

## Immunotherapy and radiotherapy: An effective combination therapy against cancer

Sahar Khastar<sup>1</sup>, Haniyeh Ghaffari-Nazari<sup>2</sup>, Seyed Amir Jalali<sup>1\*</sup>

1.Department of Immunology, Medical School, Shahid Beheshti University of Medical Sciences, Tehran, Iran

2.Immunogenetic and Cell Culture Department, Immunology Research Center, School of Medicine, Mashhad University of Medical Sciences, Mashhad, Iran

(Received: 2020/01/21

Accepted: 2020/08/25)

### Abstract

**Background and Aims:** Radiotherapy (RT) is an effective treatment in the field of cancer. Since the potential effect of RT is heavily dependent on the patient's immune system, using the immunotherapy to enhance the radiotherapy effects seems to be a positive step in the treatment of cancer.

**Materials and Methods:** In order to write the present review article, keywords including radiotherapy, immunotherapy, combination therapy, and immune-checkpoint inhibitors antibodies were searched in reliable databases, including Google Scholar, PubMed, Scopus, and Elsevier. Among potential candidates, those which were the most relevant to the purpose of the study and evaluated the combination of radiotherapy and immunotherapy with immune-checkpoint inhibitors antibodies were selected.

**Conclusion:** RT has distinct effects on the tumor microenvironment which can either inhibit or promote tumor growth. By inducing immunogenic cell death results in releasing danger signals, RT increases in cytokine/chemokine secretion, recruits immune cells, and alters the expression of CTLA4-, PD1-, and PD-L1 molecules on tumor and immune cells. Previous studies showed that the combination of immunotherapy and RT (radio-immunotherapy) induces the synergic effects on stimulation of anti-tumor immune response. Due to the change in the expression of immune-checkpoint molecules, including CTLA4- and PD1- on tumor and immune cells, and the impact on anti-tumor immune function in controlling tumor growth as a result of radiotherapy, it seems that a rational solution to overcome the inhibitory effects and to enhance the anti-tumor effects of RT is anti-checkpoint antibodies (anti-CTLA4- and anti-PD1-). However, some factors including dose, type of radiation, and the timing of RT in relation to administration of checkpoint inhibitors are some of the challenges along this way.

**Keywords:** Radiotherapy; Immunotherapy; Immune-checkpoint inhibitors; Combination therapy

\*Corresponding author: Seyed Amir Jalali

Email: Jalalia@sbmu.ac.ir

## ایمونوتراپی و رادیوتراپی: یک درمان ترکیبی موثر علیه سرطان

سحر خواستار<sup>۱</sup>، هانیه غفاری نظری<sup>۲</sup>، سید امیر جلالی<sup>۱\*</sup>

۱. گروه ایمنولوژی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی شهید بهشتی، تهران، ایران  
 ۲. گروه ایمنونوتیک و کشت سلولی، مرکز تحقیقات ایمنولوژی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی شهید، مشهد، خراسان رضوی، ایران

پذیرش: ۱۳۹۹/۶/۴

دریافت: ۱۳۹۸/۱۱/۱

## چکیده:

**سابقه و هدف:** در حال حاضر رادیوتراپی از درمان‌های پرکاربرد در حوزه سرطان است. با توجه به اینکه اثربخشی رادیوتراپی کاملاً وابسته به سیستم ایمنی بیمار است، بنظر می‌رسد استفاده از ایمونوتراپی به منظور تقویت اثرات رادیوتراپی گامی مثبت در جهت درمان سرطان باشد.

**مواد و روش‌ها:** به منظور نگارش مقاله مروری حاضر کلمات کلیدی از جمله رادیوتراپی، ایمونوتراپی، درمان ترکیبی و آنتی‌بادی‌های مهارکننده مسیرهای بازرسی ایمنی در پایگاه‌های اطلاعاتی معتبر مانند: گوگل اسکولار، پاب مد، اسکوپوس و الزویر جستجو شد. در این میان مطالعاتی که بیشترین ارتباط را با اهداف نگارش این مقاله داشتند و به ارزیابی درمان ترکیبی رادیوتراپی و ایمونوتراپی با آنتی‌بادی‌های مهارکننده مسیرهای بازرسی ایمنی پرداخته بودند، انتخاب و مورد استفاده قرار گرفتند.

**نتیجه‌گیری:** رادیوتراپی تأثیرات بسیار متنوعی بر ریزمحیط تومور می‌گذارد که بعضی از این تغییرات مانع رشد و برخی دیگر باعث تقویت رشد تومور می‌شوند. رادیوتراپی با القا مرگ سلولی ایمنونوتیک باعث آزادسازی سیگنال‌های خطر، افزایش ترشح سایتوکاین‌ها و کموکاین‌ها، فراخوانی سلول‌های ایمنی و تغییر در بیان مولکول‌هایی مانند 4-ALTC، 1-DP، 1L-DP سطح سلول‌های توموری و ایمنی می‌شود. مطالعات نشان می‌دهند استفاده از ایمونوتراپی همراه با رادیوتراپی (رادیوایمونوتراپی) در برانگیختن پاسخ‌های ایمنی ضد توموری می‌تواند اثر سینرژیستی ایجاد کند. با توجه به اینکه رادیوتراپی با تغییر بیان مولکول‌های مسیرهای کنترلی سیستم ایمنی از جمله 4-ALTC و 1-DP بر سطح سلول‌های توموری و ایمنی همراه است و بدین ترتیب عملکرد سیستم ایمنی در کنترل تومور را تحت تأثیر قرار می‌دهد؛ به نظر می‌رسد استفاده از ایمونوتراپی با آنتی‌بادی‌های مهارکننده این دو مولکول (4-ALTC-itnA و 1-DP-itnA) در ترکیب با رادیوتراپی راه حل منطقی برای غلبه بر اثرات مهارتی و تقویت اثرات ضد توموری رادیوتراپی می‌باشد. با این وجود عواملی مثل دوز و نوع رادیوتراپی و همچنین زمان استفاده از مهارکننده‌های مسیرهای بازرسی در کنار رادیوتراپی از جمله چالش‌های موجود در این مسیر می‌باشند.

**واژگان کلیدی:** رادیوتراپی، ایمونوتراپی، آنتی‌بادی‌های مسدودکننده مسیرهای بازرسی سیستم ایمنی، درمان ترکیبی

## مقدمه

مثل شیمی‌درمانی و جراحی برای درمان بیماران مورد استفاده قرار می‌گیرد. (۳) رادیوتراپی به طور مستقیم با آسیب به DNA سلول، القا آپوپتوز در سلول‌های سرطانی و مهار واکنش‌های رگ‌زایی تومور کنترل رشد تومور می‌شود. همچنین رادیوتراپی به طور غیرمستقیم و با فعال کردن سلول‌های T CDA، تسهیل آزادسازی سیگنال‌های خطر<sup>۱</sup> (DAMPs) و القا تولید کموکاین‌ها باعث فراخوانی سلول‌های ایمنی و التهابی به ریزمحیط تومور می‌گردد و بدین ترتیب نقش بسزایی

رادیوتراپی برای انواع سرطان‌های موضعی (Local) و تومورهای توپر (solid) مثل: سرطان سینه، پروستات، پوست، رکتال، آنال و سرویکس یک روش درمانی موثر محسوب می‌شود. همچنین در طیف وسیعی از بیماری‌ها از رادیوتراپی به عنوان یک درمان تسکین‌دهنده استفاده می‌شود. تقریباً در ۵۰ تا ۶۰ درصد بیماران مبتلا به سرطان از رادیوتراپی به عنوان بخشی از فرایند درمان استفاده می‌گردد (۱،۲). این روش درمانی به تنهایی و یا در ترکیب با سایر روش‌های درمانی سرطان

1 Damage-Associated Molecular Patterns

نویسنده مسئول: سید امیر جلالی

پست الکترونیک: Jalalia@sbmu.ac.ir

زیاد است. براساس نوع تومور و حساسیت بافت های اطراف آن، میزان دوز کلی پرتو یونیزان برای هر بیمار تعیین می گردد و این میزان معمولا در کل دوره ی رادیوتراپی بین ۶۰ Gy تا ۸۰ Gy می باشد. گاهی اوقات در رادیوتراپی متداول از دوز های بالاتر و در جلسات درمانی ۷-۳ هفته ای نیز استفاده می شود (۱۰). این در حالی است که آسیب به بافت های اطراف به عنوان مانعی برای افزایش دوز تابش تلقی نشود. یکی دیگر از انواع رادیوتراپی، رادیوتراپی تک دوز بالا (Ablative یا SBRT) است. در این روش دوزهای بالایی از پرتو یونیزان در یک دوره ی یک تا پنج روزه به بافت هدف تابانده می شود. معمولا در این روش از دوزهای محدودی ۲۰ Gy در دوره ی یک تا سه روزه و یا دوز ۳۰ Gy در یک جلسه ی درمانی استفاده می شود. روش Ablative بیشتر برای تومورهای مغزی، متاستازهای مغز استخوان و سرطان ریه کاربرد دارد. (۱۱) چنانچه در روش SBRT از دوزهای ۱۰-۱۵ Gy در مدت زمان پنج تا ده روز استفاده شود به آن رادیوتراپی دوز متوسط رو به بالا در چندین نوبت (Hypo-fraction) نیز گفته می شود که در سرطان های پروستات و پانکراس بیشترین کاربرد را دارند. هر کدام از انواع رژیم های رادیوتراپی که در بالا ذکر شد موارد خاص استفاده ی خود را دارند و بسته به نوع سرطان به کار گرفته می شوند (۱۲، ۱۳).

