih celičnih linijah HCC. S tem upamo, da bomo pripomogli k razumevanju izražanja circRNA pri patologiji HCC, predvsem na evropski populaciji pacientov.

### Literatura

1. Razpotnik R, Vidmar R, Fonović M, Rozman D, Režen T. Circular RNA hsa\_circ\_0062682 Binds to YBX1 and Promotes Oncogenesis in Hepatocellular Carcinoma. *Cancers*. 2022;14(18):4524.
2. Rahimi K, Venø MT, Dupont DM, Kjems J. Nanopore sequencing of brain-derived full-length circRNAs reveals circRNA-specific exon usage, intron retention and microexons. *Nat Commun*. 2021;12(1):4825.

## EPIDEMIOLOGIJA RAKA TREBUŠNE SLINAVKE

Vesna Zadnik

*Onkološki Inštitut Ljubljana, Ljubljana, Slovenija*

Rak trebušne slinavke (TS) sodi med najbolj smrtonosne vrste raka. Hkrati se njegova incidenca v vsem razvitem svetu strmo povečuje. V tem povzetku predstavljamo podatke o bremenu raka TS v Sloveniji, Evropi in svetu, ki temeljijo na informacijah zbranih v populacijskih registrih raka. V zadnjem delu podajamo tudi kratek pregled znanih in možnih dejavnikov tveganja za razvoj raka TS.

Z več kot pol milijona novimi primeri leta 2022 je rak TS 12. najpogostejši rak v svetu; več kot polovica novih primerov se pojavi v visoko ali zelo visoko razvitih državah. Razlike znotraj Evrope niso tako izrazite; najvišje grobe incidenčne stopnje so bile leta 2022 zabeležene na Finskem, v Italiji in v Nemčiji (več kot 25/100.000), najnižje (manj kot 15/100.000) pa na Irskem in v Luksemburgu. Znano je, da lahko na incidenco raka TS poleg dejavnikov tveganja vpliva tudi dostopnost do zdravstvene oskrbe. Incidenca raka TS naj bi se v naslednjih dveh desetletjih povečala za več kot 60 %, pri čemer bo rast bolj strma v manj razvitih območjih. Ocenjeno je bilo, da je leta 2022 zaradi raka TS umrlo 467.000 oseb kar postavlja rak TS na 6. mesto po umrljivosti med vsemi raki. Na globalni ravni se je število nezmožnosti prilagojenih let življenja (DALY) zaradi raka TS podvojilo in sicer s 4,4 milijona v letu 1990 na 9,1 milijona v letu 2017.

V Sloveniji je v obdobju 2016-2020 povprečno letno za rakom TS zbolelo 423 oseb (218 moških in 205 žensk), umrlo pa 396 (202 moških in 194 žensk). Rak TS tako sodi med deset najpogostejših rakov v slovenski populaciji. Med nami je konec leta 2020 živelo 579 oseb, ki so kadarkoli v življenju imeli diagnozo raka TS (prevalenca). Z rakom TS bo do 75. leta v slovenski populaciji zbolele vsaka stota oseba. Breme raka TS se s časom povečuje: groba incidenčna stopnja raste za 2,3 odstotka letno, groba umrljivostna stopnja pa za 1,4 odstotka. Rak TS v 95 % vznikne v eksokrinem delu TS, dve tretjini teh rakov se pojavi v glavi TS. Duktalni adenokarcinom, ki predstavlja več kot 90 % vseh rakov TS, je najpogostejša in hkrati najbolj agresivna oblika raka TS. Histološko potrditev tumorja ima le dve tretjine zbolelih. Rak TS se začne pojavljati v odraslem obdobju, bolezen pa je pogostejša pri starejših; več kot 60 % bolnikov je ob diagnozi starejša od 70 let. Več kot polovica bolnikov je ugotovljena v razsejani obliki bolezni, le 10 % primerov je diagnosticirana v omejenem stadiju. Manj kot 3 % bolnikov ob diagnozi stadija nima določenega.

Mednarodna raziskava Concord-3, v kateri so proučevali preživetje bolnikov z rakom zbolelih med letoma 2000 in 2014, kaže, da so prav pri bolnikih z raki TS preživetja med vsemi pogostimi raki najnižja; povprečno petletno preživetje je manj kot 7 %. Ključni prognostični dejavnik je stadij ob diagnozi; enoletno preživetje pri tistih, ki so bili diagnosticirani v zgodnji fazi, je šestkrat višje kot enoletno preživetje pri tistih, diagnosticiranih v četrti fazi. Zelo pomembna je tudi starost ob diagnozi. Študija Huang in sod. je primerjala preživetje po stadijih in starosti bolnikov v štirih evropskih državah (Norveška, Nizozemska, Belgija in Slovenija) ter Združenih državah Amerike. Rezultati kažejo, da je triletno preživetje bolnikov s stadijem I–II, ki so bili ob diagnozi mlajši od 60 let, 20–34 %, pri bolnikih, starih 60–69 let, 14–25 % in pri bolnikih, starejših od 70 let, 9–13 %. Pri bolnikih s stadijem III–IV ob diagnozi se triletna preživetja gibljejo med 2–5 % za mlajše od 60 let do 1 % pri starejših od 70 let.

Ker učinkovitih metod presejanja za raka TS ni, je v zmanjševanju bremena tega raka najpomembnejša primarna preventiva. Med znane ali potencialne nevarnostne dejavnike sodijo kajenje, kronični pankreatitis, debelost, sladkorna bolezen, prehrana bogata z mesom, čezmerno pitje alkoholnih pijač in nekateri genetski dejavniki. Zaradi naraščajočega trenda debelosti v razvitem svetu je pričakovati v prihodnje nadaljevanje rasti števila obolelih z rakom trebušne slinavke.

p23

## VLOGA CITOPATOLOGIJE PRI DIAGNOSTIKI RAKA TREBUŠNE SLINAVKE

Margareta Žlajpah<sup>1</sup>, Damjana Cimerman<sup>1</sup>, Ulrika Klopčič<sup>1</sup>, Darko Siuka<sup>2</sup>, Andrej Gruden<sup>2</sup>, Jan Drnovšek<sup>2,3</sup>, Margareta Strojman Fležar<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Univerza v Ljubljani, Medicinska fakulteta, Ljubljana, Slovenija

<sup>2</sup> Univerzitetni klinični center Ljubljana, Klinični oddelek za gastroenterologijo, Ljubljana, Slovenija

<sup>3</sup> Univerza v Ljubljani, Medicinska fakulteta, Katedra za interno medicino, Ljubljana, Slovenija

V zadnjih dveh desetletjih se je endoskopsko ultrazvočno vodena aspiracijska biopsija s tanko iglo (EUZ-ABTI) razvila v nepogrešljivo diagnostično metodo za opredelitev in citopatološko verifikacijo lezij, ki ležijo vzdolž zgornjega ali spodnjega dela prebavnega trakta (požiralnik, želodec, dvanajstnik, rektum) ali v njegovi neposredni okolici, predvsem za opredelitev lezij trebušne slinavke. EUZ-ABTI je minimalno invazivna preiskava, ki lahko z visoko specifičnostjo potrdi diagnozo raka trebušne slinavke, pri čemer so zapleti preiskave redki.

Poleg samega tehnološkega napredka endoskopskega ultrazvoka in razvoja metode EUZ-ABTI k uspešnosti verifikacije lezij trebušne slinavke pomembno prispeva prisotnost citopatologa, ki neposredno ob bolniku in preiskovalcu opravi hitro citopatološko oceno vzorca ob odvzemu tkiva (angl. rapid on site evaluation, ROSE). S tem se uspešnost pridobitve ustreznega, t.j. diagnostičnega citološkega vzorca ob prisotnosti citopatologa in hitre ocene vzorca ob odvzemu po podatkih v literaturi poveča za 30 % v primerjavi s klasično EUZ-ABTI, kjer citopatolog ni navzoč (1).

Ob odvzemu vzorca z EUZ-ABTI citopatolog običajno naredi dva direktna razmaza; enega izmed njiju takoj pregleda pod mikroskopom. Naloga citopatologa je, da z mikroskopskim pregledom opredeli, ali so v vzorcu prisotne diagnostične celice, oceni celularnost vzorca in trižira vzorec za morebitne dodatne diagnostične preiskave.

Oddelek za citopatologijo Inštituta za patologijo Medicinske fakultete v Ljubljani že 14 let izjemno uspešno sodeluje s Kliničnim oddelkom za gastroenterologijo Univerzitetnega kliničnega centra Ljubljana. Prisotnost citopatologa in hitra citopatološka ocena vzorca ob odvzemu pri EUZ-ABTI najrazličnejših indikacij je postala rutinska praksa. Naša analiza vseh vzorcev lezij trebušne slinavke, odvzetih z EUZ-ABTI, je pokazala, da je bil delež nediagnostičnih biopsij manjši od 10 % in je tako nižji od svetovnega povprečja (12 %) (1).

### Literatura

1. IAC-IARC-WHO Joint editorial board. WHO reporting system for pancreaticobiliary cytopathology. 1 ed: International Agency for Research on Cancer 2022.

# MOLEKULA DEBIO 1143 KOT POTENCIALNA MOLEKULA ZA POVEČANJE UČINKOVITOSTI ELEKTROKEMOTERAPIJE PRI ZDRAVLJENJU RAKOV GLAVE IN VRATU

Katarina Žnidar<sup>1</sup>, Veronika Škrjanc<sup>3</sup>, Tanja Jesenko<sup>1,2</sup>, Gregor Serša<sup>1,4</sup>,  
Maja Čemažar<sup>1,5</sup>

<sup>1</sup> Onkološki inštitut Ljubljana, Oddelek za eksperimentalno onkologijo, Ljubljana, Slovenija

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

<sup>3</sup> Wageningen University and Research, Wageningen, Nizozemska

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

<sup>5</sup> Univerza na Primorskem, Fakulteta za vede o zdravju, Izola, Slovenia

Rak glave in vratu (RGV) je bil leta 2018 osmi najpogostejši rak na svetu (890.000 novih primerov in 450.000 smrti). Zdravljenje RGV se razlikuje glede na stopnjo bolezni, anatomsko mesto in kirurški dostop. HPV pozitiven RGV ima boljše splošno preživetje. Povečanje ozaveščenosti in diagnosticiranje orofaringealnega karcinoma, povezanega s humanim papiloma virusom (HPV), skupaj s HPV negativnimi RGV, spreminjajo razumevanje te bolezni, njenega zdravljenja in napovedi za bolnike. Lokalno napredovana bolezen RGV ima visoko tveganje za lokalno ponovitev (15 do 40 %) in oddaljene metastaze s slabo prognozo (5-letno skupno preživetje, < 50 %). Multimodalni pristopi so v zadnjih dveh desetletjih izboljšali stopnjo ozdravitve. Elektrokemoterapija (EKT) je ena od možnosti, ki pri zdravljenju ohranja funkcionalne strukture in se že uporablja pri bolnikih z lokalno napredovalo boleznijo RGV. Za nadaljnje povečanje učinkovitosti EKT lahko zdravljenju dodamo nove molekule, kot je DEBIO 1143, ki bi hipotetično še povečal učinkovanje EKT.

p25

Molekula DEBIO 1143 (AT-406, SM-406, Xevinapant) je v kombinaciji z radioterapijo in kemoterapijo obetavno novo zdravljenje za rake glave in vratu. DEBIO 1143 povzroči apoptozo tumorskih celic z blokado inhibitorjev apoptoznih proteinov (IAP), kar vodi do izboljšanja učinkovitosti radioterapije in kemoterapije. IAP uravnavajo apoptozo in veljajo za del zadnje obrambne linije rakavih celic pred celično smrtjo. IAP so močno izraženi pri različnih vrstah raka, vključno s ploščatoceličnim karcinomom glave in vratu (SCCHN), kjer se domneva, da igrajo pomembno vlogo pri odpornosti rakavih celic na zdravljenje. Terapevtski potencial antagonist zaviralca apoptoznih proteinov DEBIO1143 v kombinaciji z elektrokemoterapijo smo ocenili na HPV pozitivni in HPV negativni celični liniji mišjega oralnega karcinoma (MOC1). Za EKT smo uporabili različne koncentracije bleomicina (BLM) in cisplatina (CDDP), ki imata različne načine delovanja in vodita do različnih vrst celične smrti. Preživetje celic smo določili s pomočjo testa klonogenosti in s testom redukcije resazurina, kjer smo opazili povečanje učinkovitosti terapije v kombinaciji z molekulo DEBIO 1143, tako pri HPV pozitivni, kot HPV negativni celični liniji MOC1.

