

Elektromágneses daganatterápiás készülék preklinikai és klinikai vizsgálatai, valamint műszaki továbbfejlesztése: tapasztalatok szolid tumorokkal

DANK MAGDOLNA¹, BALOGH ANDREA², BENEDEK ANETT², BESZTERCEI BALÁZS², DANICS LEA², FORIKA GERTRUD³, GARAY TAMÁS^{1,4}, HAMAR PÉTER², KARÁSZI ÁDÁM¹, KAUCSÁR TAMÁS², KISS ÉVA¹, KRENÁCS TIBOR³, MAJOR ENIKŐ², MOHÁCSI RÉKA¹, PORTÖRŐ ISTVÁN², RUISANCHEZ ÉVA², SCHVARCZ CSABA², SZÁSZ A. MARCELL¹, THOMAS J. MBUOTIDEM², VANCSEK TAMÁS³, ZOLCSÁK ZITA^{2,5}, BENYÓ ZOLTÁN²

Semmelweis Egyetem, ¹Onkológiai Központ, ²Transzlációs Medicina Intézet, ³I. Sz. Patológiai és Kísérleti Rákkutató Intézet, ⁴Pázmány Péter Katolikus Egyetem, Információs Technológiai és Bionikai Kar, ⁵Uzsoki Utcai Kórház, Onkoradiológiai Osztály, Budapest

Pályázati támogatás: Nemzeti Kutatási, Fejlesztési és Innovációs Hivatal, NVKP_16-1-2016-0042

Levelezési cím:

Dr. Benyó Zoltán, MD, PhD, DSc, egyetemi tanár,
Semmelweis Egyetem, Transzlációs Medicina Intézet,
1094 Budapest, Tűzoltó u. 37-47., levélcím: 1428 Budapest,
Pf. 2. Tel.: [+36-1] 210-0306, fax: [+36-1] 334-3162,
e-mail: benyo.zoltan@med.semmelweis-univ.hu

Közlésre érkezett:

2019. november 4.

Elfogadva:

2019. november 28.

A kutatás célja elektromágneses daganatterápiás eszköz fejlesztése konzorcialis együttműködésben a Semmelweis Egyetem és az Oncotherm Kft. között, ennek során preklinikai, klinikai és fejlesztési modulok segítségével, *in vivo*, *in vitro* vizsgálatokkal és pácienseken végzett kezelésekkal adatokat szolgáltatni és hozzájárulni a következő generációs készülék fejlesztéséhez. Számos preklinikai vizsgálatunk az mEHT hatásosságát támasztja alá. Klinikai kezeléseket 181 betegnél történtek inoperábilis és/vagy oligometasztatikus állapotban, szolid daganatokban. Kidolgozásra kerültek a protokollok, elkészült egy nemzetközi guideline, a készülékfejlesztés tervezett lépései megvalósultak. A korábbi szelektív rádiófrekvenciás módszereket a legújabb kutatási eredmények alapján optimalizálva a legmodernebb, evidenciaalapú kezelést nyújthatjuk a jövőben. *Magy Onkol* 63:354-358, 2019

Kulcsszavak: modulált elektrohipertermia (mEHT), szolid daganatok, sejtkultúra, állatmodell, kezelés

Our objective was to develop an electromagnetic tumor therapy device in a consortial cooperation between Semmelweis University and Oncotherm Ltd., to provide data and contribute to the development of the next generation of devices through preclinical, clinical and developmental modules via in vivo, in vitro studies, and patient treatments. Our numerous preclinical studies support the efficacy of mEHT. Clinical treatments were performed in 181 patients with inoperable and/or oligometastatic solid tumors. The protocols were developed, an international guideline was completed, and the planned steps of device development were realized. By optimizing previous selective RF techniques based on recent research findings, we can provide the most modern evidence-based treatment in the future.

