

Hipertermija u liječenju malignih tumora: biološki mehanizmi, primjena i napredak u terapiji

Barić, Helena Marta

Undergraduate thesis / Završni rad

2023

Degree Grantor / Ustanova koja je dodijelila akademski / stručni stupanj: **University of Zagreb, Faculty of Science / Sveučilište u Zagrebu, Prirodoslovno-matematički fakultet**

Permanent link / Trajna poveznica: <https://um.nsk.hr/um:nbn:hr:217:369135>

Rights / Prava: [In copyright](#)/[Zaštićeno autorskim pravom.](#)

Download date / Datum preuzimanja: **2024-12-23**



Repository / Repozitorij:

[Repository of the Faculty of Science - University of Zagreb](#)



Sveučilište u Zagrebu
Prirodoslovno-matematički fakultet
Biološki odsjek

Helena Marta Barić

**Hipertermija u liječenju malignih tumora:
biološki mehanizmi, primjena i napredak u
terapiji**

Završni rad

Zagreb, 2023.

University of Zagreb
Faculty of Science
Department of Biology

Helena Marta Barić

**Hyperthermia in the treatment of malignant
tumors: biological mechanisms, application
and progress in therapy**

Bachelor thesis

Zagreb, 2023

Ovaj završni rad je izrađen u sklopu studijskog programa Molekularna biologija na Zavodu za animalnu fiziologiju Biološkog odsjeka Prirodoslovno-matematičkog fakulteta u Zagrebu, pod mentorstvom prof. dr. sc. Nade Oršolić.

TEMELJNA DOKUMENTACIJSKA KARTICA

Sveučilište u Zagrebu
Prirodoslovno-matematički fakultet
Biološki odsjek

Završni rad

Hipertermija u liječenju malignih tumora: biološki mehanizmi, primjena i napredak u terapiji

Helena Marta Barić

Rooseveltov trg 6, 10000 Zagreb, Hrvatska

Hipertermija je terapijski oblik u kojem se temperatura tkiva podiže iznad fiziološke na određeno vrijeme. Primjena blage hipertermije (40 – 43 °C) može izazvati subletalne uvjete u tumorima i često se koristi kao dodatak radio- i kemoterapiji. Kemoterapeutike dijelimo na one koji ne ovise o temperaturi, one koji uz hipertermiju imaju aditivni učinak i one koji imaju sinergistički učinak. Hipertermija onesposobljava mehanizme popravka DNA, čime pojačava učinkovitost ovih terapija. Nadalje, na povišenu temperaturu posebno su osjetljive radiootporne stanice u osiromašenom okruženju. Blaga hipertermija na imunski sustav utječe poput vrućice te sudjeluje u novačenju limfocita u tumore, povećava osjetljivost tumorskih stanica i potiče povećanu ekspresiju proteina toplinskog šoka. Hipertermiji može biti izloženo cijelo tijelo ili samo dio, pa možemo govoriti o sustavnoj ili lokalnoj hipertermiji. Hipertermija se može postići vodenom kupelji, hladnim izvorom svjetlosti, primjenom laserske svjetlosti u bliskom infracrvenom području, fokusiranim ultrazvukom i uređajima za kapacitivnu hipertermiju. Iako su jasno vidljive prednosti korištenja hipertermije u liječenju malignih oboljenja, ova terapija nije još široko rasprostranjena poput radio- i kemoterapije.

Ključne riječi: rak, imunologija, onkologija, limfociti, proteini toplinskog šoka, radioterapija
(27 stranica, 6 slika, 2 tablice, 33 literaturnih navoda, jezik izvornika: hrvatski)
Rad je pohranjen u Središnjoj biološkoj knjižnici

Mentor: prof. dr. sc. Nada Oršolić

BASIC DOCUMENTATION CARD

University of Zagreb
Faculty of Science
Department of Biology

Bachelor thesis

Hyperthermia in the treatment of malignant tumors: biological mechanisms, application and progress in therapy

Helena Marta Barić

Rooseveltova trg 6, 10000 Zagreb, Croatia

Hyperthermia is a therapeutic modality in which tissue temperature is elevated above the physiological range for a defined period of time. Mild hyperthermia (40 – 43 °C) can induce sublethal conditions in tumors and is often used as an adjunct to radiotherapy and chemotherapy. Chemotherapeutic agents can be categorized into those that are temperature-independent, those that have an additive effect with hyperthermia, and those that exhibit a synergistic effect. Hyperthermia impairs DNA repair mechanisms, thereby enhancing the effectiveness of these therapies. Furthermore, heat-sensitive radioresistant cells in a deprived environment are particularly vulnerable to elevated temperatures. Mild hyperthermia affects the immune system similarly to fever, recruiting lymphocytes to tumors, increasing the sensitivity of tumor cells, and promoting increased expression of heat shock proteins. Hyperthermia can be applied to the whole body or on a specific part, leading to systemic or local hyperthermia. Hyperthermia can be achieved using a water bath, cold light sources, near-infrared laser, focused ultrasound, and capacitive hyperthermia devices. Despite the clear advantages of using hyperthermia in the treatment of malignant conditions, this therapy is not yet as widely adopted as radiotherapy and chemotherapy.

Keywords: cancer, immunology, oncology, lymphocytes, heat shock proteins, radiotherapy
(27 pages, 6 figures, 2 tables, 33 references, original in: croatian)

Thesis is deposited in Central Biological Library.

Mentor: Prof. Nada Oršolić, PhD

Sadržaj

1. Uvod.....	1
2. Učinci hipertermije na organizam	1
3. Proteini toplinskog šoka.....	3
3. Onkoimunologija	6
4. Hipertermija kao imunomodulator	9
5. Termalna radiosenzitizacija	11
6. Interakcija između hipertermije i kemoterapije	14
7. Mehanizmi postizanja hipertermije	17
8. Napredak u terapiji.....	19
9. Zaključak	22
10. Literatura.....	24

1. Uvod

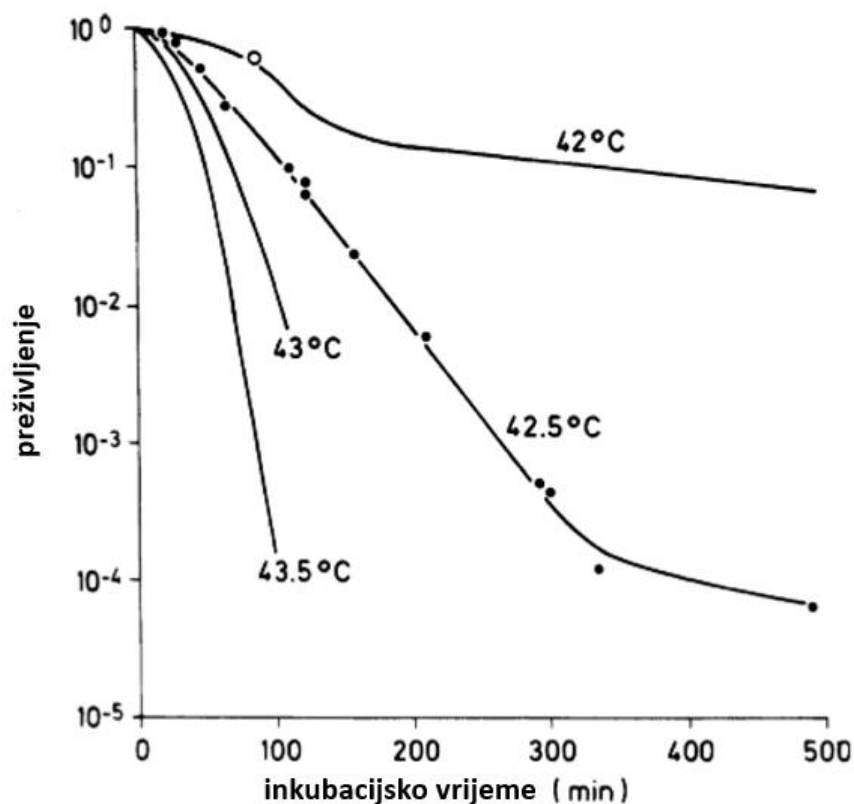
Hipertermija u onkologiji predstavlja tretman liječenja malignih tumora povišenom temperaturom u rasponu 40 – 43 °C kao dodatak drugim tretmanima, kao što su radioterapija ili kemoterapija (Hildebrandt i sur., 2002). Ova blaga hipertermija u mogućnosti je izazvati subletalne učinke na ciljane regije, što može rezultirati posljedicama povoljnima na razini tkiva i stanice (Priester i sur., 2021). Ova metoda oslanja se na činjenicu da su, zbog loše vaskulature, tumori puno osjetljiviji na povišenu temperaturu u odnosu na normalno tkivo (Priester i sur., 2021). Terapija hipertermijom vrlo je stara metoda liječenja raka, a prvi se put spominje 5000 godina pr. Kr. U staroj je Grčkoj Hipokrat imao mišljenje da su svi tumori koje hipertermija ne može izliječiti uistinu neizlječivi. Sredinom dvadesetog stoljeća počela se istraživati biološka pozadina iza ove terapije (Datta i sur., 2020). Dosadašnja istraživanja temelje se na utjecaju hipertermije na signalne puteve uključene u odgovor na toplinski stres, regulaciju staničnog ciklusa, apoptozu, opskrbu tumora kisikom i hranjivim tvarima i imunski odgovor. Hipertermija ne može zamijeniti radio- i kemoterapiju, ali značajno doprinosi njihovoj učinkovitosti (Hildebrandt i sur., 2002). Statistički podaci pokazali su da je uz samu radioterapiju u potpunosti od raka izliječeno 39,8 % od ukupno 1717 pacijenata, dok je kombinacijom radioterapije i hipertermije od raka u potpunosti izliječeno 54,9 % od ukupno 1761 pacijenata ($p < 0,001$) (Datta i sur., 2020). Klinička hipertermija dijeli se na lokalnu, parcijalnu i hipertermiju cijelog tijela (Priester i sur., 2021).

2. Učinci hipertermije na organizam

U temperaturnom rasponu 41,5 – 46,5 °C stanice umiru eksponencijalno i predvidljivo. Što je temperatura viša, dolazi do veće inaktivacije enzima i denaturacije proteina (Datta i sur., 2020). Tretman hipertermije pokazuje smanjenje ATP-a i povećanje mliječne kiseline u tumorima. Ovaj nedostatak ATP-a dovodi do ionske neravnoteže u stanicama (Szasz i sur., 2013). Hipertermija uzrokuje prekid popravka DNA čime potencira oštećenja nastala radio- i kemoterapijom. To dovodi do mitotske katastrofe, senescencije, apoptoze i nekroze (Datta i sur., 2020).