## Zahvala

Raziskava je potekala v okviru raziskovalnega projekta J3-50108, ki ga financira Javna agencija za znanstvenoraziskovalno in inovacijsko dejavnost Republike Slovenije (ARIS).



# INDEKS AVTORJEV

---

# INDEKS AVTORJEV

## A

Ampatzidou Mirella 48  
AvramovaBoryana 48

## B

Badovinac David 42, 46  
Bajželj Benjamin 65  
Bezeljak Urban 55  
Blatnik Ana 43  
Blatnik Olga 43  
Boltežar Lučka 16, 20  
Božič Tim 51, 54, 64  
Breznik Barbara 37, 47  
Buček Simon 50

## C

Cazzato Monica 51  
Cellner Linda 65  
Cimerman Damjana 68  
Colita Anca 48

## Č

Čekić Zorica 50  
Čemažar Maja 29, 51, 53, 54, 55, 60, 69

## D

de Marco Ario 54  
Dirnhofer Stefan 20  
Drnovšek Jan 68

## Đ

Đokić Mihajlo 65

## E

Erdélyi Dániel J 48  
Erzar Eva 16, 20

## F

Fonović Marko 65  
Fon Tacer Klementina 47

## G

Gašljević Gorana 16, 20, 50  
Gjidera Mojca 50  
Gjorgoska Marija 44  
Glas Ivka 45  
Gobec Stanislav 32, 37  
Grašič Kuhar Cvetka 29  
Grassi Gabriele 51  
Grčar Kuzmanov Biljana 16  
Gregorič Brigita 52  
Gruden Andrej 68

## H

Hadžialjević Benjamin 46  
Hazar Volkan 48  
Hotujec Simona 61  
Hudler Petra 65

## I

Irenej Pečan Luka 24  
Ivanecz Arpad 65

## J

Janša Rado 65  
Jazbec Janez 48  
Jeran Marko 24  
Jesenko Tanja 29, 51, 60  
JesenkoTanja 69  
Jukić Marko 37  
Jurjevič Vesna 47

## K

Kamenšek Urška 53  
Kavčič Marko 48  
Kloboves Prevodnik Veronika 16, 20, 50, 52  
Kloboves-Prevodnik Veronika 29  
Klopčič Ulrika 50, 68  
Knez Damijan 32  
Koračin Vanesa 61  
Koren Jerneja 47  
Kos Janko 32, 37  
Krajc Mateja 43  
Krajec Maja 52  
Kranjc Brezar Simona 51, 60  
Kranjc Tanita 52  
Kupčič Saša 53

## L

Lamprecht Tratar Urša 53, 54, 55  
Lanišnik Rižner Tea 44  
Lenassi Metka 42

## M

Makiya Monica 48  
Markelc Boštjan 51, 60, 64  
Marušič Tjaša 55  
Medved Ajda 55  
Mesti Tanja 56  
Miceska Simona 29, 50, 52  
Milobratović Irena 57  
Mitrović Ana 32, 37

# INDEKS AVTORJEV

## N

Nolde Nataša 50  
Novaković Srdjan 43  
Novak Svetlana 61

## O

Ocvirk Janja 16, 20, 58

## P

Perić Barbara 54, 61  
Perišić Nanut Milica 37  
Peterka Matjaž 55  
Petrič Miha 65  
Petrovec Miroslav 24  
Pišljari Živa 29, 51, 60  
Plahuta Irena 65  
Plešnik Boštjan 65  
Pohar Marinšek Živa 50  
Polychronopoulou Sophia 48  
Prelog Tomaž 48  
Proj Matic 37  
Prosenc Zmrzljak Uršula 65

## R

Razpotnik Rok 65  
Reberšek Martina 62  
Reyes Andrea 48  
Režen Tadeja 65  
Rozman Damjana 65

## S

Senjor Emanuela 37  
Serša Gregor 53, 60, 64, 69  
Silverman Julian R 24  
Sindi-Ivanova Vanesa 20  
Siuka Darko 68  
Snoj Lara 47  
Solano Juan Sebastian 47  
Sosič Izidor 32  
Stegel Vida 43  
Strojan Fležar Margareta 68  
Strojniki Ksenija 43, 63

## Š

Šantek Iva 64  
Šetrajčič Dragoš Vita 43  
Škof Erik 52  
Škrbinc Breda 52  
Škrjanc Veronika 69  
Štemberger Nastja 55  
Štrancar Urša 54

## T

Tavčar Gašper 24  
Tesovnik Tine 24  
Tomažič Aleš 42, 46  
Tordecilla Juan 48  
Tozandehjani Sima 47  
Trček Hana 65  
Trotovšek Blaž 65  
Tzankov Alexandar 16, 20

## U

Uhan Sara 47

## V

Vidmar Robert 65  
Vodenik Julija 24

## Y

Yalçin Koray 48

## Z

Zadnik Vesna 67  
Založnik Mojca 50  
Zaplotnik Martin 65  
Zavrtanik Čarni Hana 42, 46

## Ž

Žlajpah Margareta 68  
Žnidar Katarina 69



# SPONZORJI

---

## KLJUČ ZA VEČ PRILOŽNOSTI PRI ZDRAVLJENJU VAŠIH BOLNIČNIKOV



Skenirajte QR kodo in izvedite več o osredotočenosti družbe MSD na zdravljenje raka.