## ۲- اثرات رادیوتراپی بر ریز محیط تومور

رادیوتراپی با تاثیر بر ریز محیط تومور می تواند باعث رشد و یا مهار سلول های سرطانی شود. رادیوتراپی موضعی (Local) با القا مرگ سلولی و تولید و آزادسازی سایتوکاین ها و کموکاین ها منجر به فراخوانی سلول های دندریتیک، ماکروفاژها، سلول های T کشته (CTL) و سلول های سرکوبگر سیستم ایمنی مثل: سلول های T تنظیمی (T reg) و سلول های سرکوبگر مشتق میلوئیدی (MDSC) به ریز محیط تومور می شود (۱۴-۱۶). القا مرگ سلولی ایمونولوژیک (ICD) و ایجاد یک محیط التهابی در منطقه ی تابش از جمله تئوری های رایج در مورد مکانیسم عمل رادیوتراپی می باشند. در جریان مرگ سلولی ایمونولوژیک آنتی ژن های توموری و مولکول های DAMP مثل: کالرتیکولین، ATP و HMGB1 در محیط آزاد می شوند که منجر به القا تولید سایتوکاین های مختلف و فراخوانی سلول های ایمنی خواهند شد (شکل ۱) (۱۷، ۱۸). با القا ICD تولید سایتوکاین های پیش التهابی همچون  $\beta$ -IL، TGF- $\beta$ ، TNF،  $\beta$  ۱ و FGF (۱۹-۲۱) از چند ساعت تا چندین هفته بعد از تابش پرتو در محل تومور افزایش یافته و طوفان سایتوکاینی در منطقه رخ می دهد. منشا این سایتوکاین ها سلول های توموری و سلول های مرتبط با تومور مثل فیبروبلاست ها، ماکروفاژها و سایر گلبول های سفید می باشند (۲۲).

## ۲-۱- رادیوتراپی و تقویت پاسخ های ایمنی ضد توموری

همانطور که قبلا هم اشاره شد رادیوتراپی در کنترل رشد تومور با واسطه ی سیستم ایمنی نقش بسزایی دارد. در جدول ۱ مولکول هایی که به دنبال رادیوتراپی در سلول های سرطانی تغییر بیان می یابند ذکر شده است. تابش پرتو به سلول های

در سرکوب و کنترل رشد تومور ایفا می کند (۶، ۷، ۴). مطالعات آزمایشگاهی و بالینی نشان داده اند با مهار سیستم ایمنی اثرات رادیوتراپی کاهش می یابد. علاوه بر این در بسیاری از پژوهش ها، استفاده ی همزمان از رادیوتراپی و ایمونوتراپی تاثیر مثبتی بر کنترل تومور داشته است. نقش سیستم ایمنی در اثربخشی رادیوتراپی با پدیده ای تحت عنوان abscopal effect قابل توجه است. این اثر به پدیده ای اطلاق می شود که در آن رادیوتراپی در یک موضع خاص باعث نابودی تومورهای ثانویه موجود در نقاط دیگر بدن (خارج از محدوده ی رادیوتراپی) می گردد. این پدیده در صورت استفاده از رادیوتراپی در کنار ایمونوتراپی ظاهر می گردد و مکانیسم آن تنها با دخالت سیستم ایمنی قابل توجه است. همه ی این شواهد نشان دهنده ی اهمیت بسیار زیاد سیستم ایمنی در اثربخشی رادیوتراپی است (۵). در این مقاله سعی شده با استناد به مقالات مروری و پژوهشی چاپ شده در مجلات معتبر در ابتدا به مرور اثرات رادیوتراپی بر ریز محیط تومور و سیستم ایمنی بپردازیم و سپس تاثیر ایمونوتراپی بویژه با کمک آنتی بادی های مهارکننده ی مسیرهای بازرسی ایمنی در ترکیب با رادیوتراپی را مورد بررسی قرار دهیم.

## مواد و روش ها

این مطالعه به صورت مروری انجام شده است. به منظور دستیابی به مقالاتی که در حوزه ی درمان های ترکیبی رادیوتراپی و ایمونوتراپی بویژه با آنتی بادی های مهارکننده ی مسیرهای بازرسی ایمنی تا سال ۲۰۱۹ منتشر شده اند؛ در پایگاه های اطلاعاتی معتبر پزشکی (به طور عمده PubMed) و موتور جستجوگر Google scholar جستجو انجام شد. عمدتا از کلید واژه های رادیوتراپی، ایمونوتراپی و آنتی بادی های مسدودکننده ی مسیرهای بازرسی ایمنی برای دستیابی به مقالات و جستجو در پایگاه های اطلاعاتی استفاده شد. نزدیک به ۹۰۰ مقاله به دست آمد از میان نتایج جستجو مقالات مروری، مقالات مروری نظام مند و مقالات فراتحلیلی کنار گذاشته شدند و حدودا ۳۰۰ مقاله باقی ماند. از میان مقالات باقیمانده مقالاتی که بیشترین ارتباط را با اهداف مطالعه حاضر داشتند و با تمرکز بر موضوع هایی مانند انواع رادیوتراپی، تاثیر رادیوتراپی بر ریز محیط تومور، تاثیر رادیوتراپی بر سیستم ایمنی، ایمونوتراپی با آنتی بادی های مهارکننده ی مسیرهای بازرسی ایمنی، درمان های ترکیبی رادیوتراپی و ایمونوتراپی و تقویت رادیوتراپی با کمک ایمونوتراپی بویژه آنتی بادی های مهارکننده ی مسیرهای بازرسی ایمنی مورد استفاده قرار گرفت. با نظر گرفتن معیارهای ذکر شده در پایان ۶۵ مقاله انگلیسی زبان انتخاب شدند و مورد استفاده قرار گرفتند.

لازم به ذکر است که مقالات مورد استفاده در این پژوهش از مجلات علمی معتبر انگلیسی زبان و دارای ضریب تاثیر بالا در حوزه ایمونوتراپی و رادیوتراپی نظیر Lancet, Cancer research, Nature, International Journal of Radiation Oncology Biology Physics انتخاب و مورد بررسی قرار گرفته اند.

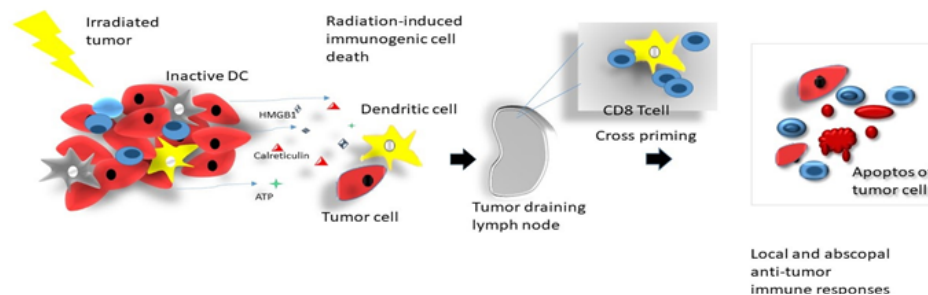
## یافته ها و بحث

### ۱- انواع مدل های رادیوتراپی

دوز مورد استفاده در جلسات رادیوتراپی باید به نحوی تنظیم گردد که برای سلول های توموری خاصیت کشندگی (cytotoxic) داشته باشد ولی به بافتهای سالم اطراف تومور کمترین آسیب را وارد نماید (۸، ۹). در رادیوتراپی نوع متداول (Conventional) که رادیوتراپی دوز پایین و در دفعات زیاد (Hyper-fraction) نیز نامیده می شود؛ در هر جلسه ی درمانی از دوز های پایین حدود  $1/5-2/2$  Gy، واحد دوز پرتو یونیزان مورد استفاده در رادیوتراپی است) استفاده می شود، اما تعداد جلسات معمولا

1 Gray

## 2 Stereotactic Radiation Therapy



**شکل ۱: اثر رادیوتراپی بر ریز محیط تومور.** با تابش پرتوهای رادیوتراپی تعدادی از سلول های توموری دچار آپوپتوز شده و مولکول های DAMP (کالرتیکولین، ATP و HMGB1) آزاد می گردند. این مولکول ها باعث فعال شدن و بلوغ سلول های دندریتیک می شوند و در ارتشاح سلول های TCD4 به منطقه تومور نقش بسزایی دارند. در غدد لنفاوی سلول های دندریتیک آنتی ژن توموری را به سلول های TCD4 عرضه و سبب فعال آنها می شوند. سلول های T فعال شده نیز باعث القای ایمنی ضد توموری موضعی (منطقه تومور) و سیستمیک (نواحی دورتر و متاستاتیک) می گردند.