Kada se u uvjetima *in vitro* stanice koje su u eksponencijalnoj fazi rasta podvrgnu povišenoj temperaturi u rasponu 41 – 47 °C, dobivamo krivulju ovisnosti utjecaja na stanice o dozi primljene topline. Ta krivulja sadrži koljeno koje razdvaja dvije etape učinka hipertermije. Prva etapa predstavlja reverzibilno neletalno oštećenje stanica, dok druga etapa predstavlja eksponencijalnu

staničnu smrt. Slika 1 prikazuje krivulje preživljenja CHO (engl. *chinese hamster ovarian*) stanica pri izlaganju različitim temperaturama. Moć topline da izazove staničnu smrt znatno je manja ispod granične temperature odnosno 43 °C nego li je iznad nje. Uzrok citotoksičnosti hipertermije uglavnom leži u denaturaciji proteina (Hildebrandt i sur., 2002).



Slika 1: Ovisnost učinka topline na smrt stanica o njezinoj dozi. Graf prikazuje ovisnosti za asinkrone CHO stanice grijane na različitim temperaturama. Na grafovima se može uočiti koljeno koje odvaja dvije etape učinka hipertermije na stanice (preuzeta i prilagođena prema Hildebrandt i sur., 2002).

Osjetljivost stanica na toplinu mijenja se ovisno o fazi staničnog ciklusa u kojoj se nalaze. Najosjetljivije su stanice u M-fazi staničnog ciklusa (Hildebrandt i sur., 2002). Hipertermija dovodi do oštećenja mitotskog aparata zbog čega je nemoguće završiti citokinezu, pa dolazi do pojave poliploida (Westra i Dewey, 1971; Coss i sur., 1982). Stanice u S-fazi također su vrlo osjetljive na hipertermiju. Povišena temperatura dovodi do kromatidnih aberacija. Toplina ne oštećuje izravno DNA, već povećava jednolančane regije koje omogućavaju nukleazama stvaranje dvolančanih lomova. Kada su stanice grijane u S-fazi, razina nehistskih proteina povezanih s kromatinom je

povišena. Oni interferiraju s djelovanjem polimeraze i ostalih proteina potrebnih za sintezu DNA te dolazi do inhibicije replikacije i pomaka replikacijskih rašlji. To za posljedicu ima kromosomske aberacije kada stanica uđe u prvu metafazu nakon hipertermije (Dewey 1989).

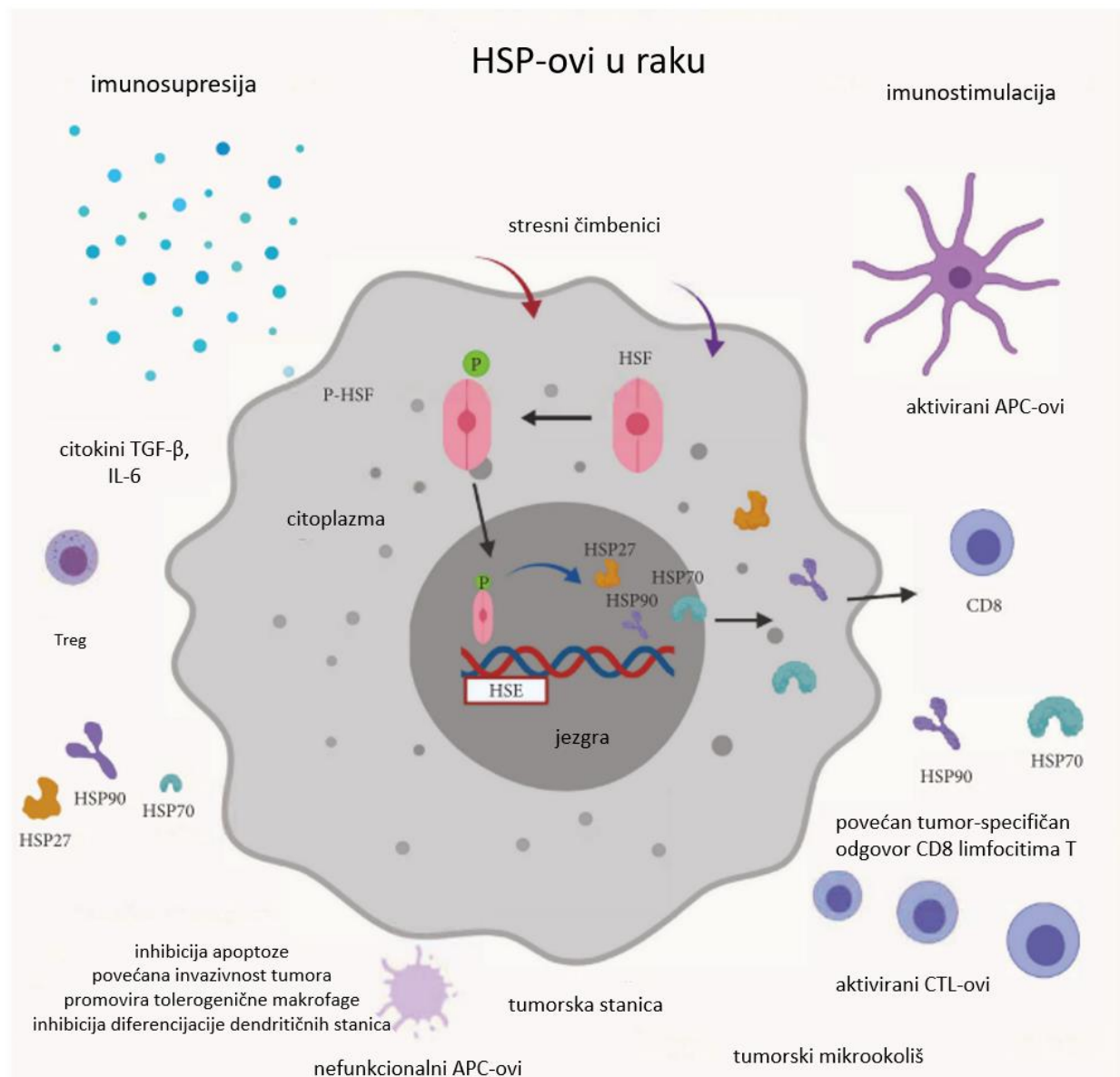
Stanice mogu razviti toleranciju na povišenu temperaturu, što dovodi do promjene krivulje preživljenja. Termotolerancija je reverzibilna, a do nje dolazi zbog indukcije proteina toplinskog šoka, zaustavljanja staničnog ciklusa u G₂-fazi i promjenama u staničnom metabolizmu (Hildebrandt i sur., 2002).

Uočeno je da hipertermija znatno smanjuje bol za vrijeme tretmana, čime značajno pospješuje pacijentovu kvalitetu života (Szasz i sur., 2013).

3. Proteini toplinskog šoka

Za vrijeme hipertermije stanica aktivira sintezu posebnih proteina koji sudjeluju u zaštiti stanica od toplinskog oštećenja (Hildebrandt i sur., 2002). Ti proteini nazivaju se proteinima toplinskog šoka odnosno HSP-ovi (engl. *heat shock proteins*). Osim za vrijeme toplinskog šoka HSP-ovi i u mnogim ostalim stresnim uvjetima održavaju stanicu stabilnom. HSP-ovi visoko su konzervirani u svim živim bićima, a po svojoj su funkciji pretežno šaperoni, tj. održavajući nativnu energiju slaganja sprječavaju nespecifične agregacije proteina i pomažu pri odmatanju i ponovnom smatanju pogrešno smotanih proteina (Das i sur., 2019). Neki od proteina toplinskog šoka postižu izravnu interakciju s komponentama signalnih puteva uključenih u apoptozu ovisnu o kaspazama. Također sudjeluju i u putevima apoptoze neovisnim o kaspazama međusobno djelujući na mnoge apoptotične čimbenike. Apoptoza je programirana stanična smrt potaknuta povlačenjem čimbenika rasta, hipoksijom, oštećenjem DNA ili citotoksičnim lijekovima (Lanneau i sur., 2008). Jednake stvari potiču i povećanu ekspresiju i nakupljanje HSP-ova. Oni pak onemogućuju staničnu smrt i potiču preživljenje, proliferaciju ili diferencijaciju stanica (Lanneau i sur., 2008). Proteini toplinskog šoka visoko su eksprimirani u raznim tipovima karcinoma. Uključeni su u procese proliferacije, diferencijacije, invazije i metastaze tumorskih stanica. Razina i vrsta cirkulirajućih HSP-ova zajedno s njihovim protutijelima odlični su biljezi za analizu stadija i agresivnosti određenog tipa raka (Das i sur., 2019). Ne samo da su uključeni u razvoj tumora već HSP-ovi također imaju ključnu ulogu u odgovoru tumora na liječenje. Neki od njih reguliraju finu ravnotežu između zaštitnih i razarajućih imunskih odgovora tumorskom mikrookolišu, zbog čega je ključno

objasniti njihovu ulogu u onkoimunologiji. Njihova aktivacija i odgovor u tumorskom okruženju prikazan je na Slici 2.



Slika 2: Proteini toplinskog šoka u biologiji raka. Stresni čimbenici u tumorskom okruženju aktiviraju transkripcijske čimbenike toplinskog šoka (HSF), disociirajući ih s HSP-ova i fosforilirajući ih (P-HSF). HSF odlaze u jezgru gdje se vežu za elemente toplinskog šoka (HSE) te potiču transkripciju HSP-ova. HSP-ovi odlaze u tumorski mikrookoliš gdje mogu imati imunosupresijsku ili imunostimulativnu ulogu. U imunosupresijskim okolnostima HSP-ovi aktiviraju obrambene mehanizme tumorskih stanica i potiču aktivaciju imunskih stanica zaslužnih za toleranciju tumora. U svojoj imunostimulacijskoj ulozi HSP-ovi pomažu u predodžbi tumorskih antigena i aktivaciji citotoksičnih limfocita T i stanica NK (preuzeta i prilagođena prema Das i sur., 2019).

Moduliranje ekspresije i aktivnosti šaperona HSP istraživano je kao terapijski pristup protiv raka, a HSP-ovi se danas smatraju održivim ciljem u imunoterapiji za rak (Das i sur., 2019). Za razliku od HSP-ova izoliranih iz normalnog tkiva, oni iz stanica raka mogu potaknuti aktivaciju citotoksičnih T-limfocita protiv tih stanica raka. Aktivaciju ne uzrokuju sami HSP-ovi, već u kombinaciji s peptidima specifičnima za stanice tumora, a nastali se kompleks predočava preko sustava MHC I (engl. *major histocompatibility complex class I*). Upravo zbog toga HSP-ovi se smatraju najpoželjnijim ciljem cjepiva protiv raka (Hildebrandt i sur., 2002).

Hsp27 pripada skupini malih proteina toplinskog šoka, a sudjeluje u regulaciji rasta, diferencijacije, proliferacije i migracije stanica. Povećana ekspresija Hsp27 povezana je s povećanom transkripcijom čimbenika rasta krvožilnih endotelnih stanica, što potiče angiogenezu i migraciju stanica u metastazama. Hsp27 ima ključnu ulogu u održavanju ravnoteže između progresije i mirovanja (dormancije) tumora, a ukoliko je slabije eksprimiran u angiogeničnim tumorskim stanicama, utoliko će doći do mirovanja tumora (Das i sur., 2019).

