

# OBSEVANJE HPV POZITIVNIH TUMORJEV V KOMBINACIJI S CISPLATINOM IN ELEKTROKEMOTERAPIJA RADIOREZISTENTNIH TUMORJEV

Simona Kranjc Brezar<sup>1,2</sup>, Ajda Prevc<sup>1</sup>, Martina Nikšič Žakelj<sup>1</sup>, Gregor Serša<sup>1</sup>, Primož Strojan<sup>3</sup>

<sup>1</sup> Oddelek za eksperimentalno onkologijo, Onkološki inštitut Ljubljana, Zaloška cesta 2, 1000 Ljubljana, Slovenija

<sup>2</sup> Medicinska fakulteta, Univerza v Ljubljani, Vrazov trg 2, 1000 Ljubljana, Slovenija

<sup>3</sup> Oddelek za teleradioterapijo, Sektor radioterapije, Onkološki inštitut Ljubljana, Zaloška cesta 2, 1000 Ljubljana, Slovenija

Elektronski naslov: skranjc@onko-i.si

---

## Izvleček

V raziskavah smo okarakterizirali vpliv okužbe HPV na ploščatocelični karcinom ustnega žrela na radioobčutljivost in sočasno zdravljenje s cisplatinom, določili smo občutljivost radiorezistentnih tumorjev na zdravljenje z elektrokemoterapijo in raziskali molekularne mehanizme vpletene v odziv HPV-pozitivnih in HPV-negativnih tumorjev na navedena zdravljenja.

**Ključne besede:** Humani virus papiloma, ploščatocelični karcinom žrela, radioterapija, frakcionirano obsevanje, elektrokemoterapija, cisplatin, bleomicin

---

## Uvod

Ploščatocelični karcinom velja za najpogostejši histološki tip raka glave in vratu. Poleg kajenja in prekomerne uporabe alkohola, pa v zadnjih letih okužba s humanim virusom papiloma (HPV) predstavlja enega od najpomembnejših vzrokov za nastanek ploščatoceličnega karcinoma ustnega žrela (1, 2). HPV-pozitivni ploščatocelični karcinomi ustnega žrela (HPV-pozitivni) bolje odgovorijo na sočasno radiokemoterapijo na osnovi platine od HPV-negativnih tumorjev, kar odpira možnosti za znižanje intenzivnosti zdravljenja pri teh bolnikih (1). Cilj je ohraniti delež ozdravitev, ki je dosežen s konvencionalnimi dozami obsevanja (frakcionirano obsevanje, skupna doza obsevanja 70 Gy) in sistemske kemoterapije, hkrati pa zmanjšati neželene stranske učinke zdravljenja. Dosedanje predklinične raziskave so pokazale, da so boljši rezultati zdravljenja HPV-pozitivnih tumorjev posledica večje občutljivosti le teh na radioterapijo in nekatere sistemske kemoterapevtike (cisplatin), ki se uporabljajo v kliniki (3, 4). Po drugi strani pa molekularni mehanizmi in stopnja povečanja občutljivosti HPV-pozitivnih celic še niso povsem raziskani. Namen raziskave je bil določiti za koliko lahko znižamo dozo obsevanja pri HPV-pozitivnem mišjem tumorskem modelu (2A3) (glede na standardno dozo), ne da bi s tem zmanjšali učinek (delež ozdravitev) zdravljenja. Prav tako je bil namen raziskati ali je povečana radioobčutljivost HPV-pozitivnih tumorjev posledica razlik v učinkovitosti popravljalnih mehanizmov poškodb DNA. V raziskavi smo primerjali tudi radioobčutljivost tumorjev 2A3 in FaDu, ki so bili sočasno zdravljeni s cisplatinom in s frakcioniranim obsevanjem ali obsevani le z eno samo, izoeftektivno dozo.