*Dank M, Benedek A, Besztercei B, Danics L, Forika G, Garay T, Hamar P, Karászi Á, Kaucsár T, Kiss É, Krenács T, Major E, Mohácsi R, Portörő I, Ruisanchez É, Schvarcz C, Szász AM, Thomas JM, Vancsik T, Zolcsák Z, Benyó Z. Preclinical and clinical investigation and development of electromagnetic oncological device – experience with solid tumors. *Magy Onkol* 63:354-358 2019*

Keywords: modulated electro-hyperthermia (mEHT), solid tumors, cell culture, animal model, treatment

BEVEZETÉS

A modulált elektrohipertermia (kereskedelmi név: onco-thermia) egy alternatív terápiás eljárás, mely nem invazív kiegészítő kezelésként alkalmazható tumoros megbetegedésekben (1). Az mEHT során az elektromos tér hőhatást generál, mely a malignus szövetekre jellemző, a normálistól eltérő metabolikus aktivitás (fokozott tejsavtermelés; Warburg-effektus) következtében a tumorsejtek környezetében szelektíven fejti ki a hatását (2).

IN VITRO MODELLEK

A modulált elektrohipertermia a sejtmembránok károsodásán keresztül DAMP („damage-associated molecular pattern”) kialakításával hozzájárul ahhoz, hogy az antigénprezentáló sejtekkel (APC) közvetített immunogén sejthalál apoptózison keresztül alakuljon ki (3). B16-F10 egér melanómasejtekben laboratóriumi kezelésre fejlesztett ún. LabEHY-100 készülékkel ugyancsak megfigyelhető volt ez a hatás (4), és számos tényező járult hozzá ahhoz, hogy az immunrendszer aktívan felismerje és eliminálja a tumorsejteket (5, 6), egyebek mellett melanóma-sejtvonalakban az intracelluláris Hsp70 mellett a membránkötött Hsp70 kifejeződése is (7).

Korábban kimutattuk, hogy az mEHT az immundeficiens egerek kolorektális adenokarcinóma xenograftjában stresszreakciót, apoptózist és immunsejt-infiltrációt okoz. *In vitro* C26-os egér eredetű kolorektális adenokarcinóma és B16-F10 melanóma sejtvonalakon teszteltük az mEHT hatását, megalapozandó a későbbi immunkompetens állatmodellek használatát.

Szubkonfluens C26 kolorektális és B16-F10 melanóma tumorsejtvonalakat 60 perces 42 °C-os mEHT-nek tettük ki egy, illetve két, egymást két órával követő alkalommal. Az utolsó kezelést követően 24 óra múlva fixált sejtkultúrákon hematoxilin-eozin (HE) festést és kalretikulin-, ill. kaszpáz-3-immunfestést végeztünk.

Ismételt kezelés után a mitotikus aktivitás szinte teljes hiánya és lényeges sejtpusztulás volt megfigyelhető mindkét sejtvonalnál, ami a C26 esetében markánsabbnak mutatkozott a HE-festések alapján. A kalretikulin endoplazmás retikulumból való felszabadulása és membránba történő relokalizációja erős stresszhatásra utalt, míg a hasított kaszpáz-3-ra pozitív sejtek számának emelkedése apoptózisra.

A tanulmányban az mEHT mind a C26 kolorektális karcinóma, mind pedig a B16-F10 melanóma sejtvonalon konzervatív stresszválaszt és ezzel összefüggésbe hozható, feltételezhetően apoptotikus sejtpusztulást indukált (3, 8).

IN VIVO MODELLEK

Modulált elektrohipertermia hatása endotélsejtekre *in vivo* matrigel plug modellben

Az irodalmi adatok általában az mEHT tumorra, tumorsejtekre gyakorolt hatását tárgyalják. Jelenleg az erek funkcionális és morfológiai tulajdonságaira, valamint az érújdonképződésre kifejtett lehetséges hatásai jórészt feltáratlanok. Kísérleteket

terveztünk annak vizsgálatára, hogy az mEHT milyen hatással van az érújdonképződésre és milyen biológiai folyamatok állhatnak annak hátterében. Ehhez C57Bl/6 hím, 8–10 hetes egerek jobb és bal oldali ágyékrégiójába 0,5 ml fibroblaszt növekedési faktort (600 ng/ml) tartalmazó matrigel injektáltunk. Az injektálást követő harmadik, ötödik, hetedik napon a jobb oldali plug-ot 30 percig kezeltük legfeljebb 42 °C-os mEHT-vel. A 8. napon a plug-okat eltávolítottuk, egysejtes szuszpenziót készítettünk belőlük Liberase TM enzimkeverékkel, majd a sejtszám meghatározása után a sejteket megfestettük fluoreszcens antitestekkel és a mintáinkat áramlási citométerrel analizáltuk. A plugokban megmértük a hemoglobintartalmat, és vizsgáltuk a véráramlást laser speckle módszerrel.

