

UNIwersytet Medyczny im. Karola Marcinkowskiego w Poznaniu  
Wydział Nauk o Zdrowiu

**Ocena nasilenia hipoksji i ekspresji genów warunkujących  
chemiooporność w odpowiedzi zaawansowanego raka szyjki macicy  
na skojarzoną radiochemioterapię**

---

**Rozprawa na stopień doktora nauk medycznych**

**Tomasz Bajon**  
**Wielkopolskie Centrum Onkologii**

**promotor: prof. dr hab. n. med. Andrzej Roszak**

Poznań, 2017

## Spis treści

1 Wykaz skrótów stosowanych w rozprawie.....	5
2 Wstęp .....	7
2.1 Patologia raka szyjki macicy .....	7
2.2 Epidemiologia .....	10
2.3 Rola radiochemioterapii w leczeniu zaawansowanego raka szyjki macicy.....	11
2.4 Znaczenie hipoksji w odpowiedzi komórek na radioterapię.....	14
2.5 Mechanizm działania Cisplatyny .....	15
2.6 Naprawa uszkodzeń DNA wywołanych napromienianiem i Cisplatyną .....	16
2.7 Czynniki prognostyczne raka szyjki macicy.....	18
2.7.1 Stopień zaawansowania klinicznego .....	18
2.7.2 Przerzuty w węzłach chłonnych .....	19
2.7.3 Wielkość guza nowotworowego .....	19
2.8 Czynniki predykcyjne raka szyjki macicy .....	20
2.9 Uzasadnienie podjęcia badania .....	20
3 Cel pracy .....	22
3.1 Cel ogólny.....	22
3.2 Cele szczegółowe.....	22
4 Materiał i metodyka .....	23
4.1 Ogólna charakterystyka chorych.....	23
4.2 Radioterapia .....	24

4.2.1 Teleradioterapia .....	24
4.2.2 Brachyterapia .....	26
4.2.3 Sumowanie dawek promieniowania z tele- i brachyterapii .....	29
4.3 Chemioterapia skojarzona z teleradioterapią .....	30
4.4 Ocena wczesnej odpowiedzi na leczenie .....	31
4.5 Ocena odległej odpowiedzi na leczenie .....	32
4.6 Ocena immunohistochemiczna materiału biopsyjnego .....	33
4.7 Kryteria kwalifikacji i dyskwalifikacji do badania .....	34
4.8 Analiza statystyczna.....	35
4.9 Zgoda komisji bioetycznej .....	36
5 Wyniki .....	37
5.1 Ogólna charakterystyka badanej grupy.....	37
5.2 Charakterystyka populacyjna badanej grupy .....	38
5.3 Charakterystyka kliniczna badanej grupy .....	38
5.4 Ekspresja białek CAIX, ERCC1 i PARP w badanej grupie .....	41
5.5 Wczesna odpowiedzi na leczenie w badanej grupie .....	47
5.5 Odległa odpowiedzi na leczenie w badanej grupie .....	49
5.6 Ocena wartości predykcyjnej badanych czynników .....	51
5.7 Ocena wartości prognostycznej badanych czynników .....	60
6 Dyskusja.....	71
6.1 Ocena znaczenia hipoksji w odpowiedzi na radiochemioterapię .....	72

6.2 Ocena znaczenia ekspresji ERCC1 w odpowiedzi na radiochemioterapię.....	77
6.3 Ocena znaczenia ekspresji PARP w odpowiedzi na radiochemioterapię .....	79
6.4 Podsumowanie .....	81
7 Wnioski.....	83
8 Streszczenie .....	84
9 Summary .....	88
10 Piśmiennictwo.....	91
11 Załącznik nr 1 - Zgoda Komisji Bioetycznej.....	100