Učinkovitost radiokemoterapije je mogoče izboljšati z uporabo lokalnih ablativnih metod, kot je elektrokemoterapija (5-8). Elektrokemoterapija je učinkovit način zdravljenja pri različnih vrstah tumorjev, ki z elektroporacijo poveča vnos kemoterapevtikov (bleomicina ali cisplatina) v celice (9). Učinkovitost elektrokemoterapije je odvisna od pravilnosti izvedbe terapije in lastnosti samih tumorjev. V kliničnih raziskavah so opazili slabši odgovor tumorjev, ki so bili predhodno že zdravljeni s sistemsko kemoterapijo in/ali radioterapijo, najverjetneje zaradi pridobljene intrinzične odpornosti tumorskih celic na kemoterapevtike ali obsevanje (10-12). Ker je malo znanega kako mehanizmi pridobljene intrinzične kemo- in radiorezistence vplivajo na učinkovitost elektrokemoterapije, je bil drugi namen naše raziskave ovrednotiti odziv eksperimentalno induciranih radiorezistentnih celic ploščatoceličnega karcinoma ustnega žrela (FaDu-RR) in njihovih tumorskih ksenograftov.

## Metode

Na humanih celičnih linijah (HPV-pozitivne (2A3), HPV-negativne (FaDu in njena radiorezistentna podlinija FaDu-RR, vzpostavljena s frakcioniranim obsevanjem) smo *in vitro* s testom klonogenosti določili stopnjo njihove občutljivosti: na obsevanje, terapijo s cisplatinom, kombinacijo obeh; na terapijo z bleomicinom ali elektrokemoterapijo z bleomicinom ali cisplatinom. Po terapiji smo določali delež in časovno dinamiko popravila poškodb DNA s kometnim testom in tvorbo žarišč fosforiliranih histonov  $\gamma$ H2AX na DNA. Dodatno smo pri FaDu in FaDu-RR celicah z metodo PCR spremljali razlike v izražanju genov za popravilo poškodb DNA po terapiji. S pretočno citometrijo smo določili spremembe poteka celičnega cikla po terapiji. Z masno spektrometrijo z induktivno sklopljeno plazmo smo primerjali privzem bleomicina in cisplatina po kemo- in elektrokemoterapiji pri FaDu in FaDu-RR celicah. Spremljali smo posredovane učinke sevanja, morfologijo celic po obsevanju in sočasni terapiji s cisplatinom ter ovrednotili delež apoptotičnih in mitotičnih celic po obsevanju HPV-pozitivnih in HPV-negativnih celic. Učinek sočasnega obsevanja in terapije s cisplatinom smo določali tudi pri sferoidih izbranih celičnih linij. Iste humane tumorske celične linije, kot v poskusih *in vitro*, smo uporabili za indukcijo podkožnih ksenograftov na imunsko oslABLjenih miših (SCID). S testom zaostanka v rasti tumorjev smo preverili odziv vseh treh tumorskih modelov na obsevanje in sočasno terapijo s cisplatinom ali elektrokemoterapijo. Določili smo tudi faktor modificiranja doze obsevanja ob sočasni terapiji s cisplatinom pri HPV-pozitivnih tumorjih za doseg enakega učinka zdravljenja kot pri HPV-negativnih tumorjih s standardnimi dozami.

## Rezultati

HPV-pozitivne celice oziroma tumorji so bolj radioobčutljivi kot HPV-negativne celice in tumorji. *In vitro* sta bili celični liniji 2A3 in FaDu enako občutljivi na monoterapijo s cisplatinom, ob sočasni terapiji obsevanja in cisplatina je prišlo do potenciacije učinka obsevanja pri obeh tumorskih celičnih linijah (aditivni učinek, pri 2A3 za faktor 1,2 in pri FaDu za faktor 1,3). *In vivo* je bila učinkovitost dodanega cisplatina večja pri HPV-negativnih tumorjih, vendar je bil skupni učinek še vedno večji pri HPV-pozitivnih tumorjih. Faktor modificiranja doze, izračunan s primerjavo učinkovitosti obsevanja oziroma sočasne terapije obsevanja in cisplatina glede na HPV status tumorja, je znašal 1,3 oziroma 1,2, kar pomeni, da so HPV-pozitivni tumorji za 30 % bolje odgovorili na