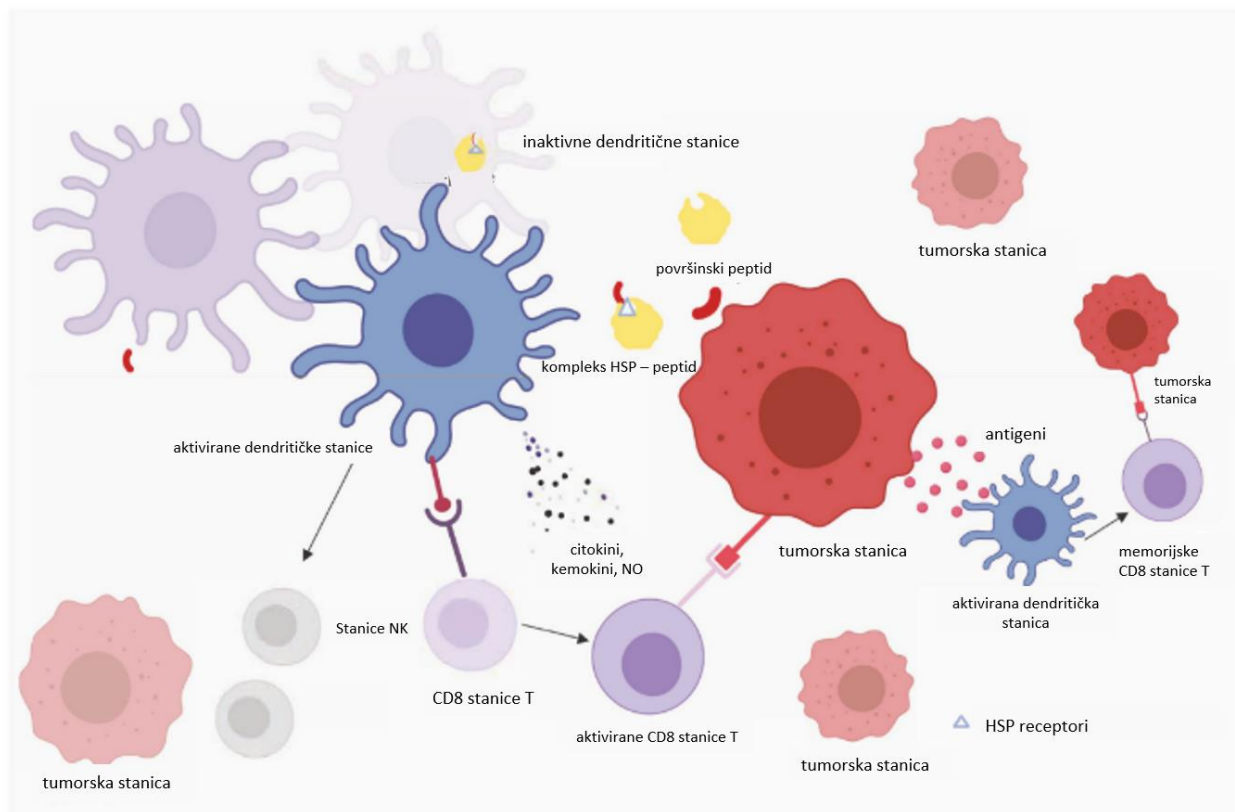
Hsp60 je unutarstanični šaperon koji sudjeluje u pravilnom smatanju i prijenosu proteina. Oni stanicama tumora pomažu u rastu, proliferaciji, metastaziranju i otpornosti na razne stresore. Poznati su po svojoj dualnoj ulozi u regulaciji apoptoze, a zbog aktivacije limfocita T mogu imati pro- ili protutumorsko djelovanje (Das i sur., 2019).

Protein Hsp70 povišeno je eksprimiran u citosolu tumorskih stanica (Multhoff i sur., 2012). Pokazano je da se često nalazi i na plazmatskoj membrani solidnih tumora, metastaza i leukemijskih stanica, dok su membrane normalnog tkiva uvijek Hsp70-negativne. Vjeruje se da bi se Hsp70 iz citosola na vanjski sloj plazmatske membrane mogao prenositi i učvršćivati s pomoću fosfatidilserina. Iako se premještanje fosfatidilserina s unutarnje na vanjsku membranu smatra ranim biljegom apoptoze, ovaj je događaj također povezan s otpornosti tumorskih stanica na daljnje stresne uvjete. Hipoksične tumorske stanice s povišenom ekspresijom proteina Hsp70 i fosfatidilserina na vanjskoj strani membrane vrlo su otporne na kemo- i radioterapiju (Multhoff i sur., 2012).

Hsp90 u mnogim tumorima potiče tumorogenezu. Zbog toga inhibicija Hsp90 ima pozitivan utjecaj u borbi protiv tumora. Inhibicija Hsp90 potiče protutumorski imunski odgovor temeljen na aktivaciji limfocita T i regulaciji gena odgovornih na interferone. Glikoprotein96, koji je dio obitelji Hsp90, smatra se idealnim kandidatom za protutumorsko cjepivo (Das i sur., 2019).

3. Onkoimunologija

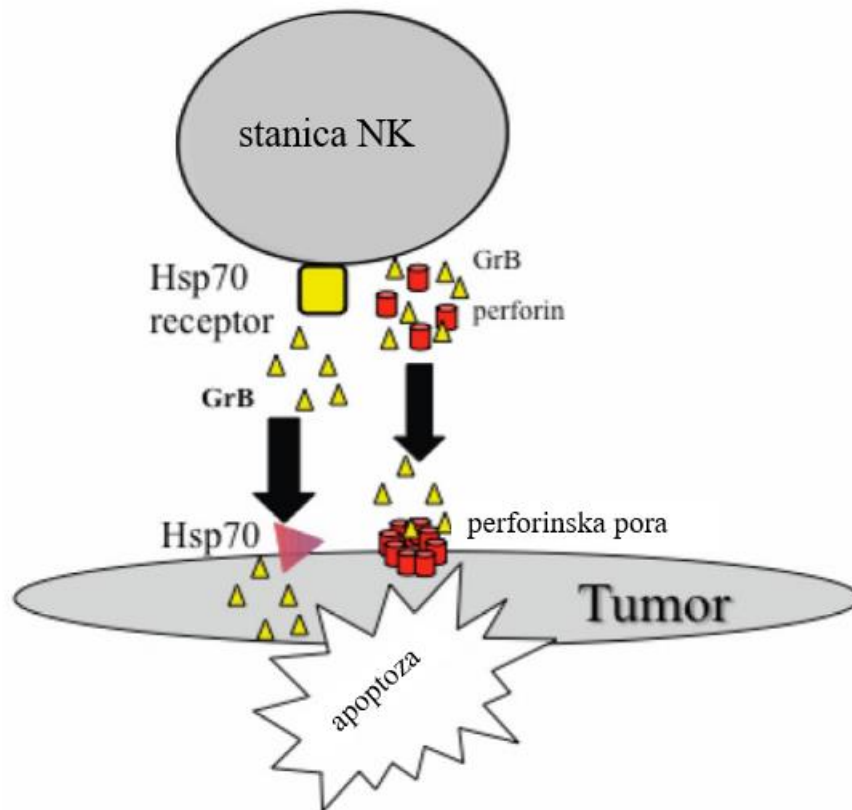
Naš organizam posjeduje prirodne mehanizme obrane od razvoja i širenja tumorskih stanica. Citotoksični T-limfociti (engl. *cytotoxic T lymphocyte* – CTL) sudjeluju u adaptivnoj imunosti od raka, dok stanice NK (engl. *natural killer*) čine urođenu crtu obrane od tumorskih stanica. Da bi se aktivirala adaptivna imunost, antigen-predočne stanice, (engl. *antigen presenting cell* – APC), hvataju tumor-specifične peptide i nose ih do limfnih čvorova gdje ih preko MHC I i MHC II sustava predočavaju limfocitima T. Dok su za aktivaciju naivnih stanica T potrebni profesionalni APC-ovi kao što su dendritičke stanice (engl. *dendritic cell* – DC), već senzitivirane stanice mogu se aktivirati i brojnim drugim stanicama, među kojima su i makrofagi (Multhoff i sur., 2012). Puteve aktivacije citotoksičnih limfocita T prikazuje Slika 3. Nedostatak učinkovite imunosti protiv tumora može ukazivati na nefunkcionalnost APC-ova ili toleranciju limfocita T prema tumorskim antigenima. Za toleranciju imunskog sustava na tumorske stanice često je zaslužan receptor CTLA-4 (engl. *CTL-associated antigen 4*). On dijeli ligande s CD28, glavnom kostimulativnom molekulom limfocita T, čime daje signal za povišenje praga aktivacije limfocita T sprječavajući tako autoimunost u normalnim uvjetima (Sutmuller i sur., 2001). Osim CD8⁺ citotoksičnih limfocita T, u imunskom odgovoru na pojavu tumora važnu ulogu igraju i CD4⁺ regulatorne stanice T. Osim receptora CD4 koji prepoznaju antigene koje predočava sustav MHC II, ove stanice na svojoj površini imaju i visoku razinu receptora CD25, tj. receptora za interleukin IL-2. Uz to, regulatorni limfociti T imaju i povećanu ekspresiju unutarstaničnog transkripcijskog čimbenika Foxp3 (engl. *Forkhead box p3*). Ove stanice ključne su za toleranciju vlastita tkiva, a u njihovoj odsutnosti dolazi do pojave autoimunih bolesti. Nažalost, one također negativno utječu na protutumorsku imunost (Multhoff i sur., 2012). Osjetljivost tumorskih stanica na imunski odgovor limfocitima T ovisan je o količini receptora MHC preko kojih se predočavaju antigeni. Za aktivaciju CD8⁺, tj. citotoksičnih limfocita T ključan je sustav MHC I, dok je za pomoćničke CD4⁺ limfocite potreban sustav MHC II. Stoga je jedan od načina obrane tumora smanjena ekspresija sustava MHC I. Smanjena ekspresija ovih molekula čini tumorske stanice nevidljivima za limfocite T i često je povezana s invazivnim i metastatičkim tumorskim fenotipom. Čak 40 – 90 % metastazirajućih tumora ima nisku ekspresiju MHC I ili ona u potpunosti izostaje (Multhoff i sur., 2012).



Slika 3: Predočavanje tumorskih antigena i aktivacija CD8 limfocita T. Tumorske stanice otpuštaju ograničeni broj antigena koji bivaju prepoznati od strane HSP receptora. Nastali kompleks HSP – peptid aktivira dendritičke stanice koje potom potiču imunski odgovor aktivacijom CD8 limfocita T, stanica NK i otpuštanjem citokina, kemokina i dušičnog oksida (NO). Aktivirane stanice imunskog sustava potiču lizu tumorskih stanica što dovodi do otpuštanja tumorskih antigena u izvanstanični prostor i stvaranja memorijskih CD8 stanica T (preuzeta i prilagođena prema Das i sur., 2019).