## 1 Wykaz skrótów stosowanych w rozprawie

ASCO	- Amerykańskie Towarzystwo Onkologii Klinicznej (ang. American Society of Clinical Oncology)
BED	- dawka efektywna biologicznie (ang. Biological Effective Dose)
BER	- naprawa DNA przez wycinanie zasad (ang. base-excision repair)
BRCA1	- gen supresorowy zlokalizowany na długim ramieniu chromosomu 17 (ang. Breast Cancer 1)
BRCA2	- gen supresorowy zlokalizowany na długim ramieniu chromosomu 13 (ang. Breast Cancer 2)
CAIX	- anhydraza węglanowa IX (ang. carbonic anhydrase IX)
Ca-125	- antygen rakowy 125 (ang. cancer antigen 125)
CEA	- antygen karcinoembrionalny (rakowo - płodowy) (ang. carcino-embryonic antigen)
CR	- całkowita odpowiedź na leczenie (ang. Complete Remission)
CTV	- kliniczna objętość tarczowa (ang. Clinical Target Volume)
DNA-PK	- DNA-zależna kinaza białek (ang. DNA-dependent protein kinase)
DSB	- pęknięcie dwuniciowe DNA (ang. double-strand breakage)
EGFR	- receptor dla naskórkowego czynnika wzrostu (ang. Epidermal Growth Factor Receptor)
ERCC1	- polipeptyd naprawy DNA przez krzyżowe wycięcie i uzupełnienie (ang. excision repair cross-complementation group 1 polypeptide)
EQD2	- dawka równoważna dawce we frakcjach po 2 Gy (ang. equivalent dose in 2 Gy fractions)
FIGO	- Międzynarodowa Federacja Ginekologów i Położników (ang. International Federation of Gynecology and Obstetrics)
GLUT	- transporter glukozy (ang. Glucose Transporter)
HDR	- brachyterapia wysoką mocą dawki (ang. high dose rate)
HIF-1	- czynnik indukowany hipoksją 1 (ang. hypoxia-inducible factor)
HIV	- ludzki wirus upośledzenia odporności (ang. Human Immunodeficiency Virus)
HPV	- wirus brodawczaka ludzkiego (ang. Human Papillomavirus)

HRR	- naprawa rekombinacyjna DNA (ang. homologous recombination repair)
ICRU	- Międzynarodowa Komisja ds. Urządzeń Promieniotwórczych i Pomiarów (ang. International Commission on Radiation Units and Measurements)
IGRT	- radioterapia sterowana obrazem (ang. Image-guided radiation therapy)
IMRT	- radioterapia z intensywną modulacją wiązki promieniowania (ang. Intensity-modulated radiotherapy)
NER	- naprawa DNA przez wycinanie nukleotydu (ang. nucleotide-excision repair)
NHEJ	- naprawa DNA przez łączenie niehomologicznych zakończeń (ang. non-homologous end joining)
OS	- przeżycie całkowite (ang. overall survival)
PARP	- polimeraza poli(ADP-rybozy) (ang. Poly(ADP-ribose) polymerase)
PD	- progresja choroby (ang. Progressive Disease)
PR	- częściowa odpowiedź na leczenie (ang. Partial Remission)
PTV	- planowana objętość tarczowa (ang. Planning Target Volume)
RECIST	- kryteria odpowiedzi na leczenie w guzach litych (ang. Response Evaluation Criteria in Solid Tumours)
RT-PCR	- reakcja łańcuchowa z odwrotną transkryptazą (ang. reverse transcriptase polymerase chain reaction)
SD	- stabilizacja choroby (ang. Stable Disease)
SSB	- pęknięcie jednoniciowe DNA (ang. single-strand breakage)
VMAT	- wielołukowa dynamiczna technika radioterapii (ang. Volumetric Modulated Arc Therapy)
WWT	- współczynnik wzmożenia tlenowego

## 2 Wstęp

### 2.1 Patologia raka szyjki macicy

Rak szyjki macicy rozwija się zwykle w okolicy ujścia zewnętrznego kanału szyjki macicy w strefie przekształceń. Jest to miejsce, w którym dochodzi do fizjologicznej metaplastyki cylindrycznego nabłonka gruczołowego w wielowarstwową płaski. Punktem wyjścia karcynogenezy jest dysplazja (cervical intraepithelial neoplasia, CIN), polegająca na zmianie cech morfologicznych jądra komórkowego i cytoplazmy, zaburzeniu warstwowości nabłonka i wystąpieniu nieprawidłowych figur podziału. W zależności od nasilenia opisanych zmian, wyodrębniono dysplazję małego stopnia (CIN I), średniego stopnia (CIN II) i dużego stopnia (CIN III). W ostatnim przypadku cała grubość nabłonka zajęta jest przez komórki dysplastyczne i atypowe, jednak bez przerwania błony podstawnej – stan ten zwany jest także rakiem in situ. Wykazano, że u podłoża powstania dysplazji szyjki macicy leży przewlekła infekcja wywołana onkogennymi typami ludzkiego wirusa brodawczaka (Human Papillomavirus, HPV).