radioterapijo ter za 20 % bolje na kombinirano terapijo kot HPV-negativni tumorji. Nadalje, zdravljenje obeh tumorskih modelov s cisplatinom in frakcioniranim režimom obsevanja je povzročilo radiosenzibilizacijo tumorjev: rast tumorja je bila 3- do 4-krat počasnejša kot po obsevanju z eno samo dozo. Sinergistični učinek radiosenzibilizacije je bil po zdravljenju HPV-pozitivnih tumorjev s cisplatinom in frakcioniranim obsevanjem veliko večji kot pri HPV-negativnih tumorjih. Natančneje, po kombiniranem zdravljenju je bilo preživetje miši (100 dni po zdravljenju, kar ustreza 5 letom pri ljudeh) s HPV-pozitivnimi tumorji za 26 % boljše kot pri miših s HPV-negativnimi tumorji. Pri raziskovanju molekularnih/celičnih mehanizmov smo ugotovili, da imajo HPV-pozitivne celice po samem obsevanju in po kombinirani terapiji večji delež dvoverižnih prelomov DNA; tudi popravilo nastalih poškodb je bilo v tej skupini počasnejše. Kombinirana terapija je pri HPV-pozitivnih celicah povzročila njihovo zaustavitev v fazi  $G_2/M$  celičnega cikla; delež apoptotičnih celic je bil večji in mitotičnih celic manjši, kot pri HPV-negativnih celicah. Posredovane učinke sevanja smo opazili le pri HPV-pozitivnih celicah po kombinirani terapiji.

Da bi razjasnili vpliv različnih mehanizmov intrinzične kemo- in radiorezistence tumorjev, izvane s predhodnim obsevanjem, ki bi lahko vplivali na učinkovitost elektrokemoterapije, smo primerjali dve izogeni humani celični liniji z različno občutljivostjo na obsevanje, FaDu in FaDu-RR. Ugotovili smo da ima radiorezistentna celična linija FaDu-RR inducirane obrambne mehanizme, ki so poleg pridobljene radiorezistence vodili tudi do navzkrižne rezistence na cisplatin, ne pa tudi na bleomicin. Radiorezistentne celice FaDu-RR so poleg zmanjšane intracelularnega kopičenja cisplatina (v primerjavi s starševsko celično linijo FaDu) učinkoviteje popravljale določene tipe poškodb DNA ter imele spremenjen spekter izražanja genov za popravilo poškodb DNA. Radiorezistentni tumorji FaDu-RR (0 % popolnih odgovorov) so bili bolj odporni na zdravljenje s frakcioniranim obsevanjem in cisplatinom ter na elektrokemoterapijo s cisplatinom v primerjavi s tumorji FaDu (do 33 % popolnih odgovorov). Elektrokemoterapija z bleomicinom pa je bila pri obeh celičnih linijah oziroma tumorskih modelih (40 % ozdravljenih tumorjev) enako učinkovita.

## Zaključki

HPV-pozitivni tumorski model (2A3) je bolj občutljiv na obsevanje z eno dozo kot HPV-negativni model FaDu. Sočasna terapija s cisplatinom deluje aditivno, ne glede na status HPV. Rezultati kažejo na možnost 20 % znižanje doze obsevanja pri kombinirani terapiji s cisplatinom pri HPV-pozitivnih tumorjih, pri čemer bi dosegli enako učinkovitost, kot jo dosežemo s standardno dozo pri radiokemoterapiji HPV-negativnih tumorjev. Kombinirano zdravljenje s frakcioniranim režimom obsevanja in cisplatinom deluje sinergistično pri HPV-pozitivnem in HPV-negativnem tumorskem modelu, vendar je ta učinek večji pri HPV-pozitivnih tumorjih. Povečana občutljivost HPV-pozitivnih tumorjev na zdravljenje je med drugim posledica višje ravni poškodb DNA, nižje stopnje popravila teh poškodb, zaustavitve celičnega cikla v fazi  $G_2/M$  in večjega deleža apoptoze.

Frakcionirano obsevanje HPV-negativnih tumorskih celic (FaDu-RR) vodi v radiorezistenco in kemorezistenco na cisplatin preko različnih mehanizmov (boljše in hitrejše popravilo poškodb DNA, spremembe v izražanju genov, spremembe v regulaciji celičnega cikla, slabši privzem cisplatina). Zato so bili FaDu-RR tumorji v primerjavi

s FaDu tumorji bolj odporni tudi na elektrokemoterapijo s cisplatinom, vendar enako občutljivi na elektrokemoterapijo z bleomicinom. Zaradi navzkrižne rezistence FaDu-RR celic na cisplatin, je za zdravljenje radiorezistentnih in ponovno izraslih tumorjev po predhodni radioterapiji priporočena uporaba elektrokemoterapije z bleomicinom.

## Zahvala

Vse raziskave so potekale v okviru raziskovalnih programov P3-003, P3-0307 in projekta J3-7460, ki jih financira Agencija za raziskovalno dejavnost Republike Slovenije (ARRS).

## Literatura

1. Marur S, D'Souza G, Westra WH, et al. HPV-associated head and neck cancer: a virus-related cancer epidemic. *Lancet Oncol* 2010; 11(8): 781-9.
2. Johnson DE, Burtneiss B, Leemans CR, et al. Head and neck squamous cell carcinoma. *Nat Rev Dis Prim* 2020; 6(92): 1-22.
3. Ang KK, Harris J, Wheeler R, et al. Human papillomavirus and survival of patients with oropharyngeal cancer. *N Engl J Med* 2010; 363(1): 24-35.
4. Kimple RJ, Smith MA, Blitzer GC, et al. Enhanced radiation sensitivity in HPV-positive head and neck cancer. *Cancer Res* 2013; 73(15): 4791-800.
5. Kranjc S, Cemazar M, Grosel A, et al. Radiosensitising effect of electrochemotherapy with bleomycin in LPB sarcoma cells and tumors in mice. *BMC Cancer* 2005; 5: 115.
6. Kranjc S, Cemazar M, Grosel A, et al. Electroporation of LPB sarcoma cells *in vitro* and tumors *in vivo* increases the radiosensitizing effect of cisplatin. *Anticancer Res* 2003; 23(1 A): 275-81.
7. Kranjc S, Tevz G, Kamensek U, et al. Radiosensitizing effect of electrochemotherapy in a fractionated radiation regimen in radiosensitive murine sarcoma and radioresistant adenocarcinoma tumor model. *Radiat Res* 2009; 172: 677-85.
8. Serša G, Kranjc S, Čemažar M. Improvement of combined modality therapy with cisplatin and radiation using electroporation of tumors. *Int J Radiat Oncol Biol Phys.* 2000; 46(4): 1037-41.
9. Gehl J, Sersa G, Matthiessen LW, et al. Updated standard operating procedures for electrochemotherapy of cutaneous tumours and skin metastases. *Acta Oncol* 2018; 57(7): 874-82.
10. Campana LG, Mali B, Sersa G, et al. Electrochemotherapy in non-melanoma head and neck cancers: a retrospective analysis of the treated cases. *Br J Oral Maxillofac Surg* 2014; 52(10): 957-64.
11. Plaschke CC, Bertino G, McCaul JA, et al. European Research on Electrochemotherapy in Head and Neck Cancer (EURECA) project: Results from the treatment of mucosal cancers. *Eur J Cancer* 2017; 87: 172-81.
12. Bertino G, Sersa G, De Terlizzi F, et al. European Research on Electrochemotherapy in Head and Neck Cancer (EURECA) project: Results of the treatment of skin cancer. *Eur J Cancer* 2016; 63: 41-52.