

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

Simona Kranjc Brezar<sup>1,2</sup>, Maša Omerzel<sup>1,3</sup>, Urša Lamprecht Tratar<sup>1,4</sup>, Tanja Jesenko<sup>1,2</sup>, Barbara Lisec<sup>1</sup>, Gregor Serša<sup>1,3</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> Zdravstvena fakulteta, Univerza v Ljubljani, Ljubljana, Slovenija

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

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

Elektronski naslov: skranjc@onko-i.si

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

**p12** V tej raziskavi smo ovrednotili učinkovitost kombinacije EKT z mišjim analogom anti-PD-1 pri singenih mišjih modelih različnega histološkega tipa in imunskega statusa: fibrosarkom WEHI, dveh kolorektalnih karcinomov CT26 in MC38 ter karcinom dojke 4T1.

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

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

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