Długi okres pomiędzy zakażeniem wirusem HPV a rozwojem raka inwazyjnego oraz fakt, że większość zakażeń HPV i znaczna część dysplazji związanych z HPV ustępuje samoistnie pozwala przypuszczać, że do rozwoju raka inwazyjnego niezbędne jest wystąpienie dodatkowych czynników (1,2). Badania epidemiologiczne wykazały istotny wpływ takich czynników jak: palenie papierosów, stosowanie doustnej antykoncepcji oraz zaburzenia funkcjonowania układu odpornościowego gospodarza. Związek epidemiologiczny pomiędzy paleniem papierosów a podwyższonym ryzykiem wystąpienia raka szyjki macicy został opisany już w latach sześćdziesiątych (3). Późniejsze badania potwierdziły obecność nikotyny i jej metabolitów o działaniu karcynogennym w śluzie szyjkowym pałaczek (4). Ponadto stężenie tych substancji było wyższe w śluzie niż w surowicy krwi obwodowej. Z kolei hormony steroidowe stosowane w antykoncepcji doustnej mogą wiązać się z DNA zakażonych przez HPV komórek i zwiększać transkrypcję wirusowych onkogenów (5). Istotny wpływ na rozwój przetrwałego zakażenia ma także stan układu odpornościowego. Wykazano bowiem, że u kobiet z niedoborami odporności po przeszczepie nerek, u chorych

na tocznia układowego lub zakażonych ludzkim wirusem upośledzenia odporności (HIV) ryzyko zakażenia wirusem HPV i rozwoju raka szyjki macicy jest znacznie wyższe niż w populacji ogólnej (6,7,8).

Uważa się, że w przypadkach nie leczonych 15% dysplazji małego stopnia prowadzi do rozwoju raka inwazyjnego w ciągu 2 lat i około 30% dysplazji wysokiego stopnia w ciągu 10 lat. (9). Przekroczenie przez komórki nowotworowe błony podstawnej świadczy o inwazyjnym charakterze zmiany. Rak inwazyjny może przybierać różną postać: egzofityczną, owrzodzenia bądź nacieku szerzącego się płasko wzdłuż błony śluzowej szyjki macicy. W kolejnym etapie procesem nowotworowym objęte zostają ściana pochwy i tkanka wokół szyjki i macicy (tzw. przymacicza). Nierzadko choroba szerzy się jednocześnie w obu kierunkach. Dalszy rozwój choroby prowadzi do zajęcia przez ciągłość dolnych części pochwy, macicy, przymacicza aż do kości miednicy, a także narządów sąsiednich: pęcherza moczowego i odbytnicy. Do częstych powikłań zaawansowanego raka szyjki macicy należy wodonercze związane z uciskiem dróg moczowych i utrudnieniem odpływu moczu. Jednocześnie z postępem miejscowego zaawansowania choroby wzrasta ryzyko przerzutów do węzłów chłonnych – w pierwszej kolejności do regionalnych węzłów okołoszyjkowych i okołomaciczych, następnie zasłonowych, podbrzusznych, biodrowych zewnętrznych i przedkrzyżowych. Przerzuty w węzłach okołoaortalnych bez zajęcia węzłów biodrowych należą do rzadkości. Z kolei przerzuty drogą krwi pojawiają się późno i lokalizują się przede wszystkim w wątrobie, płucach, kościach, jelitach, a także otrzewnej i jajnikach. Biologia raka szyjki macicy cechuje się względnie stałą i powtarzalną sekwencją obserwowanych zmian w przebiegu choroby. Stąd w 1994 roku w Montrealu Międzynarodowa Federacja Ginekologów i Położników (International Federation of Gynecology and Obstetrics, FIGO) zaproponowała ujednoczone, kryteria oceny klinicznego zaawansowania raka szyjki macicy. W roku 2009 wprowadzona została najnowsza modyfikacja tej klasyfikacji, opracowana przy współdziałaniu innych towarzystw międzynarodowych, takich jak: International Gynecologic Cancer Society (IGCS), Gynecologic Intergroup (GCIIG), Society of Gynecologic Oncologists (SGO), International Society of Gynecologic Pathologists (ISGyP) i American Joint Commission on Cancer (AJCC) (tabela 1)

Tabela 1. Klasyfikacja klinicznego stopnia zaawansowania raka szyjki macicy według FIGO (2009 r.)