S druge strane, smanjena ekspresija sustava MHC čini tumorske stanice pogodnijima za napad stanicama NK s obzirom na to da one na svojim membranama sadrže inhibitorne receptore specifične za sustav MHC I (Biassoni i Malnati 2018). Stanice NK smatraju se prvom crtom obrane protiv bakterijskih i virusnih infekcija i tumorskih stanica. Prema hipotezi „missing-self“, nedostatak sustava MHC I omogućuje stanicama NK ekspresiju aktivirajućih imunoglobulinskih receptora koji prepoznaju stanice sa smanjenom ekspresijom MHC I sustava (Multhoff i sur., 2012). Stanice NK uključene su u kompleksnu mrežu staničnih interakcija i otpuštanja citokina. One otpuštaju neke citokine i kemokine važne za regulaciju sazrijevanja DC-a i ostalih stanica imunskog sustava, a mogu čak i lizirati nezrele antigen predodne stanice nastale iz monocita. Tako se postiže fina regulacija sazrijevanja DC-a i odgovora adaptivnog sustava. Neka istraživanja predlažu i da bi DC-e mogle aktivirati stanice NK (Biassoni i Malnati 2018). Za razliku od

klonalnih stanica T, jedna stanica NK svojim receptorima može prepoznati više različitih meta (Multhoff i sur., 2012). Stanice NK ispuštaju apoptotični enzim granzim B, sam ili u kombinaciji s perforinom, te kontinuirano odstranjuju stanice inficirane patogenima i one pretvorene u tumorske stanice bez prethodne senzitivacije (Multhoff i sur., 2012; Biassoni i Malnati, 2018). Tumorske stanice koje na svojoj površini imaju proteine Hsp70 često su otporne na standardnu kemo- i radioterapiju, ali ne i na prethodno aktivirane stanice NK. U odsutnosti perforina, granzim B ispušten iz stanica NK ulazi u stanice tumora vezanjem na protein Hsp70 i time inicira apoptozu. U prisutnosti perforina granzim B u stanice ulazi kroz perforinske pore (Multhoff i sur., 2012). Dva načina ulaska granzima B u tumorske stanice posredovana stanicama NK prikazano je na Slici 4.



Slika 4: Ubijanje tumorskih stanica aktiviranim stanicama NK. Stanice NK svojim receptorima vežu se za Hsp70 na tumorskim membranama i izlučuju granzim B (GrB) koji uzrokuje apoptozu tumorske stanice. Ako je perforin prisutan, on će napraviti poru na membrani tumorske stanice kroz koju će ući granzim B bez posredstva Hsp70 (preuzeta i prilagođena prema Multhoff i sur., 2012).

Još jedna važna komponenta protutumorskog odgovora su makrofagi. Makrofagi su vrlo raznolika skupina stanica prvi put opisana 1883. godine kao pokretne stanice na mjestu ozljede. Makrofagi su plastične stanice čiji razvoj ovisi o primljenim signalima iz izvanstaničnog okoliša (Ross i sur., 2021). Klasičnom aktivacijom polariziraju se u makrofage M1, a alternativnom u makrofage M2 (Multhoff i sur., 2012). Klasična aktivacija posredovana je stanicama TH1 koje luče IFN- γ i ostvaruju dodirni signal međudjelovanjem molekula CD40L-CD40. Alternativna aktivacija makrofaga posredovana je stanicama TH2 koje luče IL-4 i IL-13 potičući lučenje kolagena i fibroze, molekula važnih u njihovoj ulozi u zacjeljivanju rana (Abbas i sur. 2018). Makrofagi M1 smatraju se proupalnim makrofagima, a odlikuje ih velika fagocitna i citotoksična moć. Na svojoj površini ekspimiraju biljege MHC II, CD14, CD80/86 i CD38, zajedno s inducibilnom nitrid-oksidskom sintazom (engl. *inducible nitric oxid synthaze* – iNOS). Opuštaju proupalne citokine IL-6, IL-12, IL-1 β i TNF- α (engl. *tumor necrosis factor α*), i kemokine CCL2 i CCL5. Imaju snažnu moć novačenja i aktiviranja limfocita B i T. S druge strane, makrofagi M2 sudjeluju u rješavanju upalnih procesa, popravku tkiva i aktivaciji humoralne imunosti. Na svojoj površini ekspimiraju biljege CD36, CD206 i CD163. Postoji više podtipova makrofaga M2 koji ekspimiraju različite signalne molekule i imaju različite funkcije (Ross i sur., 2021). Maligni tumori sadrže više makrofaga od okolnog normalnog tkiva. Oni kao monociti iz krvi prelaze u tumore gdje postaju TAM (engl. *tumor-associated macrophage*). Klinička istraživanja pokazala su korelaciju između broja TAM-ova i gustoće mreže krvnih žila, što ukazuje na uključenost TAM-a u poticanju angiogeneze u tumoru. Polarizacija makrofaga ovisi o stadiju tumora. U početnom stadiju makrofagi imaju fenotip M1 (Multhoff i sur., 2012). Oni svojim proupalnim citokinima i stvaranjem reaktivnih kisikovih i dušikovih vrsta ubijaju tumorske stanice te se smatraju protutumorskim ili „dobrim“ makrofagima (Chen i sur., 2019). Kako tumor napreduje, TAM-ovi mijenjaju svoj fenotip u M2 (Multhoff i sur., 2012). Makrofagi M2 svojim protuupalnim citokinima IL-10, IL-13 i TGF- β (engl. *tumor growth factor β*) potiču razvoj tumora te se smatraju protumorskim ili „lošim“ makrofagima (Chen i sur., 2019).

4. Hipertermija kao imunomodulator

Hipertermija, kako cijelog tijela tako i lokalna, ima utjecaja u sustavnom protutumorskom odgovoru (Datta i sur., 2015, Ordóñez, i sur., 2015). Hipertermija pospješuje novačenje limfocita u tumore, povećava osjetljivost tumorskih stanica i potiče povećanu ekspresiju proteina toplinskog

šoka (Baronzio i sur., 2006). Odavno je potvrđeno da prisutnost vrućice odgovara sustavnoj hipertermiji vodeći do spontanog povlačenja raka bez ikakve dodatne terapije (Papac 1996). Ovo saznanje opravdava korištenje hipertermije u terapijske svrhe (Baronzio i sur., 2006). Vrućica je složeni neuroendokrini odgovor organizma koji pobuđuje imunski sustav u slučaju prepoznavanja patogena ili promijenjenih domaćinskih stanica. Makrofagi zajedno s ostalim stanicama domaćina pri detekciji napada na organizam otpuštaju proupalne citokine poput IL-1, IL-2, IL-6, TNF- α i IFN- γ . Oni zajedno s drugim medijatorima kao što su prostaglandini E₂ (PG E₂), nastali djelovanjem ciklooksigenaze 2 (COX-2) u metabolizmu arahidonske kiseline, djeluju na termoregulatorno područje u hipotalamusu i podešavaju ga na višu temperaturu (Baronzio i sur., 2006). Hipertermija povećava ekspresiju tumorskih antigena i proteina toplinskog šoka utječući na povećano predočavanje antigena na dendritičkim stanicama (Dewhirst i sur., 2016). Izlaganjem tumorskih stanica povišenoj temperaturi dolazi do agregacije i denaturacije proteina što u stanici izaziva aktivaciju signalnih putevi nazvanih „odgovor stanice na nesmotane proteine“ (engl. *unfolded protein response*). HSP-ovi, s naglaskom na Hsp70, izlaze iz nekrotičnih stanica. Oni zajedno s egzozomima s tumorskim antigenima i otpušanim Hsp70 privlače dendritičke stanice (Datta i sur., 2020).

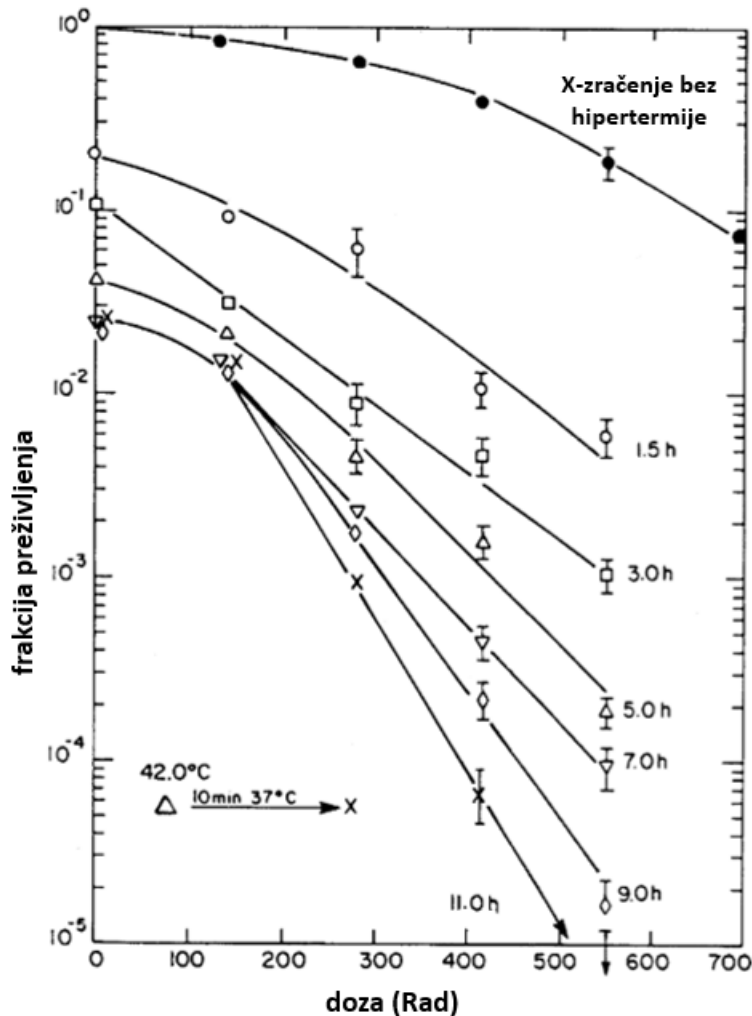
Limfociti NK posebno su osjetljivi na povišenu temperaturu. U istraživanjima *in vitro* otkriveno je da temperature ispod 41 °C potiču proliferaciju stanica NK zajedno sa sekrecijom selektina (Hildebrandt i sur., 2002), dok previsoke temperature pak smanjuju aktivnost i broj stanica NK, neutrofila i makrofaga (Baronzio i sur., 2006). Selektini su adhezivne molekule koje posreduju u novačenju leukocita u limfne čvorove i tumor (Borsig 2018). Da bi se mogli boriti protiv tumorskih stanica, leukociti prvo moraju doći do tumora. Prvi korak u tome jest novačenje limfocita na endotel pomoću L-selektina (Baronzio i sur., 2006; Borsig, 2018). Selektini posreduju u interakcijama između leukocita, trombocita i endotelnih stanica, a imaju i bitnu signalnu ulogu. Svi tipovi doprinose metastazama novačenjem stanica mijeloidne stanične loze. Kako hipertermija mijenja protutumorski odgovor moglo bi biti od velikog značaja za reguliranje metastaza te je nužno dodatno istražiti ovu temu (Dewhirst i sur., 2016).