## ۲-۲ - رادیوتراپی و سرکوب سیستم ایمنی

طوفان سایتوکاین ناشی از رادیوتراپی سبب تولید غلظت‌های بالایی از  $TGF-\beta$  در محیط می‌گردد که نقش بسزای پروماتناستازی و پرتوموموری دارد. این سایتوکاین باعث مهار عرضه‌ی آنتی ژن به سلول‌های T اختصاصی و محافظت سلول‌های توموری در برابر تخریب توسط پرتو می‌شود (۲۱). IL-۶ از دیگر سایتوکاین‌های پیش التهابی است که از سلول‌های توموری و ماکروفاژهای همراه تومور (TAM) آزاد شده و باعث تکثیر، افزایش قدرت تهاجم (متاستاز) و مقاومت سلول‌های سرطانی به رادیوتراپی می‌شود (۳۰). مطالعات نشان داده‌اند دوزهای بسیار بالای رادیوتراپی ماکروفاژها را به سمت تمایز به فنوتایپ M۲ سوق می‌دهند. ماکروفاژهای M۲ هم به نوبه خود در پیشرفت تومور شرکت می‌کنند (۳۱). فراخوانی سلول‌های T تنظیمی به محیط تومور توسط سلول‌های لانگرهانس پوستی مقاوم به رادیوتراپی از دیگر عواملی است که به بقا و رشد سلول‌های توموری کمک می‌کند (۳۲). در مدل‌های توموری موشی رادیوتراپی با دوز ۱۲ Gy با افزایش بیان مولکول‌های PD-L۱ روی سلول‌های توموری همراه بوده و باعث سرکوب عملکرد ضد توموری سلول‌های T فراخوانی شده به محل تومور می‌گردد (۳۳).

## ۳- ترکیب رادیوتراپی و ایمونوتراپی (رادپوایمونوتراپی)

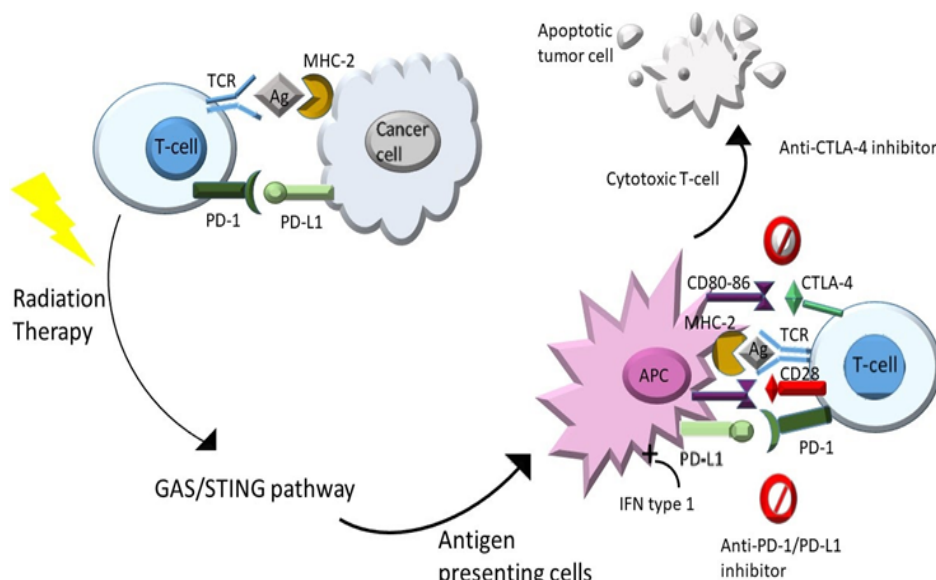
با توجه به اثرات مهاری و تحریکی که رادیوتراپی روی ایمنی ضد تومور دارد؛ استفاده از روش‌های مختلف ایمونوتراپی نظیر واکسن‌ها (۳۴)(۳۵)(۳۶) و آنتی‌بادی‌های مونوکلونال (۳۷) در کنار رادیوتراپی به منظور تقویت اثرات ضد توموری و کاهش اثرات مهاری رادیوتراپی روی سیستم ایمنی منطقی به نظر می‌رسد. مطالعات بالینی که از مهارکننده‌های مسیرهای بازرسی سیستم ایمنی (immune checkpoint inhibitors) در ترکیب با رادیوتراپی استفاده کرده‌اند با موفقیت‌های چشمگیری همراه بوده‌اند (شکل ۲). سیستم ایمنی دارای چندین مسیر بازرسی است که در مهار یا تحریک برخی عملکردهای سلول T دخالت دارند (۳). نقاط بازرسی از طریق مهار مسیرهای انتقال سیگنال در سیستم ایمنی سبب حفظ تحمل نسبت به خود

توموری سبب آسیب سلول‌ها و آزاد شدن DNA سلولی می‌شود. DNA آزاد شده توسط سلول‌های فاگوسیت‌کننده شناسایی و موجب راه اندازی مسیر STING در این سلول‌ها و در نهایت تولید اینترفرون‌های کلاس یک (IFN  $\alpha/\beta$ ) می‌شود (۲۳). اینترفرون‌های کلاس یک باعث عرضه‌ی بیشتر مولکول‌های MHC کلاس یک بر سطح سلول‌های توموری و افزایش بیان VCAM بر سطح سلول‌های اندوتلیال رگ‌های تغذیه‌کننده تومور می‌شوند و به دنبال آن سلول‌های T اختصاصی به ناحیه تومور مهاجرت کرده و به صورت اختصاصی سلول‌های توموری را شناسایی می‌کنند. با شناسایی موثر سلول‌های تومور توسط سلول‌های T اختصاصی مهاجرت یافته به محل تومور، IFN  $\gamma$  تولید می‌گردد و باعث هدایت تمایز ماکروفاژها به سمت فنوتایپ M۱ می‌شود و این امر توانایی سیستم ایمنی برای سرکوب تومور را افزایش می‌دهد (۲۴). علاوه بر این در پی آسیب سلول‌های توموری کالرتیکولین که از پروتئین‌های ساکن شبکه اندوپلاسمی است، سطح سلول‌های توموری ظاهر می‌شود. حضور کالرتیکولین بر سطح سلول منجر به جذب سلول‌های دندرتیک به ناحیه تومور و به دنبال آن عرضه‌ی بیشتر آنتی‌ژن‌های توموری می‌گردد (۲۵،۲۶). سلول‌های توموری پرتو دیده همچنین پروتئین اتصال یابنده به کروماتین بنام HMGB۱ را آزاد می‌کنند که باعث تسهیل عرضه‌ی آنتی ژن و تولید IFN  $\alpha/\beta$  توسط سلول‌های دندرتیک می‌شود. مقادیر کاهش یافته‌ی کالرتیکولن و HMGB۱ با پیش‌آگهی بد در درمان سرطان با رادیوتراپی همراه است. (۲۷) علاوه بر این در جریان رادیوتراپی بسیاری از سلول‌های ناحیه‌ی اشعه دیده دچار نکروز می‌شوند. این سلول‌های نکروز یافته مورد هدف مولکول‌های IgM قرار گرفته و با اتصال IgM به این سلول‌ها سیستم کمپلمان روی آنها فعال می‌شود و در نهایت سبب نابودی سلول‌ها می‌گردد. مطالعات حاکی از آن است، یکبار استفاده از رادیوتراپی با دوز بالا سیستم کمپلمان را فعال می‌کند و با اتصال کمپلمان به IgM متصل شده به سلول‌های نکروزه باعث نابودی تومور می‌شود (۲۸)؛ اما فعال کردن چندباره‌ی سیستم کمپلمان به دنبال جلسات متعدد رادیوتراپی با اثرات منفی در کنترل تومور می‌تواند همراه باشد (۲۹).

جدول ۱: لیست ژن‌های القا شده توسط رادیوتراپی و دخیل در ایمنی تومور

نام ژن	عملکرد	تغییرات در اثر رادیوتراپی
ICAM-1	لیگاند LFA	کاهش بیان روی سلول‌های توموری
MHCI/II	با پذیرنده‌ی سطح سلول T برهمکنش می‌دهد	افزایش بیان روی سلول‌های توموری
IFN $\gamma$	سایتوکاین مهم در سیستم ایمنی ذاتی و اکتسابی که در دفاع ضد ویروسی، ضد باکتری‌های داخل سلولی و ضد توموری نقش دارد	افزایش تولید
LFA-3(CD58)	تسهیل اتصال سلول‌های T کمکی و سلول‌های عرضه کننده‌ی آنتی‌ژن و همچنین سلول‌های عملکردی سیتوتوکسیک و سلول‌های هدف آنها	افزایش بیان روی سلول توموری
B7-1(CD80)	فراهم آورنده‌ی سیگنال‌های کمک محرکی در سلول‌های T به واسطه‌ی اتصال به CD۲۸ و CTLA-۴	افزایش بیان روی سلول‌های عرضه کننده‌ی آنتی‌ژن
CTLA-4	انتقال سیگنال‌های مهاری به سلول T	در مطالعات رادیوتراپی استفاده از آنتی‌بادی ضد CTLA-۴ باعث القا پاسخ‌های ضد توموری موثر از فعال شدن سیستم ایمنی و مهار سلول‌های Treg شده است.
HNGB1	فعال کردن سلول‌های عرضه کننده‌ی آنتی‌ژن، تحریک پردازش آنتی‌ژن و عرضه آنتی‌ژن به سلول T	القا بیان
HSP70	فعال کردن سلول‌های عرضه کننده‌ی آنتی‌ژن، تحریک پردازش آنتی‌ژن و عرضه آنتی‌ژن به سلول T	افزایش سطوح داخل سلولی و خارجی سلولی
MICA, MICB	فعال کردن سلول‌های $T \gamma \delta$ , NK, NKT, T $\alpha \beta$ و CD۸ از طریق گیرنده‌ی NKG۲D	القا بیان MICA و MICB
ULBP 1-2-3	فعال کردن سلول‌های $T \gamma \delta$ , NK, NKT, T $\alpha \beta$ و CD۸ از طریق گیرنده‌ی NKG۲D	القا بیان لیگاند ULBP۱ (NKG۲D-۳-۲)
FAS-L	اتصال FAS-FASL سبب فعال شدن کاسپاز و القا آپوپتوز می‌شود	افزایش تنظیمی بیان FASL روی سلول‌های سرطانی
PD-L1	سرکوب عملکرد ضد توموری سلول‌های T فیلتر شده به محل تومور	افزایش بیان روی سلول‌های توموری
Calreticulin	مولکول مهم در ساخت و بیان سطح سلولی مولکول MHC	افزایش عرضه سطح غشای سلولی
FOXO3a	سبب شروع آپوپتوز از طریق القا بیان ژن‌های کلیدی مرگ سلولی مثل ژن‌های TNFSF۶	افزایش بیان و قرارگیری در هسته