Az mEHT hatására szignifikáns Hsp70-expressziót tudunk kimutatni, ami bizonyítja a kezelésre adott stresszválasz kialakulását a kezelt plugban. Míg a teljes sejtpopuláció Hsp70-expressziója háromszorosára emelkedett a kezeletlen plug-ban mért értékhez viszonyítva, az endotélsejtekben ez a növekedés hússzoros volt. Két további stresszválaszgén (hasított kaszpáz-3 és CHOP) expressziója csökkent a kezelés hatására, ezzel egy időben az endotélsejtszámban szignifikáns emelkedést mértünk. A hemoglobinkoncentráció szignifikánsan nőtt, a véráramlás fokozódott a kezelt oldali plugokban, jelezve az erezettség fokozódását mEHT hatására.

Eredményeink arra utalnak, hogy az mEHT kedvezően hat az endotélsejtek életképességére, ellensúlyozva a matrigel plug oxigén- és tápanyaghiányos mikrokörnyezetét (9). További kísérleteket tervezünk annak vizsgálatára, hogy ezek a folyamatok milyen hatással vannak a tumorok angiogenezisére és metasztázisképző hajlamára.

Modulált elektrohipertermia alkalmazása tripla-negatív emlőtumor kísérletes állatmodelljében

A tripla-negatív emlőrák (TNBC) egy kiemelkedően agresszív, és – mivel nem expresszálja a terápia során jelenleg molekuláris célpontként alkalmazott receptorok (ösztrogén-, progeszteronreceptor és humán epidermális növekedési faktor receptor-2) egyikét sem – rossz prognózisú molekuláris szubtípusa az emlő daganatainak. Ezért a TNBC intenzív vizsgálat tárgya az onkológiai kutatások körében. Célzott terápia hiányában a kiegészítő kezeléseknél (pl. mEHT) fontos szerepe lehet.

Kísérleteinkben a TNBC széles körben alkalmazott kísérletes egérmodelljén alkalmaztunk modulált elektrohipertermiát és vizsgáltuk hatásait. Az eltérő áttétképző képességű 4T1 és 4T07 tumorsejtek Balb/c egerek 4. emlőmirigyébe injektálásával olyan immunkompetens tumoros állatmodellét hoztunk létre, mely klinikopatológiájában igen hasonló a humán tripla-negatív emlőrákhoz.

A kialakult tumorok méretét ultrahangkészülékkel és digitális kaliper segítségével követtük nyomon. A modulált elektrohipertermiás kezeléseket 48 óránként ismételve (2–5 alkalommal) végeztük, alkalmanként 30 percig, átlagosan 0,7 W

teljesítmény alkalmazása mellett. Hőérzékeny szenzorok segítségével detektáltuk a kezelés alatt a tumor feletti bőr, a rektum, valamint a fűtőpad és a környezet hőmérsékletét. A kezelések hőmérséklet-vezérelt módon történtek, a leadott teljesítményt úgy állítottuk be, hogy a tumor feletti bőr hőmérséklete 40 °C legyen. Előzetes méréseink alapján ez a teljesítmény a tumorban 42 °C hőmérsékletet eredményezett. Az állatok a kezelések és a mérések alkalmával izoflurán anesztéziában részesültek. A kezeléseket követően az állatokat eutanáziában részesítettük és a tumorokat kimetszettük, további molekuláris vizsgálatok céljából.