Hipertermija povećava učinkovitost terapije tumora izloženih zračenju. Primjerice, u terapiji pacijenta koji je imao sarkom veličine 20 × 7 × 5 cm zbog tehničkih ograničenja gornji dio tumora liječen je samo radioterapijom, a donja polovica kombiniranom hipertermijom i radioterapijom,

vidljiva regresija gornjeg dijela tumora iznosila je 65 %, a donjeg 85 %. Primijećeno je da je donji dio tumora imao više stanica od gornjeg. Daljnjim imunohistokemijskim analizama utvrđeno je da je dio tumora tretiran samo zračenjem sadržavao više CD4⁺ limfocita T, dok su se stanice CD68⁺ i CD34⁺ nalazile većinski u donjem dijelu tumora. Omjer CD8⁺/CD4⁺ bio je veći u donjem dijelu tumora. Ova razlika u broju i vrsti stanica u dva različita dijela tumora ukazuje na dvije različite etape u tijeku imunskog odgovora. Visoka razina stanica CD4⁺ ukazuje na inicijalne događaje, dok visoka razina stanica CD68⁺ ukazuje na terminalne događaje imunskog odgovora. Ovo dovodi do zaključka da hipertermija ubrzava cijeli proces imunomodulacije posredovane zračenjem; regresija tumora je veća pri kombiniranju dviju terapija (Datta i sur., 2015).

5. Termalna radiosenzitizacija

Radioterapija je jedna od glavnih metoda tretiranja raka, a pripisuje joj se oko 40 % izlječenja od tumora. Glavni je cilj radioterapije dovesti tumorocidnu dozu zračenja u tumor čime bi se induciralo oštećenje DNA nastalim slobodnim radikalima, dok se istodobno pokušava minimalno oštetiti okolno zdravo tkivo. Međutim, zbog hipoksičnih uvjeta koji često vladaju u tumorskim tvorevinama, ono je otpornije na zračenje od okolnog zdravog tkiva. Osim toga, zbog intrinzičnih enzima za popravak DNA mogu se poništiti subletalna i letalna oštećenja, a stanice u S fazi otporne su na zračenje. Zbog ovih nedostataka radioterapije tumorske se stanice moraju radiosenzitirati. Umjerena hipertermija jedan je od najmoćnijih radiosenzitizera (Datta i sur., 2020), a koristi se već više od sto godina (Overgaard 2013). Termalna radiosenzitizacija dovodi do smanjenja koljena u krivulji ovisnosti preživljenja o dozi zračenja, što prikazuje Slika 5. Ovaj učinak najbolje se primjećuje na stanicama u S-fazi staničnog ciklusa (Hildebrandt i sur., 2002; Datta i sur., 2020).



Slika 5: Termalna radiosenzitizacija. Utjecaj zagrijavanja stanica V79 na 42 °C 10 min prije akutnog zračenja X-zrakama. Na krivuljama ovisnosti doze o učinku uočava se smanjenje koljena nakon termalne radiosenzitizacije (preuzeta i prilagođena prema Hildebrandt i sur., 2002).

Radiootporne stanice u kasnoj S-fazi osjetljive su na temperaturu višu od 41 °C koja privremeno inhibira popravak subletalnih i letalnih oštećenja molekule DNA. Pri klinički ostvarivoj temperaturi u rasponu 41 – 42,5 °C inhibira se popravak dvolančanih lomova homolognom rekombinacijom zbog razgradnje proteina BRCA2. To pokazuje da blaga hipertermija može biti moćan, a neinvazivan način lokalne inhibicije homologne rekombinacije (Krawczyk i sur., 2011). Činjenica da hipertermija povećava radiosjetljivost i u tumorskim stanicama u kojima izostaje funkcionalan protein BRCA2 i aktivna homologna rekombinacija ukazuje da hipertermija također inhibira i ostale puteve popravka DNA (Datta i sur., 2020). Senzitivizacija stanica u G₀ i G₁ fazi toplinom na zračenje bitan je dokaz da hipertermija utječe na inhibiciju nehomolognog spajanja

krajeva (engl. *non-homologous end joining* – NHEJ) DNA pri dvolančanom lomu. Smatra se da su pogođeni i klasični i alternativni put nehomolognog sparivanja krajeva, premda još nema čvrstih dokaza za izravan utjecaj hipertermije na alternativni put. Hipertermija utječe i na ekscizijske puteve popravka oštećenja DNA. Primijećena je smanjena aktivnost popravka DNA izrezivanjem baza (engl. *base excision repair* – BER), a vjeruje se da je razlog tomu što je za vrijeme toplinskog stresa preopterećen Hsp90 potreban za pravilne interakcije među komponentama sustava BER. Postoje dokazi da je popravak DNA izrezivanjem nukleotida (engl. *nucleotide excision repair* – NER) pogođen hipertermijom, no njegova uloga nije značajna. Za MMR sustav dosadašnja istraživanja ukazuju da hipertermija nema utjecaja na njegovu moć popravka, ali može stimulirati lezije na molekuli DNA (Oei i sur., 2015).

Hipertermija i zračenje utječu sinergistički jedno na drugo. Vrijednost se izražava razinom preživljenja stanica pri povišenoj temperaturi u odnosu na normalnu temperaturu (Hildebrandt i sur., 2002). Sinergistički učinak hipertermije i zračenja ovisi o primijenjenoj temperaturi, vremenskom intervalu između primjene topline i zračenja, duljini hipertermije i vrsti tkiva. Primjena više temperature i na dulji period povećava toplinski učinak. Nadalje, omjer toplinskog poboljšanja najviši je kada se terapija hipertermijom i radioterapija daju u isto vrijeme, a ono može doseći vrijednost od čak pet puta (Hildebrandt i sur., 2002; Datta i sur., 2020). Umjerena hipertermija povećava osjetljivost tumorskog i normalnog tkiva. Stoga je u kombinaciji ovih dvaju tretmana potrebna velika preciznost u primjeni radioterapije na samo tumorsko tkivo. Srećom, selektivnost za tumorske stanice povećana je i zbog toga što je normalno tkivo u okolini tumora općenito niže temperature. Iako su potrebna dodatna istraživanja o utjecaju hipertermije na popravak DNA, ipak može se zaključiti da hipertermija ne utječe na jedan glavni put popravka nego da se radi o kumulativnom učinku (Datta i sur., 2020).

Toplina na nižim temperaturama ima selektivan citotoksični učinak prema stanicama u osiromašenom okruženju, dok ujedno ne uzrokuje oštećenja u dobro vaskulariziranom normalnom tkivu. Budući da slaba vaskularizacija tumora dovodi do hipoksičnih uvjeta i sniženog pH zbog anaerobnog metabolizma i slabog odvoda otpadnih tvari u srži tumorskih tvorevina, oni su posebno podložni nekrozi ili apoptozi uzrokovanoj hipertermijom. Hipertermalna citotoksičnost posebno napada kronično hipoksične dijelove tumora, no ne zbog manjka kisika, već zbog kiselih uvjeta unutar tumorskog mikrookoliša. Ovdje leži najveća prednost kombiniranja hipertermije i

radioterapije: stanice najotpornije na radijaciju ujedno su i najosjetljivije na povišenu temperaturu (Overgaard 2013). Ovaj je učinak posebno vidljiv u temperaturnom rasponu 41 – 43 °C (Datta i sur., 2020).

Ionizirajuće zračenje i toplinski stres poboljšavaju prihvaćanje i procesiranje antigena od strane antigen-predočnih stanica. Okolišni stres poput smrti tumorskih stanica inducirane zračenjem potiče aktivaciju specifičnih limfocita T. APC-ovi izvan zone zračenja preuzimaju tumorske antigene, migriraju do limfnih čvorova te aktiviraju specifične limfocite T koji se vraćaju u područje raka. Nažalost, ovaj je događaj prolazan i s vremenom dolazi do uspostavljanja imunosne homeostaze (Multhoff i sur., 2012).

Tijekom terapije hipertermijom inducira se termotolerancija koja rezultira prolaznom otpornošću stanica na povišenu temperaturu. Glavni su „krivci“ za to HSP-ovi koji se pojačano ekspimiraju za vrijeme toplinskog stresa. Što je početna temperatura viša, to je termotolerancija dugotrajnija. Termotolerancija se potom smanjuje ovisno o toplinskom oštećenju i intervalu između dvaju toplinskih tretmana. Klinički, termoterapije daju se jednom do dvaput tjedno kako bi se izbjegla neučinkovitost uzrokovana termotolerancijom (Datta i sur., 2020).

6. Interakcija između hipertermije i kemoterapije

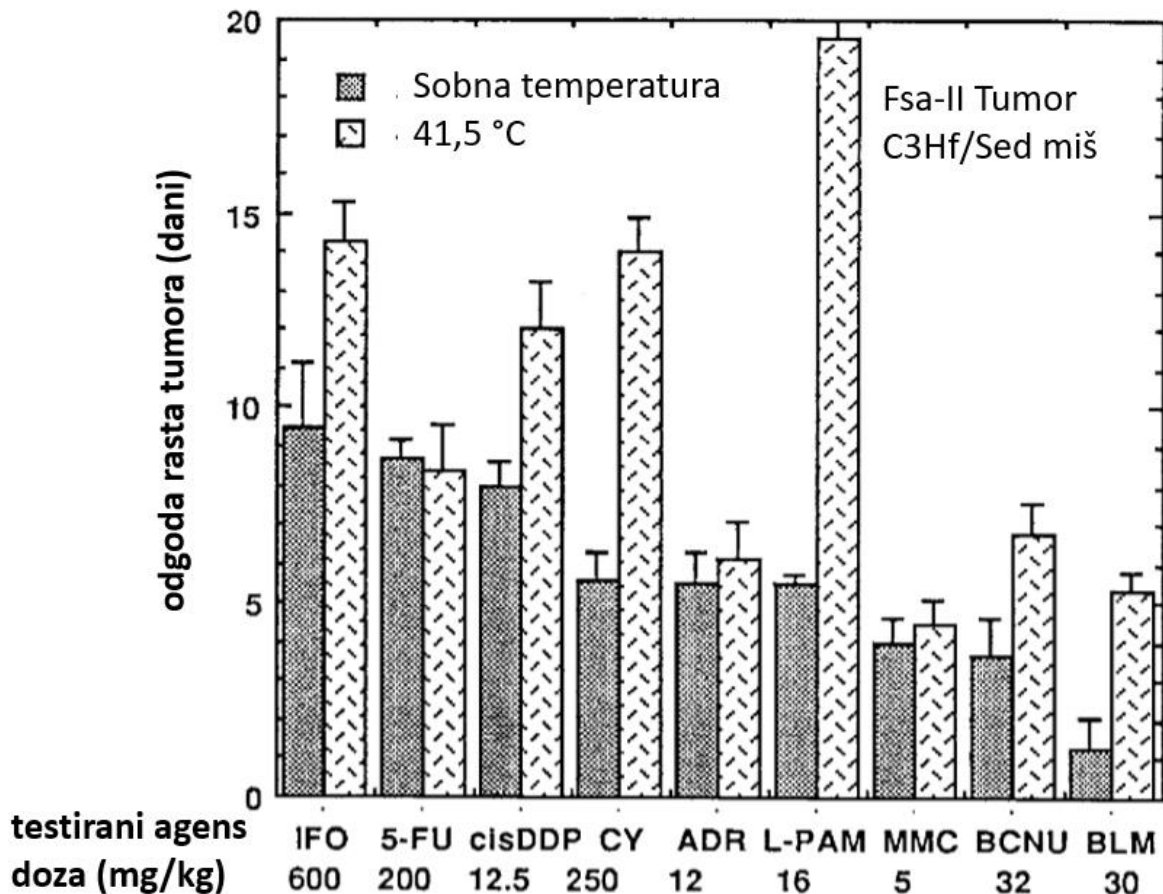
Hipertermija se često koristi i kao pojačivač učinka kemoterapije. Fiziološki toplinom inducirana vazodilatacija u temperaturnom rasponu 39 – 41 °C povećava dotok lijekova u tumore poboljšavajući protok i permeabilnost krvnih žila. U kombinaciji s različitim kemoterapeutikama omjer toplinskog poboljšanja varira od 1,0 do 3,6 (Datta i sur., 2020). Interakcije između topline i pojedinih kemoterapeutika imaju aditivni ili supraaditivni učinak, dok drugi kemoterapeutici pokazuju učinak tek iznad granične temperature, a treći ne pokazuju nikakvu ovisnost o temperaturi (Hildebrandt i sur., 2002). Slika 6 prikazuje učinkovitost odabranih kemoterapeutika pri normalnoj i pri povišenoj temperaturi. Učinkovitost je izražena u vremenu odgode rasta tumora između tretiranih i kontrolnih skupina. Svaki je lijek dodan u maksimalnoj tolerabilnoj dozi. Primijećena je značajna termalna senzitivizacija za 1,3-bis(2-kloretil)-N-nitrozoureu, cis-diaminkloroplatinu [II] i bleomicin u porastu temperature do 41,5 °C. Termalna senzitivizacija nije bila značajna za 5-fluorouracil i mitomicin, dok se za adriamicin značajan učinak primjećuje tek u temperaturnom rasponu 41 – 43 °C (Datta i sur., 2020). Popis kemoterapeutika i učinka hipertermije na njihovo djelovanje nalazi se u Tablici 1.