از طریق القا مولکول NKG2D سطح سلول‌های توموری و مستعد شدن این سلول‌ها جهت کشته شدن توسط سلول‌های NK می‌شود. Demaria و همکارانش در مدل موشی کارسینوما پستان (۴T۱) نشان دادند استفاده از رادیوتراپی Gy۱۲ و مهار ۴-CTLA از متاستاز ریه در موش‌ها جلوگیری می‌کند؛ آنها همچنین تاکید کردند این پاسخ‌های موثر درمانی با کمک سلول‌های CD۸+ القا می‌شود (۴۴). همین گروه در مطالعه‌ی دیگری نشان دادند رژیم‌های رادیوتراپی با تعداد دفعات کم (۳ × ۸ Gy) همراه با anti-CTLA۴ در القا ارتشاح سلول‌های سیستم ایمنی به منطقه‌ی تومور و ایجاد اثرات abscopal بسیار موثرتر از استفاده‌ی هر یک از این دو درمان به صورت جداگانه عمل می‌کند (۴۵).



شکل ۲- ترکیب رادیوتراپی و ایمونوتراپی

همچنین نتایج مطالعات بالینی انجام شده

با ۴-anti-CTLA در بیماران مبتلا به ملانوما، لنفوم، سرطان پروستات و تومور غدد فوق کلیه با تحلیل تومور، ایجاد پاسخ‌های پایدار در برابر بیماری و افزایش نرخ بقا در بیماران همراه بوده است (۴۶-۴۸).

### ۳-۲- مهار مسیر بازرسی ۱-PD/۱-PDL

گیرنده‌های ۱-PD از دیگر مسیرهای بازرسی سیستم ایمنی هستند. در سال ۱۹۹۲ مولکول ۱-PD روی سلول‌های T فعال کشف شد این مولکول با مهار فعال شدن سلول‌های T سبب محدود شدن پاسخ‌های التهابی و واکنش‌های خود ایمنی در بافت‌های محیطی می‌شود (۴۹). مولکول ۱-PD توسط سلول‌های T تنظیمی که در مهار سیستم ایمنی نقش دارند نیز بیان می‌شود. مولکول PD-L۱ یکی از لیگاند‌های مولکول ۱-PD می‌باشد که در سال ۱۹۹۹ شناسایی شد (۵۰). ۱-PD با اتصال به لیگاند‌های خود باعث فراخوانی فسفاتازها به انتهای دم سیستم‌های TCR شده و با مهار عملکرد کینازها سلول T را غیرفعال می‌کند. بیان ۱-PD در برخی سایتوکاین‌های التهابی تنظیم می‌شود و این مسیر کنترلی برای مواجهه طولانی مدت با آنتی ژن‌های خودی، تومورها و عفونت‌های مزمن حایز اهمیت است. در بسیاری از بدخیمی‌ها میان بیان گسترده‌ی ۱-PD و مهار پاسخ‌های ایمنی ضد توموری ارتباط معناداری وجود دارد. PD-L۱ روی سلول‌های طبیعی قابل شناسایی نیست اما در حضور سایتوکاین‌های التهابی بویژه اینترفرون‌های کلاس یک و دو بیان آن روی انواع سلول‌ها القا می‌شود. در بسیاری از سرطان‌ها PD-L۱ به صورت القایی و یا مداوم بیان می‌گردد و سبب فرار سلول‌های توموری از شناسایی و کشته شدن توسط سلول‌های سیستم ایمنی می‌شود (۵۱). با توجه به اینکه بیان PD-L۱ توسط اینترفرون گاما القا می‌شود و اینترفرون گاما از جمله سایتوکاین‌هایی است که در طول پاسخ‌های ایمنی ضد توموری تولید می‌شود؛ بیان مولکول‌های PD-L۱ سطح سلول‌های توموری به عنوان یکی از مکانیسم‌های اکتسابی مقاومت تومور در برابر سیستم ایمنی محسوب می‌گردد (۵۲). بررسی سطح بیان مولکول‌های ۱-PD و PD-L۱ در بیماران به پیش‌بینی وضعیت پاسخ به درمان با مهارکننده‌های آنها کمک می‌کند. بررسی‌ها نشان می‌دهند مهار محور ۱-PD/PD-L۱ می‌تواند سبب فعال شدن مجدد سلول‌های T عملکردی (effector T cell) در برابر سلول‌های توموری گردد (۵۳،۵۴). مطالعات بالینی در بسیاری از سرطان‌های مقاوم به ایمونوتراپی نشان داده‌اند؛ مهار محور ۱-PD/PD-L۱ قادر به ایجاد پاسخ‌های ضد توموری پایداری در بیماران است (۵۵،۵۶). استفاده از دوز بالای رادیوتراپی همراه با anti-PD-L۱ در مدل یک موشی توموری با پس‌رفت و بهبودی تومور همراه بوده است. در این مطالعه ایمونورادیوتراپی سبب کاهش چشمگیر سلول‌های

(تولرانس) گشته و از بروز خودایمنی جلوگیری می‌کنند. همچنین این نقاط بازرسی در تنظیم التهاب نقش دارند و در طول فعالیت سیستم ایمنی مانع آسیب به بافت‌های بدن می‌شوند. در سلول‌های سرطانی اختلال تنظیمی در عملکرد نقاط بازرسی سبب کاهش شناخت و فرار این سلول‌ها از سیستم ایمنی بدن می‌شود. بنابراین هدف قرار دادن این رستپورهای مهاری می‌تواند منجر به فعال شدن سیستم ایمنی و تقویت پاسخ‌های T اختصاصی ضد توموری شود (۳۸) (۳۹).

**شکل ۲- ترکیب رادیوتراپی و ایمونوتراپی.** در ابتدا آنتی‌ژن‌های توموری توسط سلول T شناسایی می‌شود اما به دلیل بروز PD-L۱ سطح سلولی توموری و فعال شدن مسیر ۱-PD/PD-L۱ سلول T غیرفعال شده و قادر به کشتن سلول توموری نخواهد بود. با تاباندن پرتو یونیزان سلول‌های توموری آپتوز می‌شوند و با آزاد شدن DNA سلولی در سیتوپلاسم مسیر STING فعال می‌شود و ترشح IFN  $\alpha/\beta$  را افزایش می‌دهد. IFN  $\alpha/\beta$  باعث افزایش فعالیت APC و عرضه‌ی آنتی‌ژن‌های توموری به سلول‌های T و افزایش سیگنال‌های CD۲۸ و فعال شدن سلول T می‌گردد. از طرف دیگر استفاده از رادیوتراپی در ترکیب با ۴-anti-CTLA و ۱-anti-PD باعث مهار این مولکول‌ها و فعال شدن مجدد سلول‌های T کشنده ضد تومور و القا مرگ سلولی در سلول‌های توموری می‌گردد.