<b>Stopień</b>	<b>Charakterystyka</b>
<b>I</b>	<b>Rak ściśle ograniczony do szyjki macicy</b>
Ia	Rak mikroinwazyjny
Ia1	Głębokość naciekania podścieliska $\leq 3\text{mm}$ , średnica $\leq 7\text{mm}$
Ia2	Głębokość naciekania podścieliska $\leq 5\text{mm}$ , średnica $\leq 7\text{mm}$
Ib	Zmiany większe niż Ia2, widoczne klinicznie lub nie
Ib1	Klinicznie widoczna zmiana $\leq 4\text{cm}$
Ib2	Klinicznie widoczna zmiana $>4\text{cm}$
<b>II</b>	<b>Rak przechodzi poza szyjkę macicy</b>
IIa	Naciek przechodzi na sklepienie i/lub pochwę, nie przekraczając 2/3 górnej części jej ścian, bez nacieków przymacicz
IIb	Naciek przymacicz nie dochodzący do kości miednicy
<b>III</b>	<b>Rak dochodzi do ściany miednicy i/lub obejmuje dolną 1/3 długości pochwy, wodonercze</b>
IIIa	Rak nacieka 1/3 dolną pochwy, w przymaciczach nie stwierdza się nacieków dochodzących do kości
IIIb	Guzowate nacieki przymacicza dochodzące do kości, obecność wodonercza lub nieczynnej nerki
<b>IV</b>	<b>Przejście raka poza teren miednicy mniejszej lub naciekanie narządów sąsiednich</b>
IVa	Naciekanie śluzówki pęcherza moczowego lub odbytnicy
IVb	Przerzuty odległe

## 2.2 Epidemiologia

Rak szyjki macicy stanowi istotny problem epidemiologiczny, zdrowotny oraz społeczny zarówno w Polsce jak i na całym świecie. Zachorowalność na ten nowotwór cechuje się ogromną różnorodnością regionalną, etniczną i kulturową. Największą zachorowalność opisuje się w krajach Afryki oraz Ameryki Południowej i Środkowej. Szacuje się, że 85% zachorowań na świecie diagnozuje się właśnie w tzw. krajach rozwijających się. Według danych epidemiologicznych, rocznie w Polsce odnotowuje się blisko 3000 nowych zachorowań (2807 zachorowań w roku 2014) (10). Problem potęguje fakt, że szczyt zachorowalności przypada w przedziale wiekowym między 45 a 64 rokiem życia, a zatem na okres pełnej aktywności społecznej i zawodowej kobiet. Jednocześnie obserwuje się stopniowy spadek zachorowalności w ostatnich dziesięcioleciach. W przeciągu ostatnich trzydziestu lat wyniósł on około 30%. Porównanie liczby zachorowań i standaryzowanych współczynników zachorowalności w tych latach przedstawiono w tabeli 2 (10).

Tabela 2. Zachorowalność na raka szyjki macicy w Polsce w latach 1980 – 2014.

<b>Rok</b>	<b>Liczba zachorowań</b>	<b>Współczynnik standaryzowany</b>
<b>1980</b>	3532	16,4
<b>1985</b>	3837	16,8
<b>1990</b>	3658	15,2
<b>1995</b>	3856	14,8
<b>2000</b>	3597	13,1
<b>2005</b>	3263	11,5
<b>2010</b>	3078	10,3
<b>2014</b>	2807	8,8

Sukcesywny spadek liczby zachorowań obserwowany szczególnie w grupie młodych kobiet (20 – 44 rok życia) przypisuje się między innymi upowszechnieniu badań cytologicznych i zwiększeniu świadomości społecznej. Pod względem zachorowalności Polska nie odbiega istotnie od reszty Unii Europejskiej (w 2009 roku około 15% wyższa), to różnice w umieralności są już bardzo znaczne. Szacuje się, że w Polsce umieralność jest aż o 70% wyższa od reszty Unii (10) i wynosi około 1600 rocznie (1628 zgonów w roku 2014). To ponad połowa odnotowanych w tym samym czasie zachorowań. Na tę sytuację epidemiologiczną największy wpływ ma fakt, że u zdecydowanej większości chorych nowotwór rozpoznawany jest w zaawansowanym stadium (stopnie IIB i wyższe wg FIGO). Nie bez znaczenia jest także brak pełnego leczenia interdyscyplinarnego, w tym głównie brak zcentralizowanego leczenia operacyjnego.

### **2.3 Rola radiochemioterapii w leczeniu zaawansowanego raka szyjki macicy**

Przełomowym momentem w leczeniu zaawansowanego raka szyjki macicy był rok 1999, kiedy to opublikowanych zostało pięć dużych badań klinicznych oceniających skuteczność leczenia skojarzonego łączącego radioterapię i podawanie cytostatyków. Badania te różniły się od siebie stopniem zaawansowania choroby, schematem zastosowanej chemioterapii i czasem obserwacji, jednakże wyniki jednoznacznie wykazały wyższość leczenia skojarzonego nad samodzielną radioterapią. Wyniki tych badań skłoniły National Cancer Institut do zmiany obowiązujących dotychczas zaleceń i wprowadzenia radiochemioterapii jako standardowego postępowania terapeutycznego u chorych z zaawansowanym rakiem szyjki macicy.