Az ágyéki régióban elhelyezkedő tumor kezelése kezdetben sok nehézségbe ütközött, a rendelkezésre álló kisállatkezelő készülék (LabEHY-100) és a hozzá tartozó szövetelektroda nem volt alkalmas az általunk vizsgálni kívánt emlőtumormodell kezelésére. A kezdeti kezelőberendezés hatékonysága változó volt, és a hozzá tartozó szövetelektroda sem méretében, sem kialakításában nem volt optimális. A szövetelektroda mérete miatt az mEHT-kezelés szisztémás hőmérséklet-emelkedést eredményezett, emellett nagy, lapos felülete miatt nem tudott megfelelően illeszkedni a lágyékban elhelyezkedő tumor felületéhez (1. ábra).

Az Oncotherm Kft. szakembereivel közösen új kisállatkezelő eszközt fejlesztettünk (LabEHY-200 oszlopelektrodával), mely kifejezetten alkalmas rágcsőkon végzett mEHT-kezelés kivitelezéséhez. A szövetelektroda helyett kifejlesztésre került egy új, ergonomikus oszlopelektroda, mely méretében rágcsőkre lett optimalizálva, és felszíne tökéletesen képes adaptálódni a kezelendő felülethez (2. ábra).

A készülék fejlesztésének köszönhetően sikeres, reprodukálható és lokális kezeléseket tudunk végezni az egereken. A sikeres kezelések hatására többször ismételt mEHT alkalmazása esetén a tumornövekedés jelentős csökkenését tapasztaltuk, valamint markáns szövetpusztulást a kimetszett tumorok szövettani vizsgálata során, összehasonlítva az állekkelést kapott állatokkal.

Kísérleti eredményeink összegzéseként elmondhatjuk, hogy a továbbfejlesztett LabEHY-200 kisállatkezelő berendezéssel eredményesen tudtuk kezelni az inguinális régióban elhelyezkedő emlőtumorokat modulált elektrohipertermiával. A kezelés már monoterápiában is képes volt lassítani a tumornövekedést és tumorspecifikus szövetkárosodást előidézni.

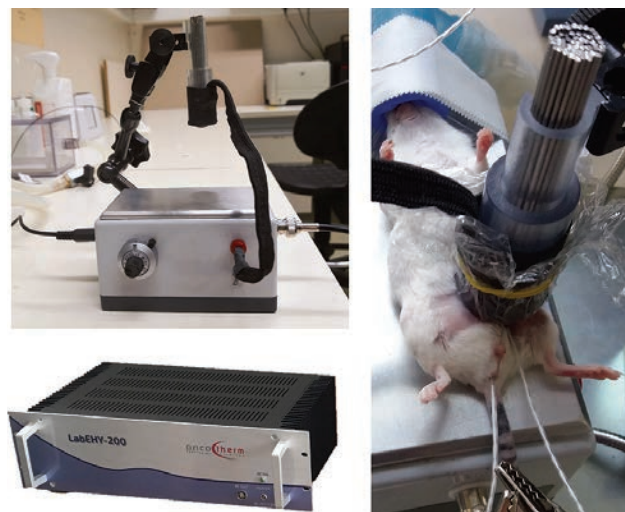
Molekuláris biológiai vizsgálataink arra utalnak, hogy a tumorsejtpusztulást hő sokkválasz előzi meg, majd a tumor közepe elhal és a még élő tumorsejtek szaporodóképessége is lecsökken. Eredményeink alapján a modulált elektrohipertermia alkalmas kiegészítő kezelés lehet tripla-negatív emlőrák kezelésében.

KLINIKAI TAPASZTALATOK ÉS KEZELÉSEK

A klinikai adatgyűjtés a készülékfejlesztéshez szervesen illeszkedik. A betegek kezelés közbeni észrevételei, panaszai, mellékhatásai rögzítésre kerültek, és megállapítottuk, hogy olyan kedvező a mellékhatásprofil, amelyben mindössze