### KEYTRUDA® je odobrena za zdravljenje več kot 25 indikacij rakavih obolenj!

Referenca: 1. Keytruda EU SmPC

**SKRAJŠAN POVZETEK GLAVNIH ZNAČILNOSTI ZDRAVILA - Pred predpisovanjem, prosimo, preberite celoten Povzetek glavnih značilnosti zdravila!** Ime zdravila: KEYTRUDA 25 mg/ml koncentrat za raztopino za infundiranje vsebuje pembrolizumab. **Terapevtske indikacije:** Zdravilo KEYTRUDA je kot samostojno zdravljenje indicirano za zdravljenje: odraslih in mladostnikov, starih 12 let ali več, z napredovalim (neoperabilnim ali metastatskim) melanomom; za adjuvantno zdravljenje odraslih in mladostnikov, starih 12 let ali več, z melanomom v stadiju IIB, IIC ali III, in sicer po popolni kirurški odstranitvi; za adjuvantno zdravljenje odraslih z nedobroocelčnim pljučnim rakom, ki imajo visoko tveganje za ponovitev bolezni po popolni kirurški odstranitvi in kemoterapiji na osnovi platin; metastatskega nedobroocelčnega pljučnega raka (NSCLC) v prvi liniji zdravljenja pri odraslih, ki imajo tumorje z  $\geq 50\%$  izraženošjo PD-L1 (TPS) in brez pozitivnih tumorskih mutacij EGFR ali ALK; lokalno napredovalega ali metastatskega NSCLC pri odraslih, ki imajo tumorje z  $\geq 1\%$  izraženošjo PD-L1 (TPS) in so bili predhodno zdravljeni z vsaj eno shemo kemoterapije, bolniki s pozitivnimi tumorskimi mutacijami EGFR ali ALK so pred prejemom zdravila KEYTRUDA morali prejeti tudi tarčno zdravljenje; odraslih in pediatrskih bolnikov, starih 3 leta ali več, s ponovljenim ali neodvisnim klasičnim Hodgkinovim limfomom (cHL), pri katerih avtolgna presaditev matičnih celic (ASCT) ni bila uspešna, ali po najmanj dveh predhodnih zdravljenjih kadar ASCT ne pride v poštev kot možnost zdravljenja; lokalno napredovalega ali metastatskega urotelijskega raka pri odraslih, predhodno zdravljenih s kemoterapijo, ki je vključevala platin; lokalno napredovalega ali metastatskega urotelijskega raka pri odraslih, ki niso primerni za zdravljenje s kemoterapijo, ki vsebuje cisplatin in imajo tumorje z izraženošjo PD-L1  $\geq 10$ , ocenjeno kombinirano pozitivno oceno (CPS); ponovljenega ali metastatskega ploščatocelčnega raka glave in vratu (HNSCC) pri odraslih, ki imajo tumorje z  $\geq 50\%$  izraženošjo PD-L1 (TPS), in pri katerih je bolezen napredovala med zdravljenjem ali po zdravljenju s kemoterapijo, ki je vključevala platin; za adjuvantno zdravljenje odraslih z rakom ledvičnih celic s povsahim tveganjem za ponovitev bolezni po nefrektomiji, ali po nefrektomiji in kirurški odstranitvi metastatskih lezij, za zdravljenje odraslih z MSI-H (microsatellite instability-high) ali dMMR (mismatch repair deficient) kolorektalnem rakom v naslednjih terapevtskih okoliščinah: prva linija zdravljenja metastatskega kolorektalnega raka; zdravljenje neoperabilnega ali metastatskega kolorektalnega raka po predhodnem kombiniranem zdravljenju, ki je temeljilo na fluoropirimidinu; in za zdravljenje MSI-H ali dMMR tumorjev pri odraslih z: napredovalim ali ponovljenim rakom endometrija, pri katerih je bolezen napredovala med ali po predhodnem zdravljenju, ki je vključevalo platin, v katerih koli terapevtskih okoliščinah, in ki niso kandidati za kurativno operacijo ali obsevanje; neoperabilnim ali metastatskim rakom želodca, tankega črevesa ali bilarnega trakta, pri katerih je bolezen napredovala med ali po vsaj enem predhodnem zdravljenju. Zdravilo KEYTRUDA je kot samostojno zdravljenje ali v kombinaciji s kemoterapijo s platinom in 5-Fluorouracilom (5-FU) indicirano za prvo linijo zdravljenja metastatskega ali neoperabilnega ponovljenega ploščatocelčnega raka glave in vratu pri odraslih, ki imajo tumorje z izraženošjo PD-L1 s CPS  $\geq 10$ , v kombinaciji s kemoterapijo za neodvisno zdravljenje, in v nadaljevanju kot samostojno adjuvantno zdravljenje po kirurškem posegu, je indicirano za zdravljenje odraslih z lokalno napredovalim trojno negativnim rakom dojke ali trojno negativnim rakom dojke v zgodnjem stadiju z visokim tveganjem za ponovitev bolezni; v kombinaciji s kemoterapijo je indicirano za zdravljenje lokalno ponovljenega neoperabilnega ali metastatskega trojno negativnega raka dojke pri odraslih, ki imajo tumorje z izraženošjo PD-L1 s CPS  $\geq 10$  in predhodno niso prejeli kemoterapije za metastatsko bolezen; v kombinaciji s kemoterapijo je indicirano za zdravljenje lokalno napredovalega ali ponovljenega raka endometrija (EC) pri odraslih z napredovalno boleznijo med ali po predhodnem zdravljenju s kemoterapijo, ki je vključevala platin, v katerih koli terapevtskih okoliščinah, in ki niso kandidati za kurativno operacijo ali obsevanje; v kombinaciji s kemoterapijo, z bevacizumabom ali brez njega, je indicirano za zdravljenje persistentnega, ponovljenega ali metastatskega raka materničnega vratu pri odraslih bolnicah, ki imajo tumorje z izraženošjo PD-L1 s CPS  $\geq 1$ ; v kombinaciji s trastuzumabom, fluoropirimidinom in kemoterapijo, ki vključuje platin, je indicirano za prvo linijo zdravljenja lokalno napredovalega neoperabilnega ali metastatskega HER2-pozitivnega adenokarcinoma želodca ali gastroezofagealnega prehoda pri odraslih, ki imajo tumorje z izraženošjo PD-L1 s CPS  $\geq 1$ ; v kombinaciji s gemcitabinom in cisplatinom je indicirano za prvo linijo zdravljenja lokalno napredovalega neoperabilnega ali metastatskega raka bilarnega trakta pri odraslih. **Omejitev in način uporabe:** Testiranje PD-L1: Če je navedeno v indikaciji, je treba izbrati bolnika za zdravljenje z zdravilom KEYTRUDA na podlagi MSI-H/dMMR statusa tumorja potrditi z validirano preskavo. **Omejitev:** Priporočeni odmerki zdravila KEYTRUDA pri odraslih je bodisi 200 mg na 3 tedne ali 400 mg na 6 tednov, apliciran z intravensko infuzijo v 30 minutah. Priporočeni odmerki zdravila KEYTRUDA za samostojno zdravljenje pri pediatrskih bolnikih s cHL, starih 3 leta ali več, ali bolnikih z melanomom, starih 12 let ali več, je 2 mg/kg telesne mase (do največ 200 mg) na 3 tedne, apliciran intravensko infuzijo v 30 minutah. Za uporabo v kombinaciji glejte povzetke glavnih značilnosti zdravil sočasno uporabljenih zdravil. Če se zdravilo KEYTRUDA uporablja kot del kombiniranega zdravljenja skupaj z intravensko kemoterapijo, je treba zdravilo KEYTRUDA aplicirati po. Če se zdravilo KEYTRUDA uporablja kot del kombiniranega zdravljenja skupaj z entorfumabom vedotinom, je treba zdravilo KEYTRUDA aplicirati po entorfumab vedotinu, kadar sta uporabljena na isti dan. Bolnike je treba zdraviti do napredovanja bolezni ali nesprejemljivih toksičnih učinkov (in do maksimalnega trajanja zdravljenja, če je le to določeno za indikacijo). Pri adjuvantnem zdravljenju melanoma, NSCLC ali RCC je treba zdravilo uporabljati do ponovitve bolezni, pojava nesprejemljivih toksičnih učinkov oziroma mora zdravljenje trajati do enega leta. Za neodvisno in adjuvantno zdravljenje operabilnega NSCLC morajo bolniki neodvisno prejeti zdravilo KEYTRUDA v kombinaciji s kemoterapijo, in sicer 4 odmerke po 200 mg na 3 tedne ali 2 odmerka po 400 mg na 6 tednov ali do napredovanja bolezni, ki izključuje definitiven kirurški poseg, ali do pojava nesprejemljivih toksičnih učinkov, čemur sledi adjuvantno zdravljenje z zdravilom KEYTRUDA kot samostojnim zdravljenjem, in sicer 13 odmerkov po 200 mg na 3 tedne ali 7 odmerkov po 400 mg na 6 tednov ali do ponovitve bolezni ali do pojava nesprejemljivih toksičnih učinkov. Bolniki, pri katerih pride do napredovanja bolezni, ki izključuje definitiven kirurški poseg, ali do nesprejemljivih toksičnih učinkov, povezanih z zdravilom KEYTRUDA kot neodvisnim zdravljenjem v kombinaciji s kemoterapijo, ne smejo prejeti zdravila KEYTRUDA kot samostojnega zdravljenja za adjuvantno zdravljenje. Za neodvisno in adjuvantno zdravljenje TNBC morajo bolniki neodvisno prejeti zdravilo KEYTRUDA v kombinaciji s kemoterapijo, in sicer 8 odmerkov po 200 mg na 3 tedne ali 4 odmerke po 400 mg na 6 tednov, ali do napredovanja bolezni, ki izključuje definitiven kirurški poseg, ali do pojava nesprejemljivih toksičnih učinkov, čemur sledi adjuvantno zdravljenje z zdravilom KEYTRUDA kot samostojnim zdravljenjem, in sicer 9 odmerkov po 200 mg na 3 tedne ali 5 odmerkov po 400 mg na 6 tednov ali do ponovitve bolezni ali pojava nesprejemljivih toksičnih učinkov. Bolniki, pri katerih pride do napredovanja bolezni, ki izključuje definitiven kirurški poseg, ali do nesprejemljivih toksičnih učinkov povezanih z zdravilom

KEYTRUDA kot neodvisnim zdravljenjem v kombinaciji s kemoterapijo, ne smejo prejeti zdravila KEYTRUDA kot samostojnega zdravljenja za adjuvantno zdravljenje. Če je akstinib uporabljen v kombinaciji s pembrolizumabom, se lahko razmisli o povečanju odmerka akstiniba nad začetnih 5 v presledkih šest tednov ali več. V primeru uporabe v kombinaciji z lenvatinibom je treba zdravljenje z enim ali obema zdraviloma prekiniti, kot je primerno. Uporabo lenvatiniba je treba zadržati, odmerek zmanjšati ali prenehati z uporabo, v skladu z navodili v povzetku glavnih značilnosti zdravila za lenvatinib, in sicer za kombinacijo s pembrolizumabom. Pri bolnikih starih  $\geq 65$  let, bolnikih z blago do zmerno okvaro ledvic, bolnikih z blago ali zmerno okvaro jeter prilagoditev odmerka ni potrebna. **Odstavek odmerka ali ukinitve zdravljenja:** Zmanjšanje odmerka zdravila KEYTRUDA ni priporočljivo. Za obvladovanje neželenih učinkov je treba uporabiti zdravila KEYTRUDA zadržati ali ukiniti, prosimo, glejte celoten Povzetek glavnih značilnosti zdravila. **Kontraindikacije:** Preobčutljivost na učinkovino ali katero koli pomožno snov. **Povzete posebnih opozoril, previdnostnih ukrepov, interakcij in neželenih učinkov:** Imunsko pogojeni neželeni učinki (pnevmonitis, kolitis, hepatitis, nefritis, endokrinopatije, neželeni učinki na kožo in drugi): Pri bolnikih, ki so prejeli pembrolizumab, so se pojavili imunsko pogojeni neželeni učinki, vključno s hudimi in smrtnimi primeri. Večina imunsko pogojenih neželenih učinkov, ki so se pojavili med zdravljenjem s pembrolizumabom, je bila reverzibilnih in so jih obvladali s prekinitvijo uporabe pembrolizumaba, uporabo kortikosteroidov in/ali podporno oskrbo. Pojavilo se lahko tudi po zadnjem odmerku pembrolizumaba in hkrati prizadanejo več organskih sistemov. V primeru suma na imunsko pogojene neželene učinke je treba poskrbeti za ustrezno oceno za potrditev etiologije oziroma izključitev drugih vzrokov. Glede na izrazitost neželenega učinka je treba zadržati uporabo pembrolizumaba in uporabiti kortikosteroide – za natančna navodila, prosimo, glejte Povzetek glavnih značilnosti zdravila Keytruda. Zdravljenje s pembrolizumabom lahko poveča tveganje za zavrnitev pri prejemnikih presadkov črskih organov. Pri bolnikih, ki so prejeli pembrolizumab, so poročali o hudih z infuzijo povezanih reakcijah, vključno s preobčutljivostjo in anafilaksijo. Pembrolizumab se iz obkoda odraslih s katabolizmom, zato presnovnih medsebojnih delovanj zdravil ni pričakovati. Uporabi sistemskih kortikosteroidov ali imunosupresivov pred uvedbo pembrolizumaba se je treba izogibati, ker lahko vplivajo na farmakodinamično aktivnost in učinkovitost pembrolizumaba. Vendar pa je kortikosteroide ali druge imunosupresive mogoče uporabiti za zdravljenje imunske pogojenih neželenih učinkov. Kortikosteroide je mogoče uporabiti tudi kot premedikacijo. Če je pembrolizumab uporabljen v kombinaciji s kemoterapijo, kot antiemetično profilakso in/ali za ublažitev neželenih učinkov, povezanih s kemoterapijo. Ženske v rodni dobi morajo med zdravljenjem s pembrolizumabom in vsaj še 4 mesece po zadnjem odmerku pembrolizumaba uporabljati učinkovito kontracepcijo, med nosečnostjo in dojenjem se ga ne sme uporabljati. Varnost pembrolizumaba pri samostojnem zdravljenju so v kliničnih študijah ocenili pri 7631 bolnikih, ki so imeli različne vrste raka, s štiriindvajsetimi (2 mg/kg telesne mase na 3 tedne, 200 mg na 3 tedne in 10 mg/kg telesne mase na 2 ali 3 tedne). V tej populaciji bolnikov je mediana čas opazovanja znašal 8,5 meseca (v razponu od 1 dneva do 39 mesecev), najpogostejši neželeni učinki zdravljenja s pembrolizumabom pa so bili utrujenost (31 %), diareja (22 %) in navzea (20 %). Večina poročanih neželenih učinkov pri samostojnem zdravljenju je bila po izrazitosti 1. ali 2. stopnje. Najresnejši neželeni učinki so bili imunsko pogojeni neželeni učinki in hude z infuzijo povezane reakcije. Pojavnost imunsko pogojenih neželenih učinkov pri uporabi pembrolizumaba samega za adjuvantno zdravljenje je znašala 37 % za vse stopnje in 9 % od 3. do 5. stopnje, pri metastatski bolezni pa 25 % za vse stopnje in 6 % od 3. do 5. stopnje. Pri adjuvantnem zdravljenju niso zaznali nobenih novih imunsko pogojenih neželenih učinkov. Varnost pembrolizumaba pri kombiniranem zdravljenju s kemoterapijo so ocenili pri 5183 bolnikih z različnimi vrstami raka, ki so v kliničnih študijah prejeli pembrolizumab v odmerkih 200 mg, 2 mg/kg telesne mase ali 10 mg/kg telesne mase na vsake 3 tedne. V tej populaciji bolnikov so bili najpogostejši neželeni učinki naslednji: anemija (52 %), navzea (52 %), utrujenost (35 %), diareja (33 %), zaprtost (32 %), bruhanje (28 %), zmanjšanje apetita (28 %), zmanjšanje števila nevtrofilcev (27 %) in nevropatija (25 %). Pojavnost neželenih učinkov 3. do 5. stopnje je pri bolnikih z NSCLC pri kombiniranem zdravljenju s pembrolizumabom znašala 69 % in pri zdravljenju samo s kemoterapijo 61 %, pri bolnikih s HNSCC pri kombiniranem zdravljenju s pembrolizumabom 85 % in pri zdravljenju s kemoterapijo v kombinaciji s cetuximabom 84 %, pri bolnikih z rakom požiralnika pri kombiniranem zdravljenju s pembrolizumabom 86 % in pri zdravljenju samo s kemoterapijo 83 %, pri bolnikih s TNBC pri kombiniranem zdravljenju s pembrolizumabom 80 % in pri zdravljenju samo s kemoterapijo 77 %, pri bolnicah z rakom materničnega vratu pri kombiniranem zdravljenju s pembrolizumabom 82 % in pri zdravljenju samo s kemoterapijo 75 %, pri bolnikih z rakom želodca pri kombiniranem zdravljenju s pembrolizumabom (kemoterapija z ali brez trastuzumabom) 74 % in pri kemoterapiji v kombinaciji z ali brez trastuzumabom 68 %, in pri bolnikih z rakom bilarnega trakta pri kombiniranem zdravljenju s pembrolizumabom 85 % in pri samostojni kemoterapiji 84 %. Varnost pembrolizumaba v kombinaciji s akstinibom ali lenvatinibom pri napredovalnem RCC in v kombinaciji z lenvatinibom pri napredovalnem EC so ocenili pri skupno 1456 bolnikih z napredovalim RCC ali napredovalim EC, ki so v kliničnih študijah prejeli 200 mg pembrolizumaba na 3 tedne skupaj s 5 mg akstiniba dvakrat na dan ali z 20 mg lenvatinibom enkrat na dan, kot je bilo ustrezno. V teh populacijah bolnikov so bili najpogostejši neželeni učinki diareja (58 %), hipertenzija (54 %), hipotenzijem (46 %), utrujenost (41 %), zmanjšani apetit (40 %), navzea (40 %), artralgija (30 %), bruhanje (28 %), zmanjšanje telesne mase (28 %), disonija (28 %), bolečine v trebuhu (28 %), proteinurija (27 %), sindrom palmarno-planarne eritrodizestazije (26 %), izpuščaji (26 %), stomatitis (25 %), zaprtost (25 %), mišično-skeletna bolečina (23 %), glavobol (23 %) in kašelj (21 %). Neželenih učinkov od 3. do 5. stopnje je bilo pri bolnikih z RCC med uporabo pembrolizumaba v kombinaciji s akstinibom ali lenvatinibom 80 % in med uporabo sunitiniba samega 71 %. Pri bolnicah z EC je bilo neželenih učinkov od 3. do 5. stopnje med uporabo pembrolizumaba v kombinaciji z lenvatinibom 89 % in med uporabo kemoterapije same 73 %. Varnost pembrolizumaba v kombinaciji s entorfumab vedotinom so ocenili pri 564 bolnikih z neoperabilnim ali metastatskim urotelijskim rakom, ki so prejeli 200 mg pembrolizumaba 1. dan in 1,25 mg/kg entorfumab vedotina 1. in 8. dan vsakega 21-dnevnega ciklusa. Na splošno so opazili, da je bila pojavnost neželenih učinkov za pembrolizumab v kombinaciji z entorfumab vedotinom višja kot pri samostojnem zdravljenju s pembrolizumabom, kar odraža prispevek entorfumab vedotina in daljšega trajanja kombiniranega zdravljenja. Neželeni učinki so bili na splošno podobni neželenim učinkom, ki so jih opazili pri bolnikih, ki so prejeli pembrolizumab ali entorfumab vedotin kot samostojno zdravljenje. Pojavnost makulopapuloznega izpuščaja vseh stopenj je bila 36 % (10 % od 3. do 4. stopnje), kar je višje, kot je bilo opaženo pri samostojnem zdravljenju s pembrolizumabom. Na splošno so bile pojavnosti neželenih učinkov višje pri bolnikih, starih  $\geq 65$  let, v primerjavi z bolniki, starih  $< 65$  let, predvsem za resne neželene učinke (56,3 % pri bolnikih, starih  $\geq 65$  let, in 35,3 % pri bolnikih, starih  $< 65$  let) in učinke 3. stopnje (80,3 % pri bolnikih, starih  $\geq 65$  let, in 64,2 % pri bolnikih, starih  $< 65$  let), podobno kot opaženo pri primerjalni kemoterapiji. Za celoten seznam neželenih učinkov, prosimo, glejte celoten Povzetek glavnih značilnosti zdravila. Za dodatne informacije o varnosti v primeru uporabe pembrolizumaba v kombinaciji glejte povzete glavnih značilnosti zdravila za posamezne komponente kombiniranega zdravljenja. **Način in režim izdaje zdravila:** H – Predpisovanje in izdaja zdravila je le na recept, zdravilo se uporablja samo v bolnišnicah. **Imetnik dovoljenja za promet z zdravilom:** Merck Sharp & Dohme B.V., Waarderweg 39, 2031 BN Haarlem, Nizozemska.