Tablica 1: Kemoterapeutici i učinak hipertermije na njihovo djelovanje*

kemoterapeutici	učinak neovisan o temperaturi	aditivni učinak	sinergistički učinak
	5-fluorouracil	doksorubicin	cisplatina
metotreksat	ciklofosfomid	karboplatina	
aktinomicin D	ifosfomid	mitomicin C	
citarabin	gemcitabin	bleomicin	

*(tablica preuzeta i prilagođena prema Ordóñez, i sur., 2015 i Datta i sur., 2020).

Doksorubicin i bleomicin imaju temperaturni prag od 42,5 °C iznad kojeg se vidi učinak. Alkilirajući agensi poput cisplatine i oksaliplatine, zbog sinergističkog učinka toplinskog blokiranja popravka DNA, pokazuju velik rast u učinkovitosti u temperaturnom intervalu 41 – 42 °C (Datta i sur., 2020).



Slika 6: Vrijeme odgode rasta tumora nakon injektiranja jedne maksimalne doze 9 različitih lijekova (20 % veća doza svakog lijeka ubija > 50 % životinja). Sobna temperatura (siva boja) označava da se lijek dao u prostoriji sobne temperature bez ikakvog dodatnog tretmana. Oznaka 41,5 °C (iscrtkano) označava da je tumor neposredno prije injektiranja lijeka bio 30 minuta u vodenoj kupelji na temperaturi od 41,5 °C. Ispitivani su lijekovi ifosfamid (IFO), 5-fluorouracil (5-FU), cis-diamindikloroplatina [II] (cisDDP), ciklofosfamid (CY), adriamicin (ADR), melfalan (L-PAM), mitomicin (MMC), 1,3-bis(2-kloroetil)-N-nitrozourea (BCNU) i bleomicin (BLM) (preuzeta i prilagođena prema Urano i sur., 1999).

Dosadašnja istraživanja pokazuju da se najbolji rezultati kombiniranja topline i kemoterapeutika većinom postižu ako se ove dvije terapije primjenjuju sinkrono ili u kratkom intervalu. No postoje izuzeci. Tako, zbog opsežnog jetrenog metaboliziranja, oksacefasporin-ciklofosfamid i ifosfamid trebaju se primijeniti nekoliko sati prije hipertermije, a u modelu štakora između primjene gemcitabina i hipertermije treba proći 24 sata da bi se dobio sinergistički učinak (Hildebrandt i sur., 2002).

Kako bi im se povećala učinkovitost, kemoterapeutici bi se mogli stavljati u termoosjetljive liposome koji bi ispustili lijek u tumore gdje se inducira hipertermija, usto i minimizirajući citoskičnost kemoterapeutika za normalno tkivo (Datta i sur., 2020).

7. Mehanizmi postizanja hipertermije

Hipertermija je ustvari prijenos energije koji mijenja prirodni tok energije u tumorima. Ova promjena može dovesti do supresije i uništenja malignih stanica, ali može i ubrzati rast i širenje tumora. Stoga je vrlo važno kako se energija prenosi na ciljano područje (Andocs i sur., 2009).

Grijati se može cijelo ili samo dio tijela. Ovisno koja se metoda odabere, dolazi do različitih učinaka. Sustavnim grijanjem tijela mijenja se fiziologija cijeloga organizma i temelji se na zagrijavanju krvi koja potom zagrijava tumor. Lokalna hipertermija pak temelji se na zagrijavanju željenog tkiva, dok će krv koja je ostala pri normalnoj tjelesnoj temperaturi zapravo rashladiti ciljano područje (Szasz i sur., 2013). Sustavna se hipertermija može postići zagrijavanjem izvan ili unutar samoga tijela, a najčešće su metode zagrijavanje parom, vodenom kupelji ili elektromagnetskim zračenjem. Sustavna hipertermija ima fiziološko ograničenje na 42 °C jer u suprotnom dolazi do narušavanja homeostaze. No produljivanjem vremena terapije na nižoj temperaturi mogu se i dalje postići vrlo dobri rezultati (Szasz i sur., 2013). Primljena toplinska doza može se predočiti u koncept termalne izoeftne doze (engl. *thermal isoeffect dose* – TID) koja se koristi u kliničkoj praksi kako bi se usporedili različiti toplinski tretmani. TID služi za prebacivanje dane termalne doze u ekvivalentne minute pri 43 °C (Hildebrandt i sur., 2002). Lokalna i regionalna hipertermija može se postići na mnoge načine, a metode se dijele u dvije velike skupine: konduktivne i elektromagnetske. Konduktivne metode koriste tradicionalne klasične načine zagrijavanja koji dovode veliku količinu topline u dermalni sloj, dok ga metode koje koriste elektromagnetsko zračenje mogu preskočiti (Szasz i sur., 2013).

Najjednostavnija tehnologija kojom se postiže hipertermija jest uranjanje ciljanog dijela tijela u kontroliranu vodenu kupelj. Pritom je bitno zaštititi zdravo tkivo od toplinskog oštećenja i opekline. Na pokusnim životinjama u tu svrhu na granice tumora maže se vazelin. Stavljaju se plastične vrećice preko uronjenog dijela tijela da bi se spriječila pretjerana apsorpcija vode i stvaranje edema. Prednost ove metode leži u njezinoj jednostavnoj upotrebi i tome što se bilo koja vodena kupelj lako pretvori u uređaj za hipertermiju. Nedostatak je ove metode pak njezina nespecifičnost. Vodena kupelj izložit će toplini puno veće područje od samog tumora. To u

normalnom tkivu može uzrokovati termoregulatorni odgovor i povećati lokalnu perfuziju. No, dokle se god primjenjuje blaga hipertermija, ne bi trebala nastati nikakva trajna oštećenja. Drugi nedostatak metode jest neravnomjerna raspodjela topline. Budući da se izvor topline nalazi izvan samog tumora, najvišu će temperaturu postići periferni površinski dio tumora, a temperatura će opadati dubljim ulaženjem u tumor (Priester i sur., 2021).

Hladni izvori svjetla (engl. *cold light source* – CLS) uređaji su koji služe zagrijavanju tkiva. Uređaji se temelje na žaruljama čiji je izvor svjetlosti zagrijavanje volframove niti. Neki uređaji koriste halogene lampe koja emitiraju infracrveno (engl. *infrared* – IR) zračenje, koje se sastoji od zračenja IR-A, IR-B i IR-C. Drugi koriste napredniji sustav zračenja IR-A filtriranim kroz vodu. CSL prati radijaciju crnog tijela, što znači da su postignuta temperatura i valna duljina povezane. To joj omogućuje finu regulaciju intenziteta terapije. Ovom metodom većinu topline apsorbira tanki površinski sloj kože. Zbog toga dolazi do stvaranja toplinskog gradijenta, a u dubljim dijelovima tumora doza će biti ispod citotoksične razine. Ukoliko se pretjera s duljinom ili intenzitetom tretmana, utoliko će doći do bola i nepovratnog oštećenja tkiva. Metoda CLS može preciznije pogoditi ciljane regiju u odnosu na vodenu kupelj, no i dalje je ograničena samo na površinski sloj kože (Priester i sur., 2021).

Primjena laserske svjetlosti u bliskom infracrvenom području (engl. *Near-Infrared Laser Light* – NIR) bazira se na hipertermiji nastaloj zbog interakcije monokromatske, direktne i koherentne laserske svjetlosti i tkiva. U pretkliničkim studijama najčešće se koristi valna duljina od 800 nm koja prodire u tkivo do dubine od 10 mm. Problem koji se pojavljuje pri korištenju ove valne duljine jest što ju apsorbira hemoglobin. To je posebice problem pri tretiranju dobro prokrvljenih tumora ili tumora u blizini velikih krvnih žila. Nažalost, valne duljine niže od 700 nm ne mogu postići duboku prodornost, dok je u valnih duljina iznad 1000 nm uočena veća apsorpcija vode. Sam laser u centru ciljane regije stvara vruću točku, dok se temperatura prema rubovima tumora smanjuje. Da bi se ovo izbjeglo lasersko svjetlo propušta se kroz set leća ili prizmu, ili pak korištenjem iluminatora, čime se svjetlost raspršuje. Ova se metoda koristi pri liječenju površinskih tumora. Prednost ove metode u odnosu na CLS jest ta što se koristi monokromatska svjetlost i homogeno osvjetljenje cijele ciljane regije sa strogo određenim granicama. S druge strane, ako se loše provodi terapija, laserska svjetlost vrlo brzo može dovesti do dehidracije i pougljenja tkiva (Priester i sur., 2021).