1. ÁBRA. A LabEHY-100 készülék apparátusa és működése

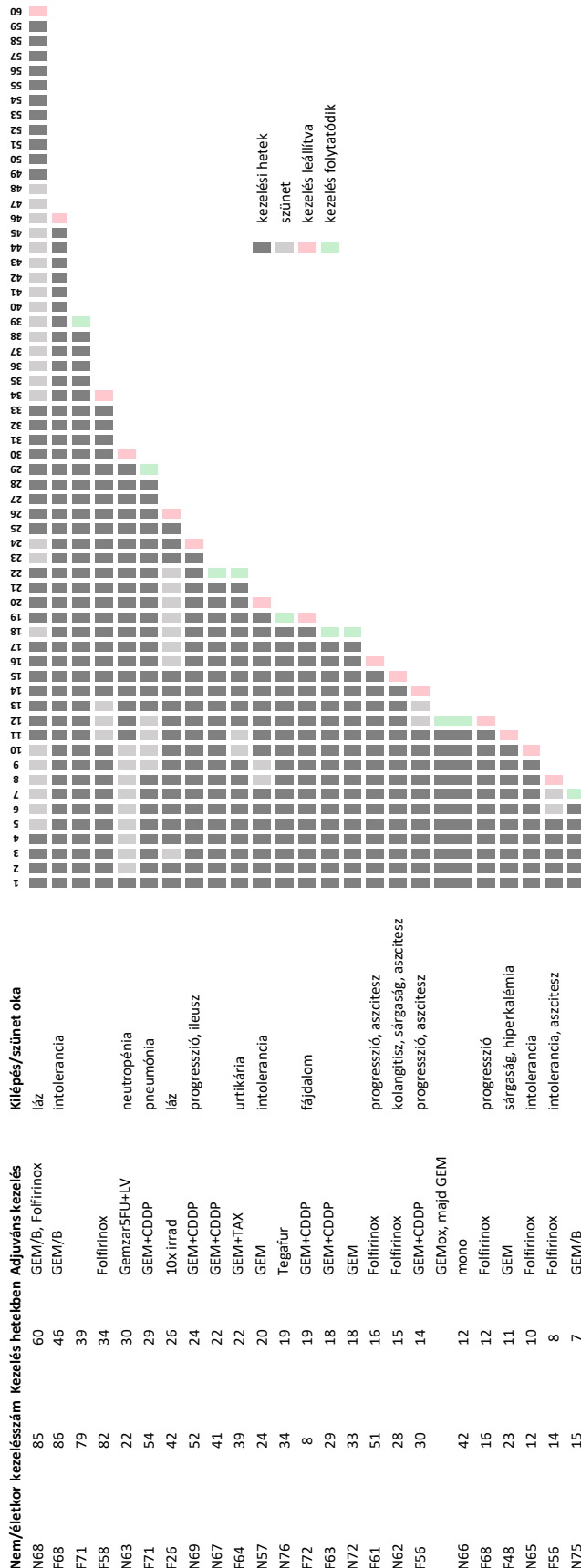


2. ÁBRA. A LabEHY-200 készülék és alkalmazása

bőreritéma alakult ki 63%-ban átmenetileg valamely kezelés során, ami szanálódott, mélyebb erózió keletkezett egy betegnél.

Az első év (2017) folyamán 53 beteget kezeltünk, vegyes populációban: nyelőcső-, vastag- és végbél-, máj-, epeúti, hasnyálmirigy-, emlő-, tüdő-, méhnyak-, vese-, petefészek- és prosztataadaganattal. Azt találtuk, hogy a hasnyálmirigy-tumoros betegekben a túlélési idő növekvő tendenciát mutatott, de a CA19-9 vagy a CEA tumormarkerek nem voltak prediktívek a kezelésre adott válaszra, azonban a tumorterheléssel és -progresszióval egyenes arányban voltak (10).

Az első év klinikai tapasztalatai és széles körű nemzetközi összefogás alapján megszületett a guideline, ami a modulált elektrohipertermia klinikai megközelítését és felfogását tükrözi (11).



3. ÁBRA. Huszonnégy mEHT-kezelt hasnyálmirigy-tumoros beteg összefoglaló adatai. A diagram a kezelésben töltött heteket jelöli, a leghosszabbtól a legrövidebbben kezelt betegig (fentről lefelé). Az egyes négyzetek egy-egy hetet jelentenek (sötét: kezelés, világos: szünet, zöld: cenzorált, piros: végpont)

A második évben (2018) 41 további beteg került bevonásra, hasnyálmirigy-tumorról 24 új beteget kezeltünk (3. ábra). A medián túlélés 20 hét volt az mEHT-kezelt betegekben, 22 hét átlagos túléléssel (12). Ebben az évben a tapasztalatok összegyűjtésével a klinikai kezelési protokollok összesítése és közlése megtörtént (13).

A harmadik évben (2019) 36 (emlő-, prosztatata-, cervix-, kolorektális tumoros vagy májjáttétes) daganatos beteg mellett folytatódott a hasnyálmirigy-tumoros betegek kezelése 51 további páciens bevonásával (2019. október 31. dátummal összesen 87). E betegek primer tumorát NanoString PanCancer Immune Panel génexpressziós vizsgálatnak vetjük alá, rendszeres PET/CT képalkotással, életminőség-kérdőívekkel és vérvizsgálatokkal követjük a betegeket. Utóbbit Beckman-Coulter CytoFLEX készülékkel végezzük, és a betegek immunsejtjeinek profilozását (CD3, CD4, CD8, CD19, CD56).

Azt találtuk, hogy a kezelésre reagáló, hosszú távon (3 hónap felett) terápiában részesült betegeink immunrendszere stabilitást mutat, a B-, CD4+ és CD8+ T-sejtek, NKT- és NK-sejtek, monociták kisebb eltéréseket, többnyire kismértékű emelkedést mutattak (14). A kezelés elején vett vérminták elemzésével, ugyanezen módszerrel megkíséreltük elkülöníteni a rossz és jó prognózisú, azaz a kezelésre nem reagáló és reagáló betegeket is (15). A modulált elektrohipertermia klinikai vizsgálatait összegeztük egy áttekintő közleményben (16).

Mellékhatásprofil tekintetében nem tapasztaltunk a betegeknél súlyos mellékhatást, az esetek 35%-ában talákoztunk bőrpírral, két esetben kellett a kezelésben emiatt két hét szünetet beiktatni. Hasi folyadékgyülem fokozódása miatt diffúz hasi fájdalmat tapasztaltunk a progrediáló tumorról bíró betegeknél.

KÉSZÜLÉKFEJLESZTÉS

A Semmelweis Egyetemen elért kutatási eredményeket a pályázatban részt vevő ipari partner, az Oncotherm

Kft. beépíti legújabb fejlesztésébe, és a pályázat lezárásáig kialakítja a vállalt prototípus berendezést. Ehhez egyértelmű kutatási eredményeket kap az egyetemről, preklinikai és klinikai vizsgálati eredmények formájában, melyeket a fentiekben foglaltunk össze. A fejlesztési szempontrendszereknek megfelelően az ISO 13485 gyártási szabvány követelményrendszerével a cég elkészíti a gyártási dokumentációt és kialakul a gyártás folyamata. A medikai eszköz európai direktívájának megfelelő CE-engedélyeztetés után a készülék piacra kerül. A piaci bevezetésre a kutatás fenti irányait megszabó, megfelelő igényfelmérés alapján kerül sor. A fenntartási időszak intenzív marketingmunkája alakítja a piac befogadóképességét, melyet a jelenlegi nagy érdeklődés alapján igen jónak becsülünk. A felhasznált újdonság preklinikai oldalról az apoptózisindukció elektromágneses stimulálása, melynek hatását emlő-, hasnyálmirigy-, vastagbél-, nem kissejtes tüdőrák, melanóma és

májtumor komplex vizsgálataiban mutatta meg az egyetemnek a projektben részt vevő kutatógárdája. Az ezekről szóló konferencia-előadások és publikációk, illetve a magas színvonalú disszertációk segítik a piacra vitelt és egyben új dimenziókat nyitnak az oktatás számára az alkalmazott kutatások és a tudástranszfer terén. A kutatásokhoz kapcsolódó klinikai vizsgálatok egyrészt validálják a preklinikai eredményeket, másrészt alapul szolgálnak a magas szintű klinikai kezelésekhez, és jó kiindulást jelentenek az evidenciákra alapuló orvoslás folyamatában végzett klinikai vizsgálatokhoz is. A Semmelweis Egyetem vizsgálatainak nemzetközi visszhangja abban is megmutatkozik, hogy több európai és ázsiai egyetem is kifejezte érdeklődését a közös munka iránt.

Etikai engedélyek: preklinikai modul – PEI/001/2706-13/2014, PE/EA/50-2/2019, PE/EA/51-2/2019 klinikai modul – SE-TUKEB_8_2017

IRODALOM

1. Fiorentini G, Szasz A. Hyperthermia today: electric energy, a new opportunity in cancer treatment. *J Cancer Res Ther* 2:41–46, 2006
2. Andocs G, Renner H, Balogh L, et al. Strong synergy of heat and modulated electromagnetic field in tumor cell killing. *Strahlenther Onkol* 185:120–126, 2009
3. Vancsik T, Kovago C, Kiss E, et al. Modulated electro-hyperthermia induced loco-regional and systemic tumor destruction in colorectal cancer allografts. *J Cancer* 9:41–53, 2018
4. Major E, Benedek A, Besztercei B, et al. Enhanced cell killing in B16F10 melanoma cell line by combining chemotherapy with conventional or modulated electro-hyperthermia. *Frigyes Korányi Science Forum – RECOOP Student Conference*, Budapest, 2018
5. Besztercei B, Major E, Benedek A, et al. The effect of modulated electro-hyperthermia on B16-F10 melanoma tumor growth. *Cancer Res* 78(13 Suppl):abstr 196, 2018
6. Mathew A, Besztercei B, Benedek A, et al. Protocol for studying the effect of modulated electrohyperthermia on melanoma in a mouse model. *Frigyes Korányi Science Forum – RECOOP Student Conference*, Budapest, 2018
7. Balogh A, Benedek A, Besztercei B, et al. mEHT as an effective treatment modality for melanoma. 36th Conference of the International Clinical Hyperthermia Society, Budapest, 2018
8. Vancsik T, Major E, Kiss E, et al. A modulált elektro-hipertermia hatásának vizsgálata C26 colorectalis és B16F10 melanoma tumorsejtvonalakon in vitro. *Magy Onkol* 61(Suppl):76, 2017

9. Besztercei B, Benedek A, Major E, et al. Modulált elektrohipertermia hatása endotélsejtekre. *Magyar Élettani Társaság Vándorgyűlése*, Szeged, 2018
10. Borbenyi E, Szasz A, Muhl D, et al. Modulated electro-hyperthermia in oligometastatic cancer patients: initial experience and clinicopathologic evaluation. *European Society for Hyperthermic Oncology Conference*, Athens, 2017
11. Szasz A, Arkosy P, Arrojo E, et al. Guideline For local hyperthermia treatment in oncology. In: *Oncological Hyperthermia*. Ed: Szasz A, Cambridge Scholars Publishing, 2019
12. Szasz A, Borbenyi E, Mohacs R, et al. Modulated electro-hyperthermia in pancreatic cancer patients: initial experience and clinicopathologic evaluation. 32nd Annual Meeting of the European Society for Hyperthermic Oncology, Berlin, 2018
13. Szasz AM. Conventional, „standard” chemotherapy protocols for modulated electro-hyperthermia (mEHT, trade name: mEHT®). *Oncothermia Journal* 25:131–209, 2019
14. Karászi Á, Szasz AM, Borbenyi E, et al. Effects of modulated electro-hyperthermia on peripheral white blood cell counts – a pilot study. 38th Conference of the International Clinical Hyperthermia Society, Thessaloniki, 2019
15. Szasz AM, Karászi Á, Borbenyi E, et al. Effects of modulated electro-hyperthermia on peripheral white blood cell counts of clinically responding and non-responding patients. 38th Conference of the International Clinical Hyperthermia Society, Thessaloniki, 2019
16. Szasz AM, Minnaar CA, Szentmártoni G, et al. Review of the clinical evidences of modulated electro-hyperthermia (mEHT) method: an update for the practicing oncologist. *Front Oncol* 9:1012, 2019