### ۳-۱- مهار مسیر بازرسی ۴-CTLA

از جمله مسیرهای بازرسی در سیستم ایمنی مسیر ۴-CTLA می‌باشد که واکنش‌های خودایمنی سلول‌های T را تنظیم می‌کند. رستپور ۴-CTLA در دهه‌ی ۱۹۸۰ روی سلول‌های T عملکردی فعال (Activated effector T cell) و سلول‌های T تنظیمی کشف شد (۴۰). James Allison و همکارانش نشان دادند مولکول ۴-CTLA با مولکول CD۲۸ برای اتصال به لیگاند B۷ رقابت می‌کند و به این ترتیب سبب مهار ترشح IL-۲ و تکثیر سلول‌های T می‌شود و دامنه‌ی فعال شدن این سلول را کاهش می‌دهد (۴۱). مطالعات روی مدل‌های توموری حیوانی نشان دادند استفاده از آنتی‌بادی‌های مسدود کننده‌ی ۴-CTLA می‌تواند سبب درمان تومور گردد. نهایتاً در سال ۲۰۱۱ و به دنبال مطالعات بالینی انجام شده آنتی‌بادی مونوکلونال impilimumab به عنوان اولین دسته از آنتی‌بادی‌های مونوکلونال ۴-CTLA checkpoint inhibitor برای درمان ملانوما پیشرفته توسط سازمان غذا و دارو (FDA) مورد تایید قرار گرفت (۴۲،۴۳). ایمونوتراپی با استفاده از ۴-anti-CTLA در ترکیب با درمان‌های دیگر مثل واکسیناسیون، شیمی‌درمانی و رادیوتراپی مورد بررسی قرار گرفته است. در مطالعات آزمایشگاهی استفاده از ترکیب رادیوتراپی و ایمونوتراپی با ۴-anti-CTLA باعث نابودی سلول‌های توموری

#### ۴-۱- دوز رادیوتراپی

دوز رادیوتراپی می‌تواند اثرات مهارى و یا تحریکی روی سیستم ایمنی داشته باشد. در مطالعات آزمایشگاهی از ترکیب‌های متفاوت ایمونوتراپی و رادیوتراپی با دوزهای مختلف (۵-Gy۲۰) استفاده شده است. بر اساس این مطالعات بیشترین تاثیر رادیوتراپی برای تحریک سیستم ایمنی در دوزهای خاصی رخ می‌دهد؛ بطور مثال در ترکیب سایتوکاین‌تراپی با رادیوتراپی، بیشترین اثرات سینرژیک در دوز Gy۱۰ مشاهده شده و باعث کنترل رشد تومور در ۷۰٪ موش‌ها شده است؛ در حالی که دوزهای Gy ۲-۵ فقط در ۵۰-۱۰٪ موش‌ها رشد تومور را کنترل کرده است (۶۱). در مطالعه‌ی دیگری مطرح شده دوز های Gy ۱۲-۱۸ رادیوتراپی باعث تضعیف ایمونونیسیتیهی تومور از طریق تخریب DNA آزاد شده از سلول توموری توسط آنزیم اندونوکلاز Trex۱ می‌شود؛ در حالی که دوزهای پایین‌تر باعث تحریک ترشح IFN $\beta$  و فعال کردن زیرمجموعه‌ای از سلول‌های دندریتیک می‌شوند که برای فعال کردن سلول‌های TCD۸+ بسیار اهمیت دارند (۶۲). متناقض بودن نتایج مطالعات می‌تواند به دلایلی همچون تفاوت در نوع مدل سرطانی، روش رادیوتراپی، نوع ترکیب مورد استفاده برای ایمونوتراپی و سایر موارد باشد. بنابراین، برای یافتن دوز بهینه‌پروتودمانی که قادر به ایجاد بیشترین اثرات سینرژیک با ایمونوتراپی‌ها در بیماران باشد همچنان مطالعات در حال انجام می‌باشند.

#### ۴-۲- تعداد دفعات رادیوتراپی

دفعات یا تعداد جلسات رادیوتراپی از دیگر فاکتور کلیدی در نحوه‌ی اثر رادیوتراپی روی سیستم ایمنی است. تعداد جلسات رادیوتراپی از لحاظ کاهش آسیب به بافت‌های سالم و قراردادن سلول‌های توموری در فازهای حساس سیکل سلولی دارای اهمیت است. تکنیک‌های رادیوتراپی مدرن روی کاهش جلسات رادیوتراپی و جلوگیری از لنفوپنی در بیماران تمرکز دارند (۶۳). در مدل‌های آزمایشگاهی استفاده از checkpoint inhibitor و رادیوتراپی با دوزهای Gy ۸ تا Gy ۱۲/۵ در دو تا سه جلسه (روش hypofraction) نسبت به استفاده رادیوتراپی تک دوز پاسخ‌های ضد توموری قوی‌تری را القا کرده و ریزمحیط توموری مناسبی برای عملکرد بهتر سیستم ایمنی فراهم آورده است (۴۵)(۶۴). تلاش در راستای یافتن دوز بهینه‌ی رادیوتراپی به منظور بکارگیری در فرایندهای درمانی ترکیبی همچنان ادامه دارد.

MDSC به دنبال افزایش ارتشاح سلول‌های CD۸+ در منطقه‌ی تومور شده است. همچنین این مطالعه نشان داد با تخلیه‌ی سلول‌های CD۸+ در میزبان، سطح سلول‌های MDSC به حالت قبل باز می‌گردد. (۳۳). Zeng و همکارانش نشان دادند رادیوتراپی stereotactic در ترکیب با anti-PD-۱ در مقایسه با تک درمانی میزان بقا را به طور قابل ملاحظه‌ای افزایش می‌دهد (۵۷). Vanpouille Box نیز با مطالعه روی یک مدل گزارش دادند درمان با anti-PD-۱ در ترکیب با رادیوتراپی و مسدود کردن  $\gamma$ -TGF نرخ بقا در موش‌ها را افزایش خواهد داد (۲۱). رادیوتراپی به واسطه‌ی القا مرگ سلولی ایمونوژنیک تومور را به یک واکنس درجا (in situ vaccine) تبدیل می‌کند و با آزاد شدن آنتی‌ژن‌های توموری، خاصیت ایمونوژنیک ریز محیط تومور تقویت می‌گردد و همین امر سبب بهبود عملکرد آماده‌سازی (Priming) سلول‌های T اختصاصی تومور می‌شود. مطالعات مطرح کرده‌اند  $\beta$ -TGF قابلیت رادیوتراپی برای تبدیل تومور به یک واکنس درجا را کنترل می‌کند (۲۱،۵۸). افزایش تعداد سلول‌های TCD۸+ خاطره به دنبال درمان با anti-PD-۱ و رادیوتراپی در مطالعه‌ی گزارش شده است (۶). Dovedi و همکارانش نیز نشان داده‌اند اگر چه سلول‌های NK در ایمنی ضد توموری دخالت دارند اما به نظر می‌رسد اثرات ضد توموری که به واسطه‌ی درمان ترکیبی anti-PD-L۱ و رادیوتراپی ایجاد می‌شوند عمدتاً به سلول‌های CD۸+ T وابسته می‌باشد (۵۹). زمان استفاده از آنتی بادی ضد PD-L۱ و PD-۱ نسبت به زمان رادیوتراپی از نکات حائز اهمیت در رادیوایمونوتراپی است. استفاده همزمان (concurrent) از آنتی بادی‌های ضد PD-L۱ و PD-۱ و رادیوتراپی در مقایسه با استفاده‌ی پشت سر هم (sequential) پاسخ‌های ضد توموری بادوام‌تری را القا می‌کند (۶۰). در حال حاضر مطالعات بالینی زیادی در حوزه‌ی استفاده از ترکیب رادیوتراپی همراه با anti-PD-۱ یا anti-PD-L۱ در حال انجام است که نتایج آنها هنوز منتشر نشده است. در جدول ۲ به تعدادی از مطالعات آزمایشگاهی انجام شده در زمینه‌ی رادیوتراپی و ایمونوتراپی با واسطه‌ی مهارکننده‌های مسیرهای بازرسی سیستم ایمنی اشاره شده است.

#### ۴-۳- چالش‌ها و ملاحظات مهم در رادیوایمونوتراپی

با وجود نتایج امیدوارکننده رادیوایمونوتراپی در مطالعات بالینی اولیه، همه‌ی بیماران به درمان‌های ترکیبی رادیوتراپی و ایمونوتراپی پاسخ نمی‌دهند. فاکتورهای متعددی بر تقویت اثرات ضد توموری رادیوتراپی در ترکیب با ایمونوتراپی موثر هستند.

جدول ۱: لیست ژنهای القا شده توسط رادیوتراپی و دخیل در ایمنی تومور

نتیجه	زمان	درمان ایمونوتراپی	رادیوتراپی	نوع مدل توموری
سلول‌های CD۸+ T برای ایجاد پاسخ موثر در درمان ترکیبی ضروری هستند	همزمان / متوالی	Anti-PD-1* Anti-CD137 Anti-CD40	12Gy $\times$ 1 F* (4-5) Gy $\times$ 4 F	4T1 (Mammary carcinoma cell lines)
القا سایتوکاین پیش‌تهابی CXCL16 و فراخوانی سلول‌های T عملکردی ضد توموری	IT* یک روز بعد از RT*	Anti-CTLA-4	12 Gy $\times$ 2 F	4T1 (Mammary carcinoma cell lines)
RT، واکنس و anti-PD-L1 سبب تبدیل تومور non-T cell-inflamed cancers به cell-inflamed cancers و پس‌رقت تومور می‌شوند	همزمان	Anti-PD-L1 cancer vaccine	20 Gy + 15Gy	Panc02 (Pancreatic tumor)
القا پاسخ‌های T خاطره‌ای اختصاصی تومور	همزمان	Anti-PD-L1 Anti-PD-1	2 Gy $\times$ 5 F	CT26 (murine colon carcinoma cells)
القا پاسخ‌ها نیاز به سلول‌های CD۸+ دارد	IT یک روز بعد از RT	Anti-CTLA-4	12 Gy $\times$ 2 F	4T1 (Mammary carcinoma cell lines)

جدول ۱: لیست ژنهای القا شده توسط رادیوتراپی و دخیل در ایمنی تومور

نتیجه	زمان	درمان ایمونوتراپی	رادیوتراپی	نوع مدل توموری
RT سبب القا تولید اینترفرون بتا، افزایش بیان MHCI و افزایش پاسخ به درمان با Anti-PD-1 می شود	همزمان	Anti-PD-1	12 Gy × 3 F	344SQ parental cell lin (metastatic mouse lung cancer cell line)
تمام دوزهای RT همراه با Anti-CD137 سبب افزایش پاسخ‌های ضدتوموری می شود بیشترین تقویت پاسخ ایمنی در دوز 15Gy دیده می شود	همزمان	Anti-CD137	5 Gy × 1 F 10 Gy × 1 F 15 Gy × 1 F	EMT6 mouse (breast carcinoma) M109 (mouse lung carcinoma)
سلول‌های CD8+ T و IFN-γ برای حفظ پاسخ‌های القا شده با RT ضروری هستند مهیار PD-L1 باعث تقویت پاسخ‌های سلول T می شود	۲۱ روز پس از RT	Anti-PD-L1	15 Gy × 1 F	TUBO (mammary tumor)
دوزهای بالاتر از 12-18 Gy باعث القا DNA اندونوکلئاز Trex1 و مقاومت به RT می شوند سلول‌های دندریتیک وابسته به Batf3 برای آماده‌سازی سلول‌های CD8+ T ضروری اند	همزمان	Anti-CTLA-4	8 Gy × 1 F 20 Gy × 1 F 30 Gy × 1 F 8 Gy × 3 F	TSA (mammary tumor) MCA38 (colon adenocarcinoma)
iNKT نقش مهمی در تنظیم پاسخ به درمان با RT و غیاب iNKT سبب افزایش پاسخ به درمان می شود	IT یک روز بعد از RT	Anti-CTLA-4	12 Gy × 2 F	4T1 (Mammary carcinoma)
رادیوتراپی چند نوبته همراه با Anti-CTLA-4 باعث القا abscopal effect می شود	همزمان	Anti-CTLA-4	20 Gy × 1 F 8 Gy × 3 F 6 Gy × 5 F	TSA (breast carcinoma cells) MCA38 (mouse colon carcinoma)
RT و IT سبب بهبود تغییرات رفتاری و اختلالات شناختی از طریق تغییر در سلیتوکاین‌های پیش التهابی IL-6، IFN-γ، IL-5، IL-2، IL-10 و فاکتور رشد FGF-basic می شوند	IT هفت روز قبل از RT	Anti-CTLA-4	20 Gy × 1 F	CT26 (murine colon carcinoma cells)
استفاده از درمان سه گانه سبب افزایش بقا 50 درصدی و افزایش فیلتراسیون سلول‌های CD4+ و CD8+	همزمان	Anti-CTLA-4 Anti-CD137	10 Gy × 1 F	GL261 (Glioma)
RT سبب کاهش MDSC، Treg، و عملگری می شود سلول‌های T فیلتره شده از لحاظ IFN-γ داخل سلولی مثبت هستند 48 ساعت بعد از RT بیان PD-1 و CD-137 روی CD8+ TIL* افزایش می یابد درمان سه گانه سبب تقویت پاسخ ایمنی و مهیار تومور می شود	همزمان	Anti-PD-L1 Anti-CD137	8 Gy × 3 F	MC38 (colorectal cancer) B16OVA (melanoma) 4T1 (breast cancer)
RT و anti-PD1 در کنترل رشد تومور اثربخش تر از آنتی‌بادی‌های فراخوانی کننده‌ی CD8 عمل می کنند	IT پنج روز پس از RT	Anti-PD-1 D i a b o d i e s (AC133 × CD3)	12 Gy × 2 F	B16CD133 cells (Melanoma)

IT; Immunotherapy, RT; Radiotherapy, F; Fraction, Gy; Gray, CTLA-4; cytotoxic T-lymphocyte associated protein 4, PD-1; programmed cell death 1. PD-L1; programmed cell death ligand 1, TIL; Tumor-infiltrating lymphocytes, IFN γ; Interferon Gamma; MHCI; Major Histocompatibility Complex I, FGF-basic; Fibroblast Growth Factor-basic, iNKT; Invariant natural killer T, MDSCs; myeloid-derived suppressor cells, IL; Interleukin, Trex1; Three Prime Repair Exonuclease 1, Batf3; Basic Leucine Zipper ATF-Like Transcription Factor 3.

### نتیجه گیری

استفاده از عواملی که بتوانند حساسیت سلول‌های سرطانی نسبت به رادیوتراپی را افزایش دهند و باعث سمیت بیشتر رادیوتراپی برای سلول‌های توموری و آسیب کمتر به سلول‌های سالم با استفاده از دوزهای پایین رادیوتراپی گردند، پیشرفت بزرگی در درمان سرطان خواهد بود. در حال حاضر در مبحث سرطان و درمان ترکیبی با استفاده از رادیوتراپی و ایمونوتراپی بیشترین توجه بر اثر سینرژیسم بین این دو درمان و تقویت اثرات ضدتوموری رادیوتراپی با کمک ایمونوتراپی است. مطالعات فراوان پیش بالینی و بالینی منتشر شده در این زمینه گواهی بر این موضوع است. اکثر مطالعات بالینی و آزمایشگاهی انجام شده با استفاده از ایمونو رادیوتراپی با موفقیت‌های چشمگیری در زمینه‌ی درمان سرطان همراه بوده اند. با این وجود غلبه بر سرکوب سیستم ایمنی توسط رادیوتراپی، کاهش سمیت دوزهای رادیوتراپی، نحوه انتخاب بهترین نوع ایمونوتراپی، زمان استفاده از رادیوتراپی و ایمونوتراپی، چگونگی جلوگیری از ایجاد مقاومت به درمان، افزایش میزان پاسخ به درمان و افزایش پاسخ‌های سیستمیک به منظور دستیابی به *abscopal effect* موثر همچنان از چالش‌های موجود برسر راه رادیوایمونوتراپی می باشند. در حال حاضر مطالعات بسیاری در جهت بهینه سازی ترکیب ایمونوتراپی و رادیوتراپی در حال انجام است. بر طرف کردن هر یک از چالش‌های ذکر شده نقش بسزایی در کیفیت این روش درمانی خواهند داشت. بی شک درک بیشتر و دقیق‌تر از تغییرات مولکولی القا شده به دنبال هر یک از این روش‌های درمانی کمک عمده‌ای به طراحی ترکیب‌های درمانی موثر ضد توموری خواهد کرد.

### تشکر و قدردانی

با تشکر و قدردانی فراوان از دانشگاه علوم پزشکی شهید بهشتی که امکان این مطالعه را فراهم ساختند.

### منابع

- Orth M, Lauber K, Niyazi M, Friedl AA, Li M, Maihöfer C, Schüttrumpf L, Ernst A, Niemöller OM, Belka C. Current concepts in clinical radiation oncology. Radiation and environmental biophysics. 2014 Mar 1;53(1):1-29
- Hoskin PJ, Bhattacharya IS. Protons and more: state of the art in radiotherapy. Clinical Medicine. 2014 Dec 1;14(Suppl 6):s61-5.
- Weichselbaum RR, Liang H, Deng L, Fu YX. Radiotherapy and immunotherapy: a beneficial liaison?. Nature reviews Clinical oncology. 2017 Jun;14(6):365
- Kalbasi A, June CH, Haas N, Vapiwala N. Radiation and immunotherapy: a synergistic combination. The Journal of clinical investigation. 2013 Jul 1;123(7):2756-63.
- Reynders K, Illidge T, Siva S, Chang JY, De Ruyscher D. The abscopal effect of local radiotherapy: using immunotherapy to make a rare event clinically relevant. Cancer treatment reviews. 2015 Jun 1;41(6):503-10
- Sharabi AB, Nirschl CJ, Kochel CM, Nirschl TR, Francica BJ, Velarde E, Dewese TL, Drake CG. Stereotactic radiation therapy augments antigen-specific PD-1-mediated antitumor immune responses via cross-presentation of tumor antigen. Cancer immunology research. 2015 Apr 1;3(4):345-55
- Gupta A, Probst HC, Vuong V, Landshammer A, Muth S, Yagita H, Schwendener R, Pruschy M, Knuth A, van den Broek M. Radiotherapy promotes tumor-specific effector CD8+ T cells via dendritic cell activation. The Journal of Immunology. 2012 Jul 15;189(2):558-66
- Coutard H. Principles of x ray therapy of malignant diseases. The lancet. 1934 Jul 7;224(5784):1-8
- Coutard H. The results and methods of treatment of cancer by radiation. Annals of surgery. 1937 Oct;106(4):584
- Whelan TJ, Pignol JP, Levine MN, Julian JA, MacKenzie R, Parpia S, Shelley W, Grimard L, Bowen J, Lukka H, Perera F. Long-term results of hypofractionated radiation therapy for breast cancer.

### ۳-۴- حجم منطقه‌ی رادیوتراپی

از دیگر فاکتورهای موثر در نتیجه‌ی نهایی رادیوایمونوتراپی، حجم فضایی است که پرتو بر آن تابیده می‌شود. اکثر مطالعات رادیوایمونوتراپی در زمینه‌ی رادیوتراپی‌های منطقه ای (محدود به یک محل خاص) صورت گرفته است. رادیوتراپی منطقه ای به دو روش رادیوتراپی خارجی (منبع تابش پرتو خارج از بدن قرار دارد) و برای‌تراپی (منبع پرتو در داخل بدن بیمار نزدیک توده سرطانی قرار می‌گیرد) و یا به هر دو روش انجام می‌پذیرد. مطالعه‌ای مطرح کرده است سلول‌های لانگرهانس پوست در اثر رادیوتراپی با دوز بالا به آپوپتوز مقاوم شده و سیستم‌های ترمیم DNA به سرعت در آنها فعال می‌شوند و در نتیجه به رادیوتراپی مقاوم می‌گردند. این سلول‌ها با مهاجرت به گره‌های لنفی سبب القا سلول‌های T تنظیمی و گسترش واکنش‌های سرکوب کننده‌ی سیستم ایمنی می‌شوند. بنابراین به نظر می‌رسد هر چه مساحت کمتری از پوست تحت تابش پرتو قرار گیرد و یا تاباندن پرتو به تومور از زوایای کمتری (برای‌تراپی) انجام شود با نتایج بهتری همراه خواهد بود (۳۲).

### ۴-۴- زمان

زمان انجام رادیوتراپی و ایمونوتراپی نسبت به یکدیگر از دیگر فاکتورهای تاثیرگذار در اثربخشی رادیوایمونوتراپی می‌باشد. یک مطالعه‌ی گذشته‌نگر در بیماران تومور مغزی متاستاتیک دریافت کننده‌ی مهارکننده ۴-CTLA و رادیوتراپی نشان می‌دهد، بیمارانی که رادیوتراپی را همزمان با ipilimumab دریافت کردند در مقایسه با بیمارانی که ipilimumab را قبل یا بعد از رادیوتراپی دریافت می‌کردند نرخ بقا بیشتری داشته‌اند (۶۵). با وجود مطالعات انجام شده هنوز بر بکارگیری همزمان این دو روش با یکدیگر و یا ارجح بودن یکی بر دیگری تاییدی وجود ندارد و نیاز به مطالعات بیشتری محسوس می‌باشد.

New England Journal of Medicine. 2010 Feb 11;362(6):513-20.

- Adebahr S, Collette S, Shash E, Lambrecht M, Le Pechoux C, Faivre-Finn C, De Ruyscher D, Peulen H, Belderbos J, Dziadziuszko R, Fink C. LungTech, an EORTC Phase II trial of stereotactic body radiotherapy for centrally located lung tumours: a clinical perspective. The British journal of radiology. 2015 Jul;88(1051):20150036
- Norkus D, Karklelyte A, Engels B, Versmissen H, Griskevicius R, De Ridder M, Storme G, Aleknavicius E, Janulionis E, Valuckas KP. A randomized hypofractionation dose escalation trial for high risk prostate cancer patients: interim analysis of acute toxicity and quality of life in 124 patients. Radiation Oncology. 2013 Dec;8(1):206
- Loblaw A, Cheung P, D'Alimonte L, Deabreu A, Mamedov A, Zhang L, Tang C, Quon H, Jain S, Pang G, Nam R. Prostate stereotactic ablative body radiotherapy using a standard linear accelerator: toxicity, biochemical, and pathological outcomes. Radiotherapy and Oncology. 2013 May 1;107(2):153-8.
- Demaria S, Formenti SC. Role of T lymphocytes in tumor response to radiotherapy. Frontiers in oncology. 2012 Aug 24;2:95.
- Schaue D, Kachikwu EL, McBride WH. Cytokines in radiobiological responses: a review. Radiation research. 2012 Oct 29;178(6):505-23.
- McBride WH, Chiang CS, Olson JL, Wang CC, Hong JH, Pajonk F, Dougherty GJ, Iwamoto KS, Pervan M, Liao YP. A sense of danger from radiation. Radiation research. 2004 Jul;162(1):1-9.
- Krysko DV, Garg AD, Kaczmarek A, Krysko O, Agostinis P, Vandenabeele P. Immunogenic cell death and DAMPs in cancer therapy. Nature Reviews Cancer. 2012 Dec;12(12):860
- Golden EB, Frances D, Pellicciotti I, Demaria S, Helen Barcellos-Hoff M, Formenti SC. Radiation fosters dose-dependent and chemotherapy-induced immunogenic cell death. Oncoimmu-

- nology. 2014 Apr 1;3(4):e28518
19. Vlodavsky I, Korner G, Ishai-Michaeli R, Bashkin P, Bar-Shavit R, Fuks Z. Extracellular matrix-resident growth factors and enzymes: possible involvement in tumor metastasis and angiogenesis. *Cancer and Metastasis Reviews*. 1990 Nov 1;9(3):203-26.
  20. Hallahan DE, Spriggs DR, Beckett MA, Kufe DW, Weichselbaum RR. Increased tumor necrosis factor alpha mRNA after cellular exposure to ionizing radiation. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 1989 Dec 1;86(24):10104-7
  21. Vanpouille-Box C, Diamond JM, Pilonis KA, Zavadil J, Babb JS, Formenti SC, Barcellos-Hoff MH, Demaria S. TGFβ is a master regulator of radiation therapy-induced antitumor immunity. *Cancer research*. 2015 Jun 1;75(11):2232-42.
  22. Coppé JP, Patil CK, Rodier F, Sun Y, Muñoz DP, Goldstein J, Nelson PS, Desprez PY, Campisi J. Senescence-associated secretory phenotypes reveal cell-nonautonomous functions of oncogenic RAS and the p53 tumor suppressor. *PLoS biology*. 2008 Dec 2;6(12):e301
  23. Deng L, Liang H, Xu M, Yang X, Burnette B, Arina A, Li XD, Mauceri H, Beckett M, Darga T, Huang X. STING-dependent cytosolic DNA sensing promotes radiation-induced type I interferon-dependent antitumor immunity in immunogenic tumors. *Immunity*. 2014 Nov 20;41(5):843-52.
  24. Klug F, Prakash H, Huber PE, Seibel T, Bender N, Halama N, Pfirschke C, Voss RH, Timke C, Umansky L, Klapproth K. Low-dose irradiation programs macrophage differentiation to an iNOS+/M1 phenotype that orchestrates effective T cell immunotherapy. *Cancer cell*. 2013 Nov 11;24(5):589-602
  25. Garg AD, Elsen S, Krysko DV, Vandenabeele P, de Witte P, Agostinis P. Resistance to anticancer vaccination effect is controlled by a cancer cell-autonomous phenotype that disrupts immunogenic phagocytic removal. *Oncotarget*. 2015 Sep 29;6(29):26841.
  26. Perez CA, Fu A, Onishko H, Hallahan DE, Geng L. Radiation induces an antitumor immune response to mouse melanoma. *International journal of radiation biology*. 2009 Dec 1;85(12):1126-36.
  27. Formenti SC, Demaria S. Combining radiotherapy and cancer immunotherapy: a paradigm shift. *JNCI: Journal of the National Cancer Institute*. 2013 Jan 4;105(4):256-65.
  28. Surace L, Lysenko V, Fontana AO, Cecconi V, Janssen H, Bicvic A, Okoniewski M, Pruschy M, Dummer R, Neeffes J, Knuth A. Complement is a central mediator of radiotherapy-induced tumor-specific immunity and clinical response. *Immunity*. 2015 Apr 21;42(4):767-77.
  29. Elvington M, Scheiber M, Yang X, Lyons K, Jacqmin D, Wadsworth C, Marshall D, Vanek K, Tomlinson S. Complement-dependent modulation of antitumor immunity following radiation therapy. *Cell reports*. 2014 Aug 7;8(3):818-30.
  30. Matsuoka Y, Nakayama H, Yoshida R, Hirose A, Nagata M, Tanaka T, Kawahara K, Sakata J, Arita H, Nakashima H, Shinriki S. IL-6 controls resistance to radiation by suppressing oxidative stress via the Nrf2-antioxidant pathway in oral squamous cell carcinoma. *British journal of cancer*. 2016 Nov;115(10):1234
  31. Tsai CS, Chen FH, Wang CC, Huang HL, Jung SM, Wu CJ, Lee CC, McBride WH, Chiang CS, Hong JH. Macrophages from irradiated tumors express higher levels of iNOS, arginase-I and COX-2, and promote tumor growth. *International Journal of Radiation Oncology\* Biology\* Physics*. 2007 Jun 1;68(2):499-507.
  32. Price JG, Idoyaga J, Salmon H, Hogstad B, Bigarella CL, Ghaffari S, Leboeuf M, Merad M. CDKN1A regulates Langerhans cell survival and promotes T reg cell generation upon exposure to ionizing irradiation. *Nature immunology*. 2015 Oct;16(10):1060.
  33. Deng L, Liang H, Burnette B, Beckett M, Darga T, Weichselbaum RR, Fu YX. Irradiation and anti-PD-L1 treatment synergistically promote antitumor immunity in mice. *The Journal of clinical investigation*. 2014 Feb 3;124(2):687-95.
  34. Ghaffari-Nazari H, Tavakkol-Afshari J, Jaafari MR, Tahaghoghi-Hajghorbani S, Masoumi E, Jalali SA. Improving multi-epitope long peptide vaccine potency by using a strategy that enhances CD4+ T help in BALB/c mice. *PLoS one*. 2015;10(11).
  35. Tahaghoghi-Hajghorbani S, Tavakkol-Afshari J, Reza Jaafari M, Ghaffari-Nazari H, Masoumi E, Amir Jalali S. Improved Immunogenicity Against a Her2/neu-Derived Peptide by Employment of a Pan HLA DR-Binding Epitope and CpG in a BALB/c Mice Model. *Anti-Cancer Agents in Medicinal Chemistry (Formerly Current Medicinal Chemistry-Anti-Cancer Agents)*. 2017 May 1;17(6):851-8
  36. Jalali SA, Sankian M, Tavakkol-Afshari J, Jaafari MR. Induction of tumor-specific immunity by multi-epitope rat HER2/neu-derived peptides encapsulated in LPD Nanoparticles. *Nanomedicine: Nanotechnology, Biology and Medicine*. 2012 Jul 1;8(5):692-70137.
  37. Nikpoor AR, Tavakkol-Afshari J, Sadri K, Jalali SA, Jaafari MR. Improved tumor accumulation and therapeutic efficacy of CTLA-4-blocking antibody using liposome-encapsulated antibody: In vitro and in vivo studies. *Nanomedicine: Nanotechnology, Biology and Medicine*. 2017 Nov 1;13(8):2671-82
  38. Gubin MM, Zhang X, Schuster H, Caron E, Ward JP, Noguchi T, Ivanova Y, Hundal J, Arthur CD, Krebber WJ, Mulder GE. Checkpoint blockade cancer immunotherapy targets tumour-specific mutant antigens. *Nature*. 2014 Nov;515(7528):577.
  39. Golchin S, Alimohammadi R, Rostami Nejad M, Jalali SA. Synergistic antitumor effect of anti-PD-L1 combined with oxaliplatin on a mouse tumor model. *Journal of cellular physiology*. 2019 Nov;234(11):19866-74.
  40. Brunet JF, Denizot F, Luciani MF, Roux-Dosseto M, Suzan M, Mattei MG, Golstein P. A new member of the immunoglobulin superfamily—CTLA-4. *Nature*. 1987 Jul;328(6127):267.
  41. Krummel MF, Allison JP. CD28 and CTLA-4 have opposing effects on the response of T cells to stimulation. *Journal of Experimental Medicine*. 1995 Aug 1;182(2):459-65.
  42. Hodi FS, O'Day SJ, McDermott DF, Weber RW, Sosman JA, Haanen JB, Gonzalez R, Robert C, Schadendorf D, Hassel JC, Akerley W. Improved survival with ipilimumab in patients with metastatic melanoma. *New England Journal of Medicine*. 2010 Aug 19;363(8):711-23.
  43. Robert C, Thomas L, Bondarenko I, O'Day S, Weber J, Garbe C, Lebbe C, Baurain JF, Testori A, Grob JJ, Davidson N. Ipilimumab plus dacarbazine for previously untreated metastatic melanoma. *New England Journal of Medicine*. 2011 Jun 30;364(26):2517-26.
  44. Demaria S, Kawashima N, Yang AM, Devitt ML, Babb JS, Allison JP, Formenti SC. Immune-mediated inhibition of metastases after treatment with local radiation and CTLA-4 blockade in a mouse model of breast cancer. *Clinical Cancer Research*. 2005 Jan 15;11(2):728-34.
  45. Dewan MZ, Galloway AE, Kawashima N, Dewyngaert JK, Babb JS, Formenti SC, Demaria S. Fractionated but not single-dose radiotherapy induces an immune-mediated abscopal effect when combined with anti-CTLA-4 antibody. *Clinical Cancer Research*. 2009 Sep 1;15(17):5379-88.
  46. Yang JC, Hughes M, Kammula U, Royal R, Sherry RM, Topalian SL, Suri KB, Levy C, Allen T, Mavroukakis S, Lowy I. Ipilimumab (anti-CTLA4 antibody) causes regression of metastatic renal cell cancer associated with enteritis and hypophysitis. *Jour-*

- nal of immunotherapy (Hagerstown, Md.: 1997). 2007;30(8):825.
47. Small EJ, Tchekmedyian NS, Rini BI, Fong L, Lowy I, Allison JP. A pilot trial of CTLA-4 blockade with human anti-CTLA-4 in patients with hormone-refractory prostate cancer. *Clinical Cancer Research*. 2007 Mar 15;13(6):1810-5
  48. Weber JS, O'Day S, Urba W, Powderly J, Nichol G, Yellin M, Snively J, Hersh E. Phase I/II study of ipilimumab for patients with metastatic melanoma. *Journal of Clinical Oncology*. 2008 Dec 20;26(36):5950-6
  49. Ishida Y, Agata Y, Shibahara K, Honjo T. Induced expression of PD-1, a novel member of the immunoglobulin gene superfamily, upon programmed cell death. *The EMBO journal*. 1992 Nov 1;11(11):3887-95
  50. Freeman GJ, Long AJ, Iwai Y, Bourque K, Chernova T, Nishimura H, Fitz LJ, Malenkovich N, Okazaki T, Byrne MC, Horton HF. Engagement of the PD-1 immunoinhibitory receptor by a novel B7 family member leads to negative regulation of lymphocyte activation. *Journal of Experimental Medicine*. 2000 Oct 2;192(7):1027-34
  51. Lu W, Lu L, Feng Y, Chen J, Li Y, Kong X, Chen S, Li X, Chen Q, Zhang P. Inflammation promotes oral squamous carcinoma immune evasion via induced programmed death ligand 1 surface expression. *Oncology letters*. 2013 May 1;5(5):1519-26.
  52. Chen J, Feng Y, Lu L, Wang H, Dai L, Li Y, Zhang P. Interferon- $\gamma$ -induced PD-L1 surface expression on human oral squamous carcinoma via PKD2 signal pathway. *Immunobiology*. 2012 Apr 1;217(4):385-93.
  53. Lu J, Lee-Gabel L, Nadeau MC, Ferencz TM, Soeffje SA. Clinical evaluation of compounds targeting PD-1/PD-L1 pathway for cancer immunotherapy. *Journal of Oncology Pharmacy Practice*. 2015 Dec;21(6):451-67.
  54. Zou W, Chen L. Inhibitory B7-family molecules in the tumour microenvironment. *Nature Reviews Immunology*. 2008 Jun;8(6):467.
  55. Okazaki T, Chikuma S, Iwai Y, Fagarasan S, Honjo T. A rheostat for immune responses: the unique properties of PD-1 and their advantages for clinical application. *Nature immunology*. 2013 Dec;14(12):1212.
  56. Zou W, Wolchok JD, Chen L. PD-L1 (B7-H1) and PD-1 pathway blockade for cancer therapy: Mechanisms, response biomarkers, and combinations. *Science translational medicine*. 2016 Mar 2;8(328):328rv4-.
  57. Zeng J, See AP, Phallen J, Jackson CM, Belcaid Z, Ruzevick J, Durham N, Meyer C, Harris TJ, Albesiano E, Pradilla G. Anti-PD-1 blockade and stereotactic radiation produce long-term survival in mice with intracranial gliomas. *International Journal of Radiation Oncology\* Biology\* Physics*. 2013 Jun 1;86(2):343-9
  58. Formenti SC, Demaria S. Radiation therapy to convert the tumor into an in situ vaccine. *International Journal of Radiation Oncology\* Biology\* Physics*. 2012 Nov 15;84(4):879-80.
  59. Dovedi SJ, Adlard AL, Lipowska-Bhalla G, McKenna C, Jones S, Cheadle EJ, Stratford IJ, Poon E, Morrow M, Stewart R, Jones H. Acquired resistance to fractionated radiotherapy can be overcome by concurrent PD-L1 blockade. *Cancer research*. 2014 Oct 1;74(19):5458-68
  60. Dovedi SJ, Illidge TM. The antitumor immune response generated by fractionated radiation therapy may be limited by tumor cell adaptive resistance and can be circumvented by PD-L1 blockade. *Oncoimmunology*. 2015 Jul 3;4(7):e1016709.
  61. Zegers CM, Rekers NH, Quaden DH, Lieuwes NG, Yaromina A, Germeraad WT, Wieten L, Biessen EA, Boon L, Neri D, Troost EG. Radiotherapy combined with the immunocytokine L19-IL2 provides long-lasting antitumor effects. *Clinical Cancer Research*. 2015 Mar 1;21(5):1151-60./
  62. Vanpouille-Box C, Alard A, Aryankalayil MJ, Sarfraz Y, Diamond JM, Schneider RJ, Inghirami G, Coleman CN, Formenti SC, Demaria S. DNA exonuclease Trex1 regulates radiotherapy-induced tumour immunogenicity. *Nature communications*. 2017 Jun 9;8:15618.
  63. Early Breast Cancer Trialists' Collaborative Group. Effect of radiotherapy after breast-conserving surgery on 10-year recurrence and 15-year breast cancer death: meta-analysis of individual patient data for 10 801 women in 17 randomised trials. *The Lancet*. 2011 Nov 12;378(9804):1707-16.
  64. Pilepich MV, Winter K, Lawton CA, Krisch RE, Wolkov HB, Movsas B, Hug EB, Asbell SO, Grignon D. Androgen suppression adjuvant to definitive radiotherapy in prostate carcinoma—long-term results of phase III RTOG 85–31. *International Journal of Radiation Oncology\* Biology\* Physics*. 2005 Apr 1;61(5):1285-90
  65. Crittenden MR, Cottam B, Savage T, Nguyen C, Newell P, Gough MJ. Expression of NF- $\kappa$ B p50 in tumor stroma limits the control of tumors by radiation therapy. *PloS one*. 2012 Jun 28;7(6):e39295.