Metoda fokusiranog ultrazvuka (engl. *focused ultrasound* – FUS), odnosno metoda fokusiranog ultrazvuka visokog intenziteta (engl. *high intensity focused ultrasound* – HIFU) neinvazivna je tehnika koja se temelji na lokalnom dovođenju topline u duboke tumore pomoću ultrazvučnih valova. Pri visokom akustičnom intenzitetu ($> 5 \text{ W / cm}^2$) ultrazvučni valovi potiču ablaciju, tj. odljepljivanje i otpadanje tumorskog tkiva, dok pri nižem intenzitetu ($< 3 \text{ W / cm}^2$) potiču hipertermiju. Koliko će duboko tkivo biti zahvaćeno ovom terapijom ovisi o frekvenciji ultrazvučnih valova (Toraya-Brown i Fiering, 2014; Priester i sur., 2021).

Najčešće korištena metoda zagrijavanja dubokih tumora jest tretman radiofrekvencijom (engl. *radiofrequency treatment* – RF), u kojem se dvije kapacitivne elektrode smještaju na suprotne strane tijela. U ovu skupinu terapije spadaju dvije metode postizanja hipertermije: konvencionalna kapacitivna hipertermija (cCHT) i modulirana elektrohipertermija (mEHT). Konvencionalna kapacitivna hipertermija (cCHT) koristi se uređajem koji koristi dielektričnu toplinu velike moći naglim promjenama električnog polja. Time postiže željenu temperaturu u ciljanom dijelu tijela. Modulirana elektrohipertermija, poznatija pod imenom onkotermija, metoda je koja koristi elektromagnetsku energiju za selektivno ubijanje malignih stanica. Koristi se radiofrekventnom strujom pri 13,56 MHz koja služi tome da kapacitivna impedancija stvori elektromagnetsko polje i time povećava temperaturu ciljanog tkiva. Ova metoda primjenjuje se izravno na područje tijela na kojem se nalazi tumor (Yang. K. L. i sur., 2016) i cilja staničnu membranu (Andocs i sur., 2009). Energiju RF struje selektivno apsorbira tumorsko tkivo zbog viših koncentracija iona u tumorskom okruženju, uzrokujući masivnu apoptotičnu smrt stanica čak i ispod citotoksičnog temperaturnog raspona (Yang. i sur., 2016).

U svrhu postizanja lokalne hipertermije počele su se koristiti nanočestice, ravnomjerno raspoređene po tumoru. Odgovarajući vanjski izvor energije aktivira nanomaterijal, te se dobiva jednolika precizno kontrolirana temperatura unutar cijeloga tumora (Toraya-Brown i Fiering 2014).

8. Napredak u terapiji

Još u drevna vremena razni narodi prepoznali su ljekovita svojstva povišene temperature organizma. U svrhu zagrijavanja dijela ili cijelog tijela koristile su se blatne kupke, termalni izvori i vruća vulkanska para. Prvi zapisi o korištenju hipertermije kao terapije protiv raka datiraju još iz starog Egipta. Zapisi na papirusu iz 27. st. pr. Kr. govore o Imphotepu koji je liječio pacijente

toplinom, a kasniji zapisi na papirusima govore o tome kako su se Egipćani koristili vrućim oštricama i štapovima u liječenju raka dojke. U staroj Grčkoj i starom Rimu vjerovalo se da hipertermija može izliječiti sve bolesti, što dokazuje rečenica grčkog filozofa Parmenida: „Dajte mi moć stvaranja vrućice i izliječit ću sve bolesti“. Njegovo je mišljenje dijelio i Hipokrat, „otac medicine“. Ovo je mišljenje dijelio i Celzij, Rimljanin koji je u svome djelu *De Medicina* opisao vruću kupku kao tretman za mnoge bolesti. U 19. st. počeli su se zabilježavati slučajevi spontane remisije tumora nakon bakterijske infekcije. Ovaj je fenomen odlučio pominje proučiti liječnik William Coley. On je svojim onkološkim pacijentima davao mješavinu bakterijskih toksina i pratio daljnji tijek događaja. Svojim opažanjima zaključio je da je upravo vrućica uzrokovana infekcijom zaslužna za ovaj fenomen. No, zbog nedovoljno razvijene tehnike koja bi održavala hipertermiju i mjerila točnu temperaturu tumora ova se saznanja nisu koristila u praksi sve donedavno (Toraya-Brown i Fiering 2014). Izlazenjem „Siemensovih diathermia“ uređaja za onkološka liječenja na tržište ova je metoda počela dobivati na značaju. Kombinacija termalne i radioterapije odobrena je 1912. godine. Daljnji napredak u metodi potaknule je i otkriće mikrovalova koji su se ubrzo počeli koristiti u terapijama. Međutim, 1964. godine poznati njemački liječnik Karl-Heinrich Bauer iznio je svoj skepticizam prema ovoj metodi u svoje djelu *Das Krebsproblem*. Njegovo se mišljenje proširilo diljem medicinske zajednice, a neka istraživanja na životinjama pokazala su da hipertermija može čak pospješiti nastanak metastaza. To je sve dovelo u pitanje sigurnost hipertermije za ljude. Ipak, velik broj članaka i pozitivni klinički ishodi nisu dopustili da ideja liječenja tumora toplinom zamre. Danas je hipertermija uobičajena praksa u nekim zemljama, no koristi se samo za ograničen broj vrsta raka (Lee i sur., 2020). Daje se kao dodatak radio- i kemoterapiji.

U razdoblju od 1997. do 2006. godine provedeno je kliničko ispitivanje dugotrajnog učinka hipertermije na ishod pacijenata koji boluju od visokorizičnog lokaliziranog sarkoma mekog tkiva. U ispitivanju je sudjelovalo 329 pacijenata u dobi od 18 do 70 godina s medijanom od 51 godine. Pacijenti koji su uz kemoterapiju primali i regionalnu hipertermiju imali su produljeni život u odnosu na one koji su primali samo kemoterapiju. Pet je godina preživjelo 62,5 % pacijenata koji su primili hipertermiju u odnosu na 51,3 % onih koji nisu, a 10 je godina doživjelo 52,6 % pacijenata koji su primili kombiniranu terapiju u odnosu na 42,7 % onih koji su primili samo kemoterapiju. Dodatak regionalne hipertermije liječenju povećao je medijan duljine života sa 6,2 na 15,4 godine. Uočena je konzistentnost u povećanju preživljenja dodatkom regionalne

hipertermije terapiji neovisno o dobi, spolu ili statusu bolesti (Issels i sur., 2018). Datta i sur. (2016.) napravili su detaljnu analizu dosadašnjih kliničkih slučajeva u kojima se koristila hipertermija u kombinaciji s radioterapijom u liječenju raka dojke. Izdvojeno je ukupno 1792 pacijenta liječeno hipertermijom i radioterapijom, od kojih je 1483 bilo uključeno u istraživanje s jednom skupinom i 309 u istraživanja s dvije skupine, u koja su još bila uključena i 318 pacijenta liječena samo radioterapijom. U istraživanjima s jednom skupinom 63,4 % ispitanika doživjela je potpuni oporavak. U istraživanjima s dvije skupine 38 % pacijenata liječenih samo radioterapijom postiglo je potpuni oporavak, dok ga je s kombiniranom terapijom doživjelo 60,1 % (Datta, i sur., 2016a). Napravljena je i analiza za rak cerviksa. Skupljena su četiri istraživanja u kojima je ukupno 135 pacijenata bilo izloženo kombinaciji hipertermije i radioterapije, dok ih je samo radioterapiji bilo izloženo 132. U prvom slučaju 75,6 % pacijenata doživjelo je potpuni odgovor, dok ih je u drugom doživjelo 53,8 % (Datta, Rogers, i sur., 2016b). U Tablici 2 prikazani su rezultati provedenih ispitivanja utjecaja hipertermije na različite vrste terapija i tumora prikupljenih od strane Chenga i sur. (2019).

Tablica 2: Rezultati nekih od provedenih ispitivanja o utjecaju hipertermije u kombinaciji s drugim terapijama

vrsta tumora	studirani dizajn	broj pacijenata	klinička korist (%)	lokalna kontrola	sveukupno preživljavanje
sarkom mekog tkiva	EIA plus regionalni HT	169	84,70 %	66 % (4 godine)	59 % (4 godine)
	EIA	172	70,60 %	55 % (4 godine)	57 % (4 godine)
rak dojke	CT plus RIMH	53	75,50 %	—	—
	CT	50	42 %		
tumori zdjelice	RT plus HT	182	55 % (CR)	38 % (3 godine)	30 % (3 godine)
	RT	176	39 % (CR)	26 % (3 godine)	24 % (3 godine)
rak grlića maternice	RT plus HT	58	83 % (CR)	61 % (3 godine)	51 % (3 godine)
	RT	56	57 % (CR)	41 % (3 godine)	27 % (3 godine)
glava i vrat (nemetastatski)	EBRT plus HT	28	78,6 % (pCR)	—	245 dana
	EBRT	26	42,4 % (pCR)		141 dan
rak mjehura	RCT plus RHT	45	96 % (pCR)	85 % (3 godine)	80 % (3 godine)
rak rektuma	RCT plus RHT	61	16,4 % (pCR)	Stopa kirurškog zahvata koji šteti sfinkter (nisko ležeći tumori smješteni unutar 8 cm od analnog ruba): 57% u skupini bez HT naspram 35% u skupini bez HT	
	RCT	45	6,7 % (pCR)		
rak gušterače	CT plus HT	18	61,10 %	—	33 % (1 godina), 17,7 m

Kratice: EIA – etopozid, ifosfamid, adriamicin; HT – hipertermija; CT – kemoterapija; RIMH – regionalna induktivna umjerena hipertermija; RT – radioterapija; EBRT – radioterapija vanjskim snopom; pCR – patološki potpuni odgovor; RCT – radiokemoterapija; RHT – regionalna duboka hipertermija (preuzeto i prilagođeno prema Cheng i sur., 2019).

9. Zaključak

Hipertermija je vrsta tretmana u liječenju malignih tumora u kojoj se koristi povišena temperatura. Umjerena hipertermija dovodi do fiziološke vazodilatacije koja poboljšava oksigenaciju i perfuziju tumorskih stanica. To ih senzitivizira za radio- i kemoterapiju, uz čiju se kombinaciju hipertermija najčešće i daje. Zbog specifične tumorske vaskulature toplina teže napušta tumorska područja te

su ona zbog toga puno osjetljivija na hipertermiju od okolnog normlanog tkiva. Hipertermija je i izvrstan imunomodulator, što i nije iznenađujuće uzmemo li u obzir da je vrućica prirodan imunostimulator. Za postizanje optimalnih rezultata liječenja potrebna je mogućnost individualizacije terapije. Ovisno o pacijentovim potrebama u klinikama se koriste uređaji temeljeni na RF, mikrovalnom zračenju, elektromagnetskom zračenju, ultrazvuku ili IR. Danas najčešće korišteni RF sustavi omogućuju sigurnu i kvalitetnu individualiziranu toplinsku terapiju, kako površinskih tako i dubokih tumora. Nažalost, zbog neadekvatnih veličina uzoraka, opreme, selekcije pacijenata i nestriktnog držanja protokola, pogotovo u ranijim istraživanjima, liječnici često ističu negativne rezultate kao nedostatak koristi hipertermije. Zbog toga je šire prihvaćanje hipertermije u kliničku praksu vrlo otežano. U Europi hipertermija kao terapija u liječenju malignih bolesti može se prakticirati samo u šest zemalja s ukupno 20 centara za liječenje. Za otvaranje novih centara i širenje ove prakse potrebno je provesti edukacije i programe treninga u onkološkim društvima.