Merck Sharp & Dohme inovativna zdravila d.o.o.  
Ameriška ulica 2, 1000 Ljubljana; tel: +386 1 520 42 01, fax: +386 1 520 43 50  
Vse pravice pridržane. Pripravljen v Sloveniji, 9/20/24; SI-KEY-00679

**Samo za strokovno javnost.**

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



## LILLY – ŽIVETI BOLJE

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

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

PP-LILLY-SI-0092, 9.6.2021

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

## ODOBREN V PRVI LINIJI ZDRAVLJENJA mPaCa

# ONIVYDE®

pegylated liposomal

## V REŽIMU NALIRIFOX

### UTIRA NOVO POT NA PODLAGI TRDNIH DOKAZOV

Z zdravilom ONIVYDE v režimu NALIRIFOX lahko bolnikom z mPaCa ponudite učinkovito zdravljenje z obvladljivim varnostnim profilom in omogočite, da se njihova kakovost življenja ohrani.<sup>1, 2</sup>

Zdravilo ONIVYDE pegylated liposomal je indicirano:

- v kombinaciji z oksaliplatinom, 5-fluorouracilom (5-FU) in levkovorinom (LV) za prvo izbiro zdravljenja metastatskega adenokarcinoma trebušne slinavke pri odraslih bolnikih,
  - v kombinaciji s 5-FU in LV za zdravljenje metastatskega adenokarcinoma trebušne slinavke pri odraslih bolnikih, pri katerih je bolezen po zdravljenju na osnovi gemcitabina napredovala.
- Zdravilo ni bilo preizkušano pri otrocih, mlajših od 18 let, in je indicirano le za odrasle.<sup>1</sup>



