

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

Tanja Marinko ^{1,2}, Manca Pirc ², Špela Plestenjak ², Maja Marinčič ³, Vita Dolžan ³, Katja Goričar ³

¹ Onkološki inštitut Ljubljana, Ljubljana, Slovenija

² Medicinska fakulteta, Univerza v Ljubljani, Ljubljana, Slovenija

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

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

4

Izvleček

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

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

Uvod

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

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

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

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

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

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

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

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

Metode

Klinična raziskava

V prospektivno longitudinalno klinično raziskavo smo vključili bolnice z DCIS, zdravljene z ohranitveno operacijo in pooperativnim obsevanjem na Onkološkem inštitutu Ljubljana med letoma 2019 in 2024 v okviru redne klinične prakse. Vse bolnice so v raziskavo privolile prostovoljno in podale pisno soglasje. Raziskavo je odobrila Komisija Republike Slovenije za medicinsko etiko (KME 0120-54/2015-2 (39/05/15) in 0120-54/2015-11). Pri bolnicah smo opravili klinični pregled ter zbrali vzorce krvi pred začetkom obsevanja in ob koncu obsevanja. Takoj po koncu obsevanja in eno leto po obsevanju smo pri bolnicah ocenili prisotnost neželenih učinkov na koži in na srcu. Za spremljanje neželenih učinkov na koži smo uporabili skupna terminološka merila za neželene učinke (Common Terminology Criteria for Adverse Effects v.5, CTCAE) in lestvico za neželene učinke LENT-SOMA (Late Effects in Normal Tissues/Subjective, Objective, Management and Analytic). Za spremljanje neželenih učinkov na srcu smo uporabili koncentracijo N-konca pro-B-tipa natriuretičnega peptida (NT-proBNP) v serumu in lestvico Newyorškega združenja za srce (New York Heart Association, NYHA) za oceno morebitnega srčnega popuščanja.

Molekularno-genetske metode

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

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

Statistična analiza

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

Rezultati

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

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

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

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

Razprava in zaključek

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

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

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

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

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

Zahvala

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

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

Literatura

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