10. Literatura

- Abbas A. K., Lichtman A. H., Shiv P. (2018): Diferencijacija i uloge izvršnih CD4⁺ stanica T. U: Batinić D., Lukinović-Škudar V. (ur.) Stanična i molekularna imunologija. Zagreb, Medicinska naklada, str. 213–230.
- Andocs G., Szasz O., Szasz A. (2009): Oncothermia treatment of cancer: From the laboratory to clinic. *Electromagn Biol Med* **28**: 148–165.
- Baronzio G., Gramaglia A., Fiorentini G. (2006): Hyperthermia and Immunity. A Brief Overview. *In Vivo (Brooklyn)* **20**: 689–696.
- Biaassoni R., Malnati M.S. (2018): Human Natural Killer Receptors, Co-Receptors, and Their Ligands. *Curr Protoc Immunol* **121**: 10–14.
- Borsig L. (2018): Selectins in cancer immunity. *Glycobiology* **28**: 648–655.
- Chen Y., Song Y., Du W., Gong L., Chang H., Zou Z. (2019): Tumor-associated macrophages: An accomplice in solid tumor progression. *J Biomed Sci* **26**: 1–13.
- Cheng Y., Weng S., Yu L., Zhu N., Yang M., Yuan Y. (2019): The Role of Hyperthermia in the Multidisciplinary Treatment of Malignant Tumors. *Integr Cancer Ther* **18**: 1534735419876345.
- Coss R.A., Dewey C., Bamburg J.R. (1982): Effects of Hyperthermia on Dividing Chinese Hamster Ovary Cells and on Microtubules in Vitro. *Cancer Res* **42**: 1059–1071.
- Das J.K., Xiong X., Ren X., Yang J.M., Song J. (2019): Heat shock proteins in cancer immunotherapy. *J Oncol* **2019**: 47.
- Datta N.R., Grobholz R., Puric E., Bode-Lesniewska B., Lomax N., Khan S., Gaipl U.S., Fuchs B., Bodis S. (2015a): Enhanced tumour regression in a patient of liposarcoma treated with radiotherapy and hyperthermia: Hint for dynamic immunomodulation by hyperthermia. *Int J Hyperthermia* **31**: 574–577.
- Datta N.R., Kok H.P., Crezee H., Gaipl U.S., Bodis S. (2020): Integrating Loco-Regional Hyperthermia Into the Current Oncology Practice: SWOT and TOWS Analyses. *Front Oncol* **10**: 819.

- Datta N.R., Ordóñez S.G., Gaipl U.S., Paulides M.M., Crezee H., Gellermann J., Marder D., Puric E., Bodis S. (2015b): Local hyperthermia combined with radiotherapy and/or chemotherapy: Recent advances and promises for the future. *Cancer Treat Rev* **41**: 742–753.
- Datta N.R., Puric E., Klingbiel D., Gomez S., Bodis S. (2016a): Hyperthermia and Radiation Therapy in Locoregional Recurrent Breast Cancers: A Systematic Review and Meta-analysis. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* **94**: 1073–1087.
- Datta N.R., Rogers S., Klingbiel D., Gómez S., Puric E., Bodis S. (2016b): Hyperthermia and radiotherapy with or without chemotherapy in locally advanced cervical cancer: a systematic review with conventional and network meta-analyses. *Int J Hyperthermia* **32**: 809–821.
- Dewey W.C. (1989): The Search for Critical Cellular Targets Damaged by Heat. Source: *Radiation Research* **120**: 191–204.
- Dewhirst M.W., Lee C.T., Ashcraft K.A. (2016): The future of biology in driving the field of hyperthermia. *Int J Hyperthermia* **32**: 4–13.
- Hildebrandt B., Wust P., Ahlers O., Dieing A., Sreenivasa G., Kerner T., Felix R., Riess H. (2002): The cellular and molecular basis of hyperthermia. *Crit Rev Oncol Hematol* **43**: 33–56.
- Issels R.D., Lindner L.H., Verweij J., Wessalowski R., Reichardt P., Wust P., Ghadjjar P., Hohenberger P., Angele M., Salat C., Vujaskovic Z., Daugaard S., Mella O., Mansmann U., Roland Dürr H., Knösel T., Abdel-Rahman S., Schmidt M., Hiddemann W., Jauch K.W., Belka C., Gronchi A. (2018): Effect of neoadjuvant chemotherapy plus regional hyperthermia on long-term outcomes among patients with localized high-risk soft tissue sarcoma the EORTC 62961-ESHO 95 randomized clinical trial. *JAMA Oncol* **4**: 483–492.
- Krawczyk P.M., Eppink B., Essers J., Stap J., Rodermond H., Odijk H., Zelensky A., Bree C. Van, Stalpers L.J., Buist M.R., Soullié T., Rens J., Verhagen H.J.M., O'Connor M.J., Frankene N.A.P., Hagen T.L.M. Ten, Kanaar R., Aten J.A. (2011): Mild hyperthermia inhibits homologous recombination, induces BRCA2 degradation, and sensitizes cancer cells to poly (ADP-ribose) polymerase-1 inhibition. *Proc Natl Acad Sci U S A* **108**: 9851–9856.

- Lanneau D., Brunet M., Frisan E., Solary E., Fontenay M., Garrido C. (2008): Heat shock proteins: Essential proteins for apoptosis regulation: Apoptosis Review Series. *J Cell Mol Med* **12**: 743–761.
- Lee S.Y., Fiorentini G., Szasz A.M., Szigeti G., Szasz A., Minnaar C.A. (2020): Quo Vadis Oncological Hyperthermia (2020)? *Front Oncol* **10**: 1690.
- Multhoff G., Pockley A.G., Streffer C., Gaipf U.S. (2012): Dual Role of Heat Shock Proteins (HSPs) in Anti-Tumor Immunity. *Curr Mol Med* **12**: 1174–1182.
- Oei A.L., Vriend L.E.M., Crezee J., Franken N.A.P., Krawczyk P.M. (2015): Effects of hyperthermia on DNA repair pathways: One treatment to inhibit them all. *Radiat Oncol* **10**: 1–13.
- Overgaard J. (2013): The heat is (still) on - The past and future of hyperthermic radiation oncology. *Radiother. Oncol.* **109**: 185–187.
- Papac R.J. (1996): Spontaneous regression of cancer. *Cancer Treat Rev* **22**: 395–423.
- Priester M.I., Curto S., Rhoon G.C. van, Hagen T.L.M. Ten (2021): External basic hyperthermia devices for preclinical studies in small animals. *Cancers (Basel)* **13**: 4628.
- Ross E.A., Devitt A., Johnson J.R. (2021): Macrophages: The Good, the Bad, and the Gluttony. *Front Immunol* **12**: 708186.
- Sutmuller R.P.M., Duivenvoorde L.M. Van, Elsas A. Van, Schumacher T.N.M., Wildenberg M.E., Allison J.P., Toes R.E.M., Offringa R., Melief C.J.M. (2001): Synergism of Cytotoxic T Lymphocyte-associated Antigen 4 Blockade and Depletion of CD25 Regulatory T Cells in Antitumor Therapy Reveals Alternative Pathways for Suppression of Autoreactive Cytotoxic T Lymphocyte Responses. *J Exp Med* **194**: 823–832.
- Szasz A., Iluri N., Szasz O. (2013): Local Hyperthermia in Oncology – To Choose or not to Choose? U: Huilgol, N. (ur.) Hyperthermia. InTech, str. 1–83.
- Toraya-Brown S., Fiering S. (2014): Local tumour hyperthermia as immunotherapy for metastatic cancer. *Int J Hyperthermia* **30**: 531–539.

Urano M., Kuroda M., Nishimura Y. (1999): For the clinical application of thermochemotherapy given at mild temperatures. *Int J Hyperthermia* **15**: 79–107.

Westra A., Dewey W.C. (1971): Variation in sensitivity to heat shock during the cell-cycle of Chinese hamster cells in vitro. *Int J Radiat Biol* **19**: 467–477.

Yang. K. L., Huang C.C., Chi M.S., Chiang H.C., Wang Y.S., Hsia C.C., Andocs G., Wang H.E., Chi K.H. (2016): In vitro comparison of conventional hyperthermia and modulated. *Oncotarget* **7**: 84082–8409.

Životopis

Rođena sam 4.12.2001. godine u Zagrebu. Pohađala sam Osnovnu školu Bartola Kašića u razdoblju 2008. – 2016. godine. Potom sam upisala XV. gimnaziju u Zagrebu (prirodoslovno-matematički smjer) tijekom koje sam se naučila snalaziti u programskom jeziku Python. Godine 2020. upisala sam prijediplomski studij Molekularne biologije na Prirodoslovno-matematičkom fakultetu Sveučilišta u Zagrebu. Tijekom studija sudjelovala sam na Smotri sveučilišta predstavljajući studij Molekularne biologije na štandu (2021. godine). Dva sam puta sudjelovala u Noći biologije, što je uključivalo osmišljavanje i snimanje videa na temu mutacija u virusa i imunom odgovoru na njih pod naslovom „Uhvati me ako možeš“ (2022. godine) i osmišljavanje i izvođenje raznih pokaznih vježbi za djecu osnovnoškolskog i srednjoškolskog uzrasta iz područja bakteriologije, biljne fiziologije i genetičkog inženjerstva (2023. godine). Uz to, sudjelovala sam kao volonter na Tjednu mozga koji se održavao 2023. godine na Hrvatskom institutu za istraživanje mozga. Napisala sam članak o temi zrcalnih neurona za studentski časopis *In vivo*. Sudjelovala sam u izradi rada pod naslovom „The role of heat acclimation in the response of *Arabidopsis thaliana* with altered DMS3 expression to heat stress“ koji je bio predstavljen na Simpoziju studenata biologije. Moj je doprinos, osim eksperimentalni rad, bio statistička obrada podataka. Obavljala sam stručnu praksu na Institutu Ruđer Bošković pod mentorstvom dr. sc. Bone Lučića (Centar za NMR) i dr.sc. Ivana Mihaljevića (Zavod za istraživanje mora i okoliša, Laboratorij za molekularnu ekotoksikologiju) podnaslovom „Istraživanje sktrukture i funkcije proteina otpornih na više lijekova iz familije Mate 3 i Mate 7“. Tijekom prakse naučila sam se koristiti programima *Alphafold*, *OPM Database*, *TOPCONS* i *Discovery Studio Visualizer*. Prve dvije godine studija bila sam među 10 % najuspješnijih studenata na svom smjeru. Prvu i drugu godinu primala sam STEM stipendiju, dok sam treću godinu primala sveučilišnu stipendiju za izvrsnost.