**SKRAJŠAN POZVETEK GLAVNIH ZNAČILNOSTI ZDRAVILA ONIVYDE pegylated liposomal 4,3 mg/ml SESTAVA:** Onivyde pegylated liposomal 4,3 mg/ml koncentrat za disperzijo za infundiranje: ena viala z 10 ml koncentrata vsebuje 43 mg brezvodnega irinotekana (v obliki irinotekanjeve soli saharoznega oksulfata) v pegilirani liposomski formulaciji. **TERAPEVTSKE INDIKACIJE:** Zdravilo Onivyde pegylated liposomal je v kombinaciji z oksaliplatinom, 5-fluorouracilom (5-FU) in levkovorinom (LV) indicirano za prvo izbiro zdravljenja metastatskega adenokarcinoma trebušne slinavke pri odraslih bolnikih in v kombinaciji s 5-FU in LV za zdravljenje metastatskega adenokarcinoma trebušne slinavke pri odraslih bolnikih, pri katerih je bolezen po zdravljenju na osnovi gemcitabina napredovala. **ODMERJANJE IN NAČIN UPORABE:** Onivyde pegylated liposomal smejo bolnikom predpisati in dajati samo zdravstveni delavci, ki imajo izkušnje pri uporabi zdravil za zdravljenje raka. Zdravilo Onivyde pegylated liposomal ni enakovredno drugim nepiliosomskim formulacijam irinotekana, zato jih ne smejo zamenjavati. Zdravilo Onivyde pegylated liposomal se ne daje kot samostojno zdravilo. Z zdravljenjem je treba nadaljevati, dokler bolzen ne napreduje ali bolnik zdravljenja z zdravilom ne preneša več. Priporočeni odmerek zdravila Onivyde pegylated liposomal v kombinaciji z oksaliplatinom, LV in 5-FU je 50 mg/m<sup>2</sup> v obliki 90-minutne intravenske infuzije, ki ji sledi 120-minutna intravenska infuzija oksaliplatinu v odmerku 60 mg/m<sup>2</sup>, nato 30-minutna intravenska infuzija LV v odmerku 400 mg/m<sup>2</sup> in zatem 46-urna intravenska infuzija 5-FU v odmerku 2400 mg/m<sup>2</sup>, vsaka 2 tedna. Priporočeni začetni odmerek zdravila Onivyde pegylated liposomal pri bolnikih z znano hudo toksičnostjo za alel UGT1A1\*28 je nesprejemljiv. Priporočeni odmerek in režim odmerjanja zdravila Onivyde pegylated liposomal v kombinaciji s 5-FU in LV je 70 mg/m<sup>2</sup> intravensko 90 minut, čemur sledi LV 400 mg/m<sup>2</sup> intravensko 30 minut in nato 5-FU 2400 mg/m<sup>2</sup> intravensko 46 ur, vsaka 2 tedna. Pri bolnikih z znano hudo toksičnostjo za alel UGT1A1\*28 je treba razmisлити o manjšem začetnem odmerku zdravila Onivyde pegylated liposomal 50 mg/m<sup>2</sup>. Če zaradi bolnikovo dobro prenašajo, lahko v naslednjih ciklih razmislimo o odmerku zdravila Onivyde pegylated liposomal 70 mg/m<sup>2</sup>. Prilaganje odmerka se priporoča za obvladovanje toksičnosti, povezane z zdravilom Onivyde pegylated liposomal. **KONTRAIKACIJE:** Anamneza hude preobčutljivosti na irinotekan ali kateri koli pomožni snov. **OPAZOVANJA:** **Melansurjenje/vezovanje:** Med zdravljenjem z zdravilom Onivyde pegylated liposomal se priporoča nadziranje celotne krvne slike. Bolniki se morajo zavedati tveganja za nevtropenijo in pomenu povšarske telesne temperature. Febrilno nevtropenijo je treba nujno zdraviti v bolnišnici s širokospetralnimi intravenski antibiotiki. Pri bolnikih, ki doživijo hude hematološke neželene učinke, se priporoča zmanjšanje odmerka ali prekinitev zdravljenja. Bolnikov s hudo odpovedjo ledvice ni treba spremljati pri zdravljenju z zdravilom Onivyde pegylated liposomal. Anamneza prehodnega obnavljanja trebuha poveda tveganje za hudo nevtropenijo in febrilno nevtropenijo po zdravljenju z zdravilom Onivyde pegylated liposomal. Pri bolnikih, ki hkrati prejmejo zdravilo Onivyde pegylated liposomal in se obsevani, je potrebna previdnost. Bolniki s pomankljivo glukuronidacijo bilirubina, kot so bolniki z Gilbertovim sindromom, imajo med zdravljenjem z zdravilom Onivyde pegylated liposomal lahko večje tveganje za melansurjenje. **Interakcije z zdravili in zdravila:** Dajanje živih ali atenuiranih cepiv bolnikom z oslabilim imunskim sistemom lahko povzroči resne ali smrtne okužbe. **Interakcije z močnimi induktori encima CYP3A4, močnimi zaviralci encima CYP3A4 in močnimi zaviralci encima UGT1A1:** Zdravilo Onivyde pegylated liposomal ne smejo dajati skupaj z močnimi induktori encima CYP3A4, močnimi zaviralci encima CYP3A4 ali z močnimi zaviralci encima UGT1A1, razen če bi drugih terapevtskih možnosti. Zdravljenje z močnimi zaviralci encima CYP3A4 moramo prekiniti vsaj 1 teden pred začetkom zdravljenja z zdravilom Onivyde pegylated liposomal. **Driska:** Zdravilo Onivyde pegylated liposomal lahko povzroči hudo in smrtno nevarno drisko. Zdravilo Onivyde pegylated liposomal se ne sme dajati bolnikom s črevesno obstrukcijo in kronično vetrovno črevesno boleznijo. Pri bolnikih, ki doživijo zgodnji pojav driske (v ≤ 24 urah po začetku zdravljenja z zdravilom Onivyde pegylated liposomal) ali holinergične simptome, je treba razmisлити o terapevtskem in profilaktičnem zdravljenju z atropinom, razen če je kontraindicirano. Bolnike je treba opozoriti na tveganje za zaporedno drisko (> 24 ur), ki je izjemno redka in v redkih primerih tudi življenjsko nevarna. Loperamid je treba uvedti ob prvem pojavu neobčutljive ali mehkega blata ali takoj, ko okvare blata postane pogostejše kot običajno. Loperamid je treba dajati, dokler bolnik ni brez driske vsaj 12 ur. Da bi se izognili hudi driski, opustite vse izdelke, ki vsebujejo laktozo, ohranjajte hidracijo in uživajte dieto z nizko vsebnostjo maščob. Če driska traja tudi, ko bolnik prejme loperamid več kot 24 ur, je treba razmisлити o dodatni peroralni antibiotični podpori. Loperamid zaradi tveganja za paralični ileus ne smemo uporabljati več kot 48 ur zaporedoma. Nove cikluse zdravljenja se ne sme pričeti, dokler se driska ne umiri do s. 1. stopnje (2–3 odvajanja/dan več kot pred zdravljenjem). **Holinergične reakcije:** Zgodnje drisko lahko spremljajo rinitis, povečano slinjenje, zardanje, diateza, bradikardija, mioza in hiperperistaltika. Pri bolnikih s holinergičnimi simptomi moramo uporabiti atropin. **Preobčutljivostne reakcije, vključno z akutnimi alergijskimi reakcijami:** V primeru hudih preobčutljivostnih reakcij je treba zdravljenje z zdravilom Onivyde pegylated liposomal prekiniti. **Prehodna Wernickejeva opareja:** Večje tveganje za resne okužbe. Bolnike je treba spremljati glede znakov okužbe. **Značilne boleznijo:** Zdravilo Onivyde pegylated liposomal je bilo povezano s tromboemboličnimi dogodki, kot so pljučna embolija, venska tromboza in arterijska tromboembolija. Treba je predvideti podrobno zdravstveno anamnezo, da bi prepoznali bolnike z več dejavniki tveganja poleg osnovne neoplazme. Bolnike je treba opozoriti o znakih in simptomih tromboembolije in jim svetovati, da se v primeru katerega od teh znakov ali simptomov takoj obrne na svojega zdravnika ali medicinsko sestro. **Pljučna toksičnost:** Pri bolnikih, ki so prejeli nepiliosomski irinotekan, so se pojavili dogodki, podobni intersticijski pljučni bolezni (IPB), ki so vodili do smrtnih primerov. Pri bolnikih z dejavniki tveganja (obstoječa pljučna bolezen, uporaba pnevmotoksičnih zdravil, kolonije stimulirajočih dejavnikov ali prehodnih zdravljenj z obsevanjem) je treba pred zdravljenjem z zdravilom Onivyde pegylated liposomal in po njem skrbno nadzirati respiratorne simptome. Dokler ni opravljena diagnostična ocena, je treba ob pojavu nove ali napredovale dispnije, kašlja in povšarske telesne temperature zdravljenje z zdravilom Onivyde pegylated liposomal začasno prekiniti. Pri bolnikih s potrjeno diagnozo IPB moramo zdravljenje z zdravilom Onivyde pegylated liposomal dokončno prekiniti. **Letna okvara:** Bolniki s hiperbilirubinemijo so imeli povšarske koncentracije skupnega SN-38, zato je tveganje za nevtropenijo povečano. Pri bolnikih z vrednostjo skupnega bilirubina 1,0–2,0 mg/dl je treba redno nadzirati celotno krvno sliko. Previdnost je potrebna pri bolnikih z jetno okvaro (bilirubin > 2-kratna zgorja meja normalnih vrednosti [ULN], aminotransferaze > 5-kratna [ULN]). Previdnost je potrebna, če zdravilo Onivyde pegylated liposomal dajemo v kombinaciji z drugimi hepatotoksičnimi zdravili. **Bolniki s pretirano telesno maso:** Indeks telesne mase < 18,5 kg/m<sup>2</sup>: Povečana je preobčutljivost. **Pomožne snovi:** To zdravilo vsebuje 33,1 mg natrija na vialo. Kar je enako 1,85 % največjega dnevnega vnosa natrija za odrasle osebe, ki ga priporoča SZO in znaša 2 g. En mililitr zdravila Onivyde pegylated liposomal vsebuje 0,144 mmol (3,31 mg) natrija. **INTERAKCIJE:**

**Previdnostni ukrepi:** Sočasno dajanje z induktori encima CYP3A4 (npr. antikovulzivi, rifampicin, rifabutin in šentjanževka) lahko zmanjša sistemsko izpostavljenost zdravilu Onivyde pegylated liposomal. Sočasno dajanje z zaviralci encima CYP3A4 (npr. grenikivnim sokom, klaritromicinom, indinavirjem, itrakonazolom, lopinavirjem, nefazodonom, neflavirinom, ritonavirjem, sakvinavirjem, telaprevirjem, vinkonazolom) ali encima UGT1A1 (npr. alazanavirja, gemfibrozila, indinavirja, regorafenib) lahko poveča sistemsko izpostavljenost zdravilu Onivyde pegylated liposomal. Sočasna uporaba z zdravili z delovanjem na novotvorbe (fluocinoloni) lahko poslabša neželeno učine zdravila Onivyde pegylated liposomal. **PLONOST:** Pred začetkom zdravljenja z zdravilom Onivyde pegylated liposomal preimste o svetovanju bolnikom glede shranjevanja spolnih celic. **NOSEČNOST:** Uporaba ni priporočljiva. **DOJENJE:** Zdravilo je kontraindicirano. **KONTRACEPCIJA:** Ženske v rodni dobi morajo med zdravljenjem in še 7 mesecev po zdravljenju z zdravilom Onivyde pegylated liposomal uporabljati učinkovito kontracepcijo. Moški morajo med zdravljenjem z zdravilom Onivyde pegylated liposomal in 4 mesece po zdravljenju uporabljati kondome. **VPLIV NA SPOSOBNOST VOŽNJE IN UPRAVLJANJA STROJEV:** Bolniki morajo biti med zdravljenjem pri vožnji in upravljanju strojev previdni. **NEZELENI UČINKI:** **Zdravilo Onivyde pegylated liposomal v kombinaciji z oksaliplatinom, 5-fluorouracilom in levkovorinom:** Zelo pogosti: anemija, nevtropenija, trombocitopenija, hipokalciemija, zmanjšani apetit, periferne nevropatije, dispneja, parastezija, driska, navzea, bruhanje, bolečine/nelagodje v trebuhu, stomatitis, alopecija, astenija, vnetje sluznic, zmanjšana telesna masa. **Pogosti:** sepsa, infekcija urinarnega trakta, okužba s kandido, nazofaringitis, febrilna nevtropenija, levkopenija, limfopenija, dehidracija, hiponatriemija, hipofosfatemija, hipomagnezija, hipokalciemija, tremor, nevrotski sindrom, disestezijska, holinergični sindrom, glavobol, omotica, zamegljen vid, tahikardija, hipotenzija, tromboembolični dogodki, pljučna embolija, kolcanje, dispnija, epistaksa, kolitis, enterokolitis, zaprtje, suha usta, naperjanje, napihnjenost trebuha, dispneja, gastroezofagealna refluksna bolezen, hemoroidi, distagija, hiperbilirubinemija, suha koža, sindrom palmaro-planarne eritrodizestazije, lupušča, hiperpigmentacija kože, mišična šibkost, mialgija, mišični krči, akutna poškodba ledvic, piroksija, edem, nrtizica, zvišana raven transaminaz (ALT in AST), zvišana raven alkalne fosfataze v krvi, zvišana raven gama-glutamil transferaze, zvišana raven kreatinina v krvi, z infuzijo povezana reakcija. **Občasni:** divertikulitis, pljučnica, oralni abscesi, febrilna okužba, gastroenteritis, okužba sluznic, oralna glivična okužba, okužba s Clostridium difficile, konjunktivitis, furunkel, herpes simplex, brigitis, parodontitis, pustulozni izpuščaji, sinusitis, okužba zob, vulvovaginalna glivična okužba, peritumoralni edem, pancitopenija, hemolitična anemija, elektrolitsko neravnovesje, hiperkalcemija, celična smrt, hipokloremija, protin, hiperglikemija, hipokalciemija, pomanjkanje železa, podhranjenost, nespečnost, zmedenost, depresija, navzea, napadi, možganska krvavitev, možganska ishemija, shemična možganska kap, anozmija, agezijska, motnje ravnotežja, hipersomnija, hipestezijska, motnje v duševnem razvoju, letargija, akutni miokardni infarkt, palpitacije, hipertenzija, periferne neuropatije, akutno draženje oči, zmanjšana ostrina vida, vtrogavica, angina pectoris, akutni miokardni infarkt, palpitacije, hipertenzija, periferne neuropatije, hematom, fibrozis, orofaringealna bolečina, kašelj, hiperoksemija, vnetje nosu, atelektazija, distonija, pnevmotimna, gastrointestinska toksičnost, obstrukcija dvanajstnika, aritmija in/ali tahikardija, afata, oralna disestezijska, bolečina v ustni votlini, motnje jezika, sindrom razpok, angularni helitis, dishezija, oralna parastezija, zobni keris, erukcija, žlečodne motnje, gastritis, motnje dlasi, boleče desni, hematohexija, hiperstezijska zob, paralični ileus, otekanje ustnic, razjede v ustih, spazem požirnika, parodontalna bolezen, rektalna krvavitev, halangitis, toksični hepatitis, holestaza, hepatična ciroza, pruritus, hiperhidroza, bulozi dermatitis, generalizirani ekfoliativni dermatitis, eritem, toksičnost za nohte, papule, petehije, luskvacija, občutljiva koža, luščenje kože, kožna lezija, teleangiektazija, urtikarija, artralgija, bolečine v hrbtu, bolečine v kosteh, bolečine v okončinah, poliartritis, okvara ledvic, odpoved ledvic, disurija, proletrurija, vulvovaginalna suhost, slabo počutje, splošno poslabšanje telesnega zdravja, vnetje, sindrom večorganske disfunkcije, gripa podobna odpoved, nespečna bolečina v prsnem košu, akutna bolečina, bolečina v vratu, hipotenzija, bolečina, otekel obraz, temperatura intoliranja, keserza, zvišana mediarodno umerjeno razmerje, znižana raven celokupnih beljakovin, zmanjšani ledvični očistek kreatinina, podvišani QT interval na elektrokardiogramu, povečano število monocitov, zvišana raven tropoina I. **Zdravilo Onivyde pegylated liposomal v kombinaciji s 5-fluorouracilom in levkovorinom:** Zelo pogosti: nevtropenija, levkopenija, anemija, trombocitopenija, hipokalciemija, hipomagnezija, dehidracija, zmanjšani apetit, omotica, driska, bruhanje, navzea, bolečine v trebuhu, stomatitis, alopecija, piroksija, periferne edem, vnetje sluznic, utrujenost, astenija, zmanjšana telesna masa. **Pogosti:** sepični šok, sepsa, pljučnica, febrilna nevtropenija, gastroenteritis, oralna kandidoza, limfopenija, hipokalciemija, hiponatriemija, hipofosfatemija, hipostatemija, nespečnost, holinergični sindrom, izgubljen apetit, vnetje sluznic, urtikarija, okužba s kandido, okužba s Clostridium difficile, okužba s herpes simplex, brigitis, parodontitis, pustulozni izpuščaji, sinusitis, okužba zob, vulvovaginalna glivična okužba, peritumoralni edem, pancitopenija, hemolitična anemija, elektrolitsko neravnovesje, hiperkalcemija, celična smrt, hipokloremija, protin, hiperglikemija, hipokalciemija, pomanjkanje železa, podhranjenost, nespečnost, zmedenost, depresija, navzea, napadi, možganska krvavitev, možganska ishemija, shemična možganska kap, anozmija, agezijska, motnje ravnotežja, hipersomnija, hipestezijska, motnje v duševnem razvoju, letargija, akutni miokardni infarkt, palpitacije, hipertenzija, periferne neuropatije, akutno draženje oči, zmanjšana ostrina vida, vtrogavica, angina pectoris, akutni miokardni infarkt, palpitacije, hipertenzija, periferne neuropatije, hematom, fibrozis, orofaringealna bolečina, kašelj, hiperoksemija, vnetje nosu, atelektazija, distonija, pnevmotimna, gastrointestinska toksičnost, obstrukcija dvanajstnika, aritmija in/ali tahikardija, afata, oralna disestezijska, bolečina v ustni votlini, motnje jezika, sindrom razpok, angularni helitis, dishezija, oralna parastezija, zobni keris, erukcija, žlečodne motnje, gastritis, motnje dlasi, boleče desni, hematohexija, hiperstezijska zob, paralični ileus, otekanje ustnic, razjede v ustih, spazem požirnika, parodontalna bolezen, rektalna krvavitev, halangitis, toksični hepatitis, holestaza, hepatična ciroza, pruritus, hiperhidroza, bulozi dermatitis, generalizirani ekfoliativni dermatitis, eritem, toksičnost za nohte, papule, petehije, luskvacija, občutljiva koža, luščenje kože, kožna lezija, teleangiektazija, urtikarija, artralgija, bolečine v hrbtu, bolečine v kosteh, bolečine v okončinah, poliartritis, okvara ledvic, odpoved ledvic, disurija, proletrurija, vulvovaginalna suhost, slabo počutje, splošno poslabšanje telesnega zdravja, vnetje, sindrom večorganske disfunkcije, gripa podobna odpoved, nespečna bolečina v prsnem košu, akutna bolečina, bolečina v vratu, hipotenzija, bolečina, otekel obraz, temperatura intoliranja, keserza, zvišana mediarodno umerjeno razmerje, znižana raven celokupnih beljakovin, zmanjšani ledvični očistek kreatinina, podvišani QT interval na elektrokardiogramu, povečano število monocitov, zvišana raven tropoina I. **Zdravilo Onivyde pegylated liposomal v kombinaciji s 5-fluorouracilom in levkovorinom:** Zelo pogosti: nevtropenija, levkopenija, anemija, trombocitopenija, hipokalciemija, hipomagnezija, dehidracija, zmanjšani apetit, omotica, driska, bruhanje, navzea, bolečine v trebuhu, stomatitis, alopecija, piroksija, periferne edem, vnetje sluznic, utrujenost, astenija, zmanjšana telesna masa. **Pogosti:** sepični šok, sepsa, pljučnica, febrilna nevtropenija, gastroenteritis, oralna kandidoza, limfopenija, hipokalciemija, hiponatriemija, hipofosfatemija, hipostatemija, nespečnost, holinergični sindrom, izgubljen apetit, vnetje sluznic, urtikarija, okužba s kandido, okužba s Clostridium difficile, okužba s herpes simplex, brigitis, parodontitis, pustulozni izpuščaji, sinusitis, okužba zob, vulvovaginalna glivična okužba, peritumoralni edem, pancitopenija, hemolitična anemija, elektrolitsko neravnovesje, hiperkalcemija, celična smrt, hipokloremija, protin, hiperglikemija, hipokalciemija, pomanjkanje železa, podhranjenost, nespečnost, zmedenost, depresija, navzea, napadi, možganska krvavitev, možganska ishemija, shemična možganska kap, anozmija, agezijska, motnje ravnotežja, hipersomnija, hipestezijska, motnje v duševnem razvoju, letargija, akutni miokardni infarkt, palpitacije, hipertenzija, periferne neuropatije, akutno draženje oči, zmanjšana ostrina vida, vtrogavica, angina pectoris, akutni miokardni infarkt, palpitacije, hipertenzija, periferne neuropatije, hematom, fibrozis, orofaringealna bolečina, kašelj, hiperoksemija, vnetje nosu, atelektazija, distonija, pnevmotimna, gastrointestinska toksičnost, obstrukcija dvanajstnika, aritmija in/ali tahikardija, afata, oralna disestezijska, bolečina v ustni votlini, motnje jezika, sindrom razpok, angularni helitis, dishezija, oralna parastezija, zobni keris, erukcija, žlečodne motnje, gastritis, motnje dlasi, boleče desni, hematohexija, hiperstezijska zob, paralični ileus, otekanje ustnic, razjede v ustih, spazem požirnika, parodontalna bolezen, rektalna krvavitev, halangitis, toksični hepatitis, holestaza, hepatična ciroza, pruritus, hiperhidroza, bulozi dermatitis, generalizirani ekfoliativni dermatitis, eritem, toksičnost za nohte, papule, petehije, luskvacija, občutljiva koža, luščenje kože, kožna lezija, teleangiektazija, urtikarija, artralgija, bolečine v hrbtu, bolečine v kosteh, bolečine v okončinah, poliartritis, okvara ledvic, odpoved ledvic, disurija, proletrurija, vulvovaginalna suhost, slabo počutje, splošno poslabšanje telesnega zdravja, vnetje, sindrom večorganske disfunkcije, gripa podobna odpoved, nespečna bolečina v prsnem košu, akutna bolečina, bolečina v vratu, hipotenzija, bolečina, otekel obraz, temperatura intoliranja, keserza, zvišana mediarodno umerjeno razmerje, znižana raven celokupnih beljakovin, zmanjšani ledvični očistek kreatinina, podvišani QT interval na elektrokardiogramu, povečano število monocitov, zvišana raven tropoina I. **Zdravilo Onivyde pegylated liposomal v kombinaciji s 5-fluorouracilom in levkovorinom:** Zelo pogosti: nevtropenija, levkopenija, anemija, trombocitopenija, hipokalciemija, hipomagnezija, dehidracija, zmanjšani apetit, omotica, driska, bruhanje, navzea, bolečine v trebuhu, stomatitis, alopecija, piroksija, periferne edem, vnetje sluznic, utrujenost, astenija, zmanjšana telesna masa. **Pogosti:** sepični šok, sepsa, pljučnica, febrilna nevtropenija, gastroenteritis, oralna kandidoza, limfopenija, hipokalciemija, hiponatriemija, hipofosfatemija, hipostatemija, nespečnost, holinergični sindrom, izgubljen apetit, vnetje sluznic, urtikarija, okužba s kandido, okužba s Clostridium difficile, okužba s herpes simplex, brigitis, parodontitis, pustulozni izpuščaji, sinusitis, okužba zob, vulvovaginalna glivična okužba, peritumoralni edem, pancitopenija, hemolitična anemija, elektrolitsko neravnovesje, hiperkalcemija, celična smrt, hipokloremija, protin, hiperglikemija, hipokalciemija, pomanjkanje železa, podhranjenost, nespečnost, zmedenost, depresija, navzea, napadi, možganska krvavitev, možganska ishemija, shemična možganska kap, anozmija, agezijska, motnje ravnotežja, hipersomnija, hipestezijska, motnje v duševnem razvoju, letargija, akutni miokardni infarkt, palpitacije, hipertenzija, periferne neuropatije, akutno draženje oči, zmanjšana ostrina vida, vtrogavica, angina pectoris, akutni miokardni infarkt, palpitacije, hipertenzija, periferne neuropatije, hematom, fibrozis, orofaringealna bolečina, kašelj, hiperoksemija, vnetje nosu, atelektazija, distonija, pnevmotimna, gastrointestinska toksičnost, obstrukcija dvanajstnika, aritmija in/ali tahikardija, afata, oralna disestezijska, bolečina v ustni votlini, motnje jezika, sindrom razpok, angularni helitis, dishezija, oralna parastezija, zobni keris, erukcija, žlečodne motnje, gastritis, motnje dlasi, boleče desni, hematohexija, hiperstezijska zob, paralični ileus, otekanje ustnic, razjede v ustih, spazem požirnika, parodontalna bolezen, rektalna krvavitev, halangitis, toksični hepatitis, holestaza, hepatična ciroza, pruritus, hiperhidroza, bulozi dermatitis, generalizirani ekfoliativni dermatitis, eritem, toksičnost za nohte, papule, petehije, luskvacija, občutljiva koža, luščenje kože, kožna lezija, teleangiektazija, urtikarija, artralgija, bolečine v hrbtu, bolečine v kosteh, bolečine v okončinah, poliartritis, okvara ledvic, odpoved ledvic, disurija, proletrurija, vulvovaginalna suhost, slabo počutje, splošno poslabšanje telesnega zdravja, vnetje, sindrom večorganske disfunkcije, gripa podobna odpoved, nespečna bolečina v prsnem košu, akutna bolečina, bolečina v vratu, hipotenzija, bolečina, otekel obraz, temperatura intoliranja, keserza, zvišana mediarodno umerjeno razmerje, znižana raven celokupnih beljakovin, zmanjšani ledvični očistek kreatinina, podvišani QT interval na elektrokardiogramu, povečano število monocitov, zvišana raven tropoina I. **Zdravilo Onivyde pegylated liposomal v kombinaciji s 5-fluorouracilom in levkovorinom:** Zelo pogosti: nevtropenija, levkopenija, anemija, trombocitopenija, hipokalciemija, hipomagnezija, dehidracija, zmanjšani apetit, omotica, driska, bruhanje, navzea, bolečine v trebuhu, stomatitis, alopecija, piroksija, periferne edem, vnetje sluznic, utrujenost, astenija, zmanjšana telesna masa. **Pogosti:** sepični šok, sepsa, pljučnica, febrilna nevtropenija, gastroenteritis, oralna kandidoza, limfopenija, hipokalciemija, hiponatriemija, hipofosfatemija, hipostatemija, nespečnost, holinergični sindrom, izgubljen apetit, vnetje sluznic, urtikarija, okužba s kandido, okužba s Clostridium difficile, okužba s herpes simplex, brigitis, parodontitis, pustulozni izpuščaji, sinusitis, okužba zob, vulvovaginalna glivična okužba, peritumoralni edem, pancitopenija, hemolitična anemija, elektrolitsko neravnovesje, hiperkalcemija, celična smrt, hipokloremija, protin, hiperglikemija, hipokalciemija, pomanjkanje železa, podhranjenost, nespečnost, zmedenost, depresija, navzea, napadi, možganska krvavitev, možganska ishemija, shemična možganska kap, anozmija, agezijska, motnje ravnotežja, hipersomnija, hipestezijska, motnje v duševnem razvoju, letargija, akutni miokardni infarkt, palpitacije, hipertenzija, periferne neuropatije, akutno draženje oči, zmanjšana ostrina vida, vtrogavica, angina pectoris, akutni miokardni infarkt, palpitacije, hipertenzija, periferne neuropatije, hematom, fibrozis, orofaringealna bolečina, kašelj, hiperoksemija, vnetje nosu, atelektazija, distonija, pnevmotimna, gastrointestinska toksičnost, obstrukcija dvanajstnika, aritmija in/ali tahikardija, afata, oralna disestezijska, bolečina v ustni votlini, motnje jezika, sindrom razpok, angularni helitis, dishezija, oralna parastezija, zobni keris, erukcija, žlečodne motnje, gastritis, motnje dlasi, boleče desni, hematohexija, hiperstezijska zob, paralični ileus, otekanje ustnic, razjede v ustih, spazem požirnika, parodontalna bolezen, rektalna krvavitev, halangitis, toksični hepatitis, holestaza, hepatična ciroza, pruritus, hiperhidroza, bulozi dermatitis, generalizirani ekfoliativni dermatitis, eritem, toksičnost za nohte, papule, petehije, luskvacija, občutljiva koža, luščenje kože, kožna lezija, teleangiektazija, urtikarija, artralgija, bolečine v hrbtu, bolečine v kosteh, bolečine v okončinah, poliartritis, okvara ledvic, odpoved ledvic, disurija, proletrurija, vulvovaginalna suhost, slabo počutje, splošno poslabšanje telesnega zdravja, vnetje, sindrom večorganske disfunkcije, gripa podobna odpoved, nespečna bolečina v prsnem košu, akutna bolečina, bolečina v vratu, hipotenzija, bolečina, otekel obraz, temperatura intoliranja, keserza, zvišana mediarodno umerjeno razmerje, znižana raven celokupnih beljakovin, zmanjšani ledvični očistek kreatinina, podvišani QT interval na elektrokardiogramu, povečano število monocitov, zvišana raven tropoina I. **Zdravilo Onivyde pegylated liposomal v kombinaciji s 5-fluorouracilom in levkovorinom:** Zelo pogosti: nevtropenija, levkopenija, anemija, trombocitopenija, hipokalciemija, hipomagnezija, dehidracija, zmanjšani apetit, omotica, driska, bruhanje, navzea, bolečine v trebuhu, stomatitis, alopecija, piroksija, periferne edem, vnetje sluznic, utrujenost, astenija, zmanjšana telesna masa. **Pogosti:** sepični šok, sepsa, pljučnica, febrilna nevtropenija, gastroenteritis, oralna kandidoza, limfopenija, hipokalciemija, hiponatriemija, hipofosfatemija, hipostatemija, nespečnost, holinergični sindrom, izgubljen apetit, vnetje sluznic, urtikarija, okužba s kandido, okužba s Clostridium difficile, okužba s herpes simplex, brigitis, parodontitis, pustulozni izpuščaji, sinusitis, okužba zob, vulvovaginalna glivična okužba, peritumoralni edem, pancitopenija, hemolitična anemija, elektrolitsko neravnovesje, hiperkalcemija, celična smrt, hipokloremija, protin, hiperglikemija, hipokalciemija, pomanjkanje železa, podhranjenost, nespečnost, zmedenost, depresija, navzea, napadi, možganska krvavitev, možganska ishemija, shemična možganska kap, anozmija, agezijska, motnje ravnotežja, hipersomnija, hipestezijska, motnje v duševnem razvoju, letargija, akutni miokardni infarkt, palpitacije, hipertenzija, periferne neuropatije, akutno draženje oči, zmanjšana ostrina vida, vtrogavica, angina pectoris, akutni miokardni infarkt, palpitacije, hipertenzija, periferne neuropatije, hematom, fibrozis, orofaringealna bolečina, kašelj, hiperoksemija, vnetje nosu, atelektazija, distonija, pnevmotimna, gastrointestinska toksičnost, obstrukcija dvanajstnika, aritmija in/ali tahikardija, afata, oralna disestezijska, bolečina v ustni votlini, motnje jezika, sindrom razpok, angularni helitis, dishezija, oralna parastezija, zobni keris, erukcija, žlečodne motnje, gastritis, motnje dlasi, boleče desni, hematohexija, hiperstezijska zob, paralični ileus, otekanje ustnic, razjede v ustih, spazem požirnika, parodontalna bolezen, rektalna krvavitev, halangitis, toksični hepatitis, holestaza, hepatična ciroza, pruritus, hiperhidroza, bulozi dermatitis, generalizirani ekfoliativni dermatitis, eritem, toksičnost za nohte, papule, petehije, luskvacija, občutljiva koža, luščenje kože, kožna lezija, teleangiektazija, urtikarija, artralgija, bolečine v hrbtu, bolečine v kosteh, bolečine v okončinah, poliartritis, okvara ledvic, odpoved ledvic, disurija, proletrurija, vulvovaginalna suhost, slabo počutje, splošno poslabšanje telesnega zdravja, vnetje, sindrom večorganske disfunkcije, gripa podobna odpoved, nespečna bolečina v prsnem košu, akutna bolečina, bolečina v vratu, hipotenzija, bolečina, otekel obraz, temperatura intoliranja, keserza, zvišana mediarodno umerjeno razmerje, znižana raven celokupnih beljakovin, zmanjšani ledvični očistek kreatinina, podvišani QT interval na elektrokardiogramu, povečano število monocitov, zvišana raven tropoina I. **Zdravilo Onivyde pegylated liposomal v kombinaciji s 5-fluorouracilom in levkovorinom:** Zelo pogosti: nevtropenija, levkopenija, anemija, trombocitopenija, hipokalciemija, hipomagnezija, dehidracija, zmanjšani apetit, omotica, driska, bruhanje, navzea, bolečine v trebuhu, stomatitis, alopecija, piroksija, periferne edem, vnetje sluznic, utrujenost, astenija, zmanjšana telesna masa. **Pogosti:** sepični šok, sepsa, pljučnica, febrilna nevtropenija, gastroenteritis, oralna kandidoza, limfopenija, hipokalciemija, hiponatriemija, hipofosfatemija, hipostatemija, nespečnost, holinergični sindrom, izgubljen apetit, vnetje sluznic, urtikarija, okužba s kandido, okužba s Clostridium difficile, okužba s herpes simplex, brigitis, parodontitis, pustulozni izpuščaji, sinusitis, okužba zob, vulvovaginalna glivična okužba, peritumoralni edem, pancitopenija, hemolitična anemija, elektrolitsko neravnovesje, hiperkalcemija, celična smrt, hipokloremija, protin, hiperglikemija, hipokalciemija, pomanjkanje železa, podhranjenost, nespečnost, zmedenost, depresija, navzea, napadi, možganska krvavitev, možganska ishemija, shemična možganska kap, anozmija, agezijska, motnje ravnotežja, hipersomnija, hipestezijska, motnje v duševnem razvoju, letargija, akutni miokardni infarkt, palpitacije, hipertenzija, periferne neuropatije, akutno draženje oči, zmanjšana ostrina vida, vtrogavica, angina pectoris, akutni miokardni infarkt, palpitacije, hipertenzija, periferne neuropatije, hematom, fibrozis, orofaringealna bolečina, kašelj, hiperoksemija, vnetje nosu, atelektazija, distonija, pnevmotimna, gastrointestinska toksičnost, obstrukcija dvanajstnika, aritmija in/ali tahikardija, afata, oralna disestezijska, bolečina v ustni votlini, motnje jezika, sindrom razpok, angularni helitis, dishezija, oralna parastezija, zobni keris, erukcija, žlečodne motnje, gastritis, motnje dlasi, boleče desni, hematohexija, hiperstezijska zob, paralični ileus, otekanje ustnic, razjede v ustih, spazem požirnika, parodontalna bolezen, rektalna krvavitev, halangitis, toksični hepatitis, holestaza, hepatična ciroza, pruritus, hiperhidroza, bulozi dermatitis, generalizirani ekfoliativni dermatitis, eritem, toksičnost za nohte, papule, petehije, luskvacija, občutljiva koža, luščenje kože, kožna lezija, teleangiektazija, urtikarija, artralgija, bolečine v hrbtu, bolečine v kosteh, bolečine v okončinah, poliartritis, okvara ledvic, odpoved ledvic, disurija, proletrurija, vulvovaginalna suhost, slabo počutje, splošno poslabšanje telesnega zdravja, vnetje, sindrom večorganske disfunkcije, gripa podobna odpoved, nespečna bolečina v prsnem košu, akutna bolečina, bolečina v vratu, hipotenzija, bolečina, otekel obraz, temperatura intoliranja, keserza, zvišana mediarodno umerjeno razmerje, znižana raven celokupnih beljakovin, zmanjšani ledvični očistek kreatinina, podvišani QT interval na elektrokardiogramu, povečano število monocitov, zvišana raven tropoina I. **Zdravilo Onivyde pegylated liposomal v kombinaciji s 5-fluorouracilom in levkovorinom:** Zelo pogosti: nevtropenija, levkopenija, anemija, trombocitopenija, hipokalciemija, hipomagnezija, dehidracija, zmanjšani apetit, omotica, driska, bruhanje, navzea, bolečine v trebuhu, stomatitis, alopecija, piroksija, periferne edem, vnetje sluznic, utrujenost, astenija, zmanjšana telesna masa. **Pogosti:** sepični šok, sepsa, pljučnica, febrilna nevtropenija, gastroenteritis, oralna kandidoza, limfopenija, hipokalciemija, hiponatriemija, hipofosfatemija, hipostatemija, nespečnost, holinergični sindrom, izgubljen apetit, vnetje sluznic, urtikarija, okužba s kandido, okužba s Clostridium difficile, okužba s herpes simplex, brigitis, parodontitis, pustulozni izpuščaji, sinusitis, okužba zob, vulvovaginalna glivična okužba, peritumoralni edem, pancitopenija, hemolitična anemija, elektrolitsko neravnovesje, hiperkalcemija, celična smrt, hipokloremija, protin, hiperglikemija, hipokalciemija, pomanjkanje železa, podhranjenost, nespečnost, zmedenost, depresija, navzea, napadi, možganska krvavitev, mož



## IDH1

IDH2  
FGFR2  
HER2/neu  
PIK3CA  
NTRK  
BRAF

## ▼ TIBSOVO® 250 mg filmsko obložene tablete: PERSONALIZIRANO ZDRAVLJENJE ZA VEČJO KORIST

Pri predhodno zdravljenih bolnikih s holangiokarcinomom (CCA) in prisotno mutacijo IDH1 R132 Tibsovo (ivosidenib) omogoča:

- podaljšanje mPFS v primerjavi s placebom in 63-% zmanjšanje tveganja za napredovanje bolezni ali smrt ( $p < 0,0001$ )<sup>1</sup>
- dvakrat daljši mOS v primerjavi s placebom in 51-% zmanjšanje tveganja za smrt ( $p < 0,001$ ; RPSFT-prilagojeni)<sup>2</sup>
- obvladljiv profil varnosti.<sup>1-3</sup>

Omogočite svojim bolnikom s CCA in prisotno mutacijo IDH1 R132 **TARČNO ZDRAVLJENJE** z zdravilom TIBSOVO®

▼ Za to zdravilo se izvaja dodatno spremljanje varnosti. Tako bodo hitreje na voljo nove informacije o njegovi varnosti. Zdravstvene delavce naprošamo, da poročajo o katerem koli domnevnem neželenem učinku zdravila.

1. Abou-Alfa GK et al. Lancet Oncol. 2020;21:796-807. 2. Zhu AX et al. JAMA Oncol. 2021;7:1669-1677. 3. Povzetek glavnih značilnosti zdravila Tibsovo 250 mg filmsko obložene tablete, december 2023.

### SKRAJŠAN POVZETEK GLAVNIH ZNAČILNOSTI ZDRAVILA Tibsovo 250 mg filmsko obložene tablete

▼ Za to zdravilo se izvaja dodatno spremljanje varnosti. Tako bodo hitreje na voljo nove informacije o njegovi varnosti. Zdravstvene delavce naprošamo, da poročajo o katerem koli domnevnem neželenem učinku zdravila.

**SESTAVA\***: Ena filmsko obložena tableta vsebuje 250 mg ivosideniba. **TERAPEVTSKE INDIKACIJE\***: V kombinaciji z azacitidinom za zdravljenje odraslih bolnikov z novodoktrirano akutno mieločno levkemijo (AML) s prisotno mutacijo izocitrid dehidrogenaze-1 (IDH1) R132, ki niso primerni za standardno indukcijsko kemoterapijo. V monoterapiji za zdravljenje odraslih bolnikov z lokalno napredovalim ali metastatskim holangiokarcinomom (CCA) s prisotno mutacijo IDH1 R132, ki so bili predhodno zdravljeni z vsaj eno predhodno linijo sistemske terapije. **ODMERJANJE IN NAČIN UPORABE\***: Zdravljenje je treba začeti pod nadzorom zdravnika, ki ima izkušnje z uporabo zdravil za zdravljenje raka. Bolniki morajo imeti pred začetkom jemanja zdravila Tibsovo z ustreznim diagnostičnim testom potrjeno mutacijo IDH1 R132. Pred uvedbo zdravljenja in med zdravljenjem je treba posneti EKG in oceniti celotno krvno sliko in biokemijske izvide krvi. Interval QT, popravljen glede na srčni utrip (QTc), mora biti pred uvedbo zdravljenja manj kot 450 ms. **Priporočeni odmerek pri AML**: 500 mg ivosideniba (2 x 250-mg tableta) peroralno enkrat na dan. Ivosidenib je treba začeti na 1. dan 1. cikla zdravljenja v kombinaciji z azacitidinom v odmerku 75 mg/m<sup>2</sup> telesne površine, intravensko ali subkutano, enkrat dnevno na 1. do 7. dan vsakega 28-dnevnega cikla. Priporočljivo je, da bolniki prejmejo vsaj 6 ciklov zdravljenja. **Priporočeni odmerek pri holangiokarcinom**: 500 mg ivosideniba (2 x 250-mg tableta) peroralno enkrat na dan. Bolniki 2 uri pred in še 1 uro po jemanju tablet ne smejo uživati hrane. Priporočeno so prilagoditve odmerka pri sočasni uporabi z zmernimi ali močnimi zaviralci CYP3A4 in za obvladovanje diferenciacijskega sindroma, levkocitoze, podaljšanja intervala QTc ter neželenih učinkov 3. ali višje stopnje. **KONTRAINDIKACIJE\***: Preobčutljivost na učinkovino ali katero koli pomožno snov, sočasna uporaba z močnimi induktori CYP3A4 ali dagibatranom (glejte Interakcije), prirojeni sindrom podaljšane intervala QT, nenadna smrt ali polimorfna ventrikularna aritmija v družinski anamnezi, interval QT/QTc > 500 ms ne glede na metodo popravka. **OPOZORILO\***: Sindrom diferenciacije pri bolnikih z AML: Brez zdravljenja je sindrom diferenciacije lahko življenje ogrožajoč ali smrten. Bolniki morajo biti obveščeni o znakih in simptomih sindroma diferenciacije. Treba jim je svetovati, naj se ob pojavu le-teh takoj posvetujejo z zdravnikom ter naj imajo vedno pri sebi opozorilno kartico za bolnika. Prekinito zdravljenje z zdravilom Tibsovo, če hudi znaki/simptomi vztrajajo več kot 48 ur po uvedbi sistemskih kortikosteroidov. **Podaljšanje intervala QTc**: Nepravilnosti je treba obravnavati takoj. V primeru značilne simptomatike je treba posneti EKG, kot je to klinično indicirano. V primeru hudega bruhanja in/ali driske je treba oceniti nepravilnosti senuskih elektrolitov. Bolnike je treba obvestiti o tveganju za podaljšanje intervala QT, njegovih znakih in simptomih (palpitacije, omotica, sinkopa ali celo srčni zastoj) in jim svetovati da takoj obvestijo zdravnika, če se ti pojavijo. Pri zdravljenju bolnikov je potrebna previdnost in pozorno spremljanje glede podaljšanja intervala QTc, če ni mogoča uporaba drugega ustreznega zdravljenja namesto zdravil, za katera je znano, da podaljšajo interval QTc, ali zmernih oz. močnih zaviralcev CYP3A4. Pozorno je treba spremljati bolnike s kongestivnim srčnim popuščanjem, elektrolitskimi motnjami oz. če je za obvladovanje znakov/simptomov sindroma diferenciacije klinično indicirano dajanje furosemda. Zdravljenje je treba dokončno ukiniti, če bolniki razvijejo podaljšanje intervala QTc z znaki ali simptomi življenja ogrožajoče aritmije. Ivosidenib je treba pri bolnikih, ki imajo znižane vrednosti albumina oz. imajo majhno telesno maso, uporabljati s previdnostjo. **Huda ledvična okvara**: previdnost pri uporabi in skrbno spremljanje. **Jetrna okvara**: zdravilo je treba uporabljati previdno pri bolnikih z zmerno in s hudo jetrno okvaro (Child-Pugh razreda B in C) in to skupino bolnikov je treba skrbno spremljati. Zdravilo Tibsovo je treba pri bolnikih z blago jetrno okvaro uporabljati previdno (Child-Pugh razred A). **Pomožne snovi**: vsebuje laktozo in natrij (v bistvu „brez natrija“). **INTERAKCIJE\***: Kontraindicirano: močni induktori encima CYP3A4; dagibatran. **Ni priporočljivo**: zmerni ali močni zaviralci CYP3A4; zdravila, za katera je znano, da podaljšujejo interval QTc; substrati OAT3 ali OATP1B1/1B3; substrati CYP3A4, CYP2B6, CYP2C8 ali CYP2C9 z ozkim terapevtskim indeksom, ali substrati CYP2C19; itraconazol ali ketokonazol; substrati UGT. **Previdnostni ukrepi**: hormonski kontraceptivi. **PLODNOST\***. **NOSEČNOST\***: Uporaba ni priporočljiva. **DOJENJE\***: Med zdravljenjem in še vsaj 1 mesec po zadnjem odmerku je treba prenehati z dojenjem. **KONTRACEPCIJA\***: Ženske v rodni dobi morajo pred začetkom zdravljenja z zdravilom Tibsovo opraviti test nosečnosti ter se morajo med zdravljenjem izogibati zanositvi. Med zdravljenjem in še vsaj 1 mesec po zadnjem odmerku je treba uporabljati učinkovito kontracepcijo. **VPLIV NA SPOSOBNOST VOŽNJE IN UPRAVLJANJA STROJEV\***: Blag vpliv. Utrujenost in omotično je treba upoštevati pri oceni bolnikove sposobnosti vožnje in upravljanja strojev. **NEZELENI UČINKI\***: Pri AML: Zelo pogosti: sindrom diferenciacije, levkocitoza, trombocitopenija, neutropenija, nespečnost, glavobol, omotica, bruhanje, bolečina v okončinah, artralgija, bolečina v hrbtu, podaljšanje intervala QT. Pogosti: levkopenija, periferna nevropatija, orofaringealna bolečina. Pri CCA: Zelo pogosti: anemija, zmanjšan apetit, periferna nevropatija, glavobol, ascites, diareja, bruhanje, navzea, bolečina v trebuhu, izpuščaji, utrujenost, zvišanje aspartat aminotransferaze, zvišanje bilirubina. Pogosti: holestatska zlatenica, hiperbilirubinemija, padec, podaljšanje intervala QT, zvišanje alanin aminotransferaze, zmanjšanje števila belih krvnih celic, zmanjšanje števila trombocitov. **PREVELIKO ODMERJANJE\***: Ni na voljo specifične antidote. Bolnike je treba skrbno spremljati in jim zagotoviti ustrezno podporno nego. **FARMAKODINAMIČNE LASTNOSTI\***: Ivosidenib je zaviralec mitranega encima IDH1. Mitran oblika IDH1 pretvarja alfa-ketoglutarat (α-KG) v 2-hidroksioglutarat (2-HG), ki blokira celično diferenciacijo in spodbuja tumorogenezo tako pri hematoloških kot pri nehematoloških malignih boleznih. Mehanizem delovanja ivosideniba pri posameznih indikacijah še ni povsem pojasnjen, razen sposobnosti zaviranja 2-HG in obnavljanja celične diferenciacije. **PAKIRANJE\***: Pakiranje vsebuje 60 filmsko obložene tablete. **NAČIN PREDPISOVANJA IN IZDAJE ZDRAVILA**: Rp/Spec - Predpisovanje in izdaja zdravila je na le recept zdravnika specialista ustreznega področja medicine ali od njega pooblaščenega zdravnika. **DATUM ZADNJE REVIZIJE BESEDILA**: december 2023. **Imetnik dovoljenja za promet**: Les Laboratoires Servier, 50, rue Carnot, 92284 Suresnes cedex, Francija. \*Pred predpisovanjem preberite celoten povzetek glavnih značilnosti zdravila. Celoten povzetek glavnih značilnosti zdravila in podrobnejše informacije so na voljo pri: Servier Pharma d.o.o., Podmišičakova ulica 24, 1000 Ljubljana, [www.servier.si](http://www.servier.si).

Zdravilo je na slovenskem trgu na voljo v tuji ovojnini. Navodilo za uporabo v slovenskem jeziku je priloženo ovojnini skupaj z opozorilno kartico za bolnika. Opozorilna kartica je namenjena bolnikom z AML, ki jim je bilo predpisano zdravilo Tibsovo, da zagotovi dodatne informacije glede pomembnega ugotovljenega tveganja sindroma diferenciacije (objavljena je tudi na spletni strani JAZMP: <http://www.jazmp.si/dokument/>). Informacije o zdravilu v slovenskem jeziku so dostopne na uradni spletni strani <http://www.cbz.si>. Na voljo so tudi na <https://servier-pro.si/>.



TIB AD1 C2 2023-24. Samo za strokovno javnost.  
Datum priprave informacije: maj 2024.



AstraZeneca 

 **MSD**

*Lilly*

**SERVIER**   
*moved by you*

**MEDISON**   
Delivering Innovative Healthcare

 **ewo** **pharma**   
since 1959

**MERCK**

 **avantor**<sup>TM</sup>  
delivered by **VWR**<sup>TM</sup>