Badanie RTOG 90-01 (11) obejmowało 388 chorych z rakiem szyjki macicy w stopniu zaawansowania IIB – IVA według FIGO. W ramieniu badanym chore poddane były teleradioterapii na okolicę miednicy mniejszej i brachyterapii skojarzonej z chemioterapią opartą na Cisplatinie i 5-fluorouracylu. Wyniki leczenia odniesione były do grupy kontrolnej poddanej wyłącznie teleradioterapii i brachyterapii, przy czym w grupie tej zastosowano rozszerzone pola napromieniania obejmujące dodatkowo węzły chłonne okołoaortalne. W

trakcie pięcioletniej obserwacji autorzy wykazali 15% wyższe przeżycia ogólne, wydłużenie o 27% czasu wolnego od choroby oraz 19% spadek ryzyka wystąpienia przerzutów w grupie pacjentek poddanych skojarzonej radiochemioterapii. Z kolei badanie GOG 85 (12) obejmowało porównywalną liczbę chorych (368 pacjentek) na raka płaskonabłonkowego i gruczołowego szyjki macicy w tym samym stopniu zaawansowania co w badaniu RTOG 90-01. Badana grupa chorych została zrandomizowana i losowo przydzielona do podgrupy otrzymującej skojarzoną radiochemioterapię opartą na cisplatynie i 5-fluorouracylu oraz radioterapię skojarzoną z hydroksymocznikiem. W obu ramionach zastosowano jednak identyczny protokół teleradioterapii, która obejmowała wyłącznie obszar miednicy mniejszej. Pomimo krótszego czasu obserwacji, który wynosił trzy lata, autorzy opisali istotnie statystycznie lepsze przeżycia ogólne ( $p=0,018$ ) i wydłużenie czasu wolnego od choroby ( $p=0,033$ ) w grupie chorych otrzymujących chemioterapię opartą na Cisplatynie. Badaniem obejmującym największą grupę chorych było badanie GOG 120 (13). Włączono do niego 526 pacjentek z rakiem płaskonabłonkowym i gruczołowym szyjki macicy w stopniu zaawansowania IIB – IVA, u których wykluczono zajęcie okołoaortalnych węzłów chłonnych procesem nowotworowym. Chore przydzielono losowo do jednej z trzech podgrup. W pierwszej stosowano cotygodniowe podanie Cisplatyny w dawce  $40 \text{ mg/m}^2$  powierzchni ciała przez sześć tygodni, w drugiej Cisplatynę w dawce  $50 \text{ mg/m}^2$  i 5-fluorouracyl w dawce  $4 \text{ g/m}^2$  jako wlew 96-godzinny w dniu 1 i 29 leczenia wraz z hydroksymocznikiem podawanym dwa razy w tygodniu w dawce  $2 \text{ g/m}^2$  przez 6 tygodni leczenia. Natomiast w trzeciej podgrupie chorym podawano wyłącznie hydroksymocznik w dawce  $3 \text{ g/m}^2$  dwa razy w tygodniu. We wszystkich trzech podgrupach chemioterapię kojarzono z napromienianiem miednicy według identycznego protokołu. Porównanie trzyletnich obserwacji również wykazało istotne statystycznie różnice pod względem czasu do progresji choroby na korzyść obu schematów zawierających Cisplatynę względem schematu opartego wyłącznie na hydroksymoczniku ( $p=0,001$ ). Jednocześnie autorzy nie wykazali różnic w przeżyciach ogólnych, czasie do progresji, kontroli miejscowej i wystąpieniu przerzutów do płuc pomiędzy obiema podgrupami otrzymującymi Cisplatynę. Stwierdzono natomiast istotnie wyższą toksyczność schematów wielolekowych, wskazując radiochemioterapię skojarzoną wyłącznie z Cisplatyną jako optymalną metodę leczenia chorych z zaawansowanym rakiem szyjki macicy. Podsumowaniem tych doniesień była metaanaliza Green'a i wsp.

opublikowana w 2001 roku (14) obejmująca 19 randomizowanych badań klinicznych przeprowadzonych w latach 1981 – 2000. Do analizy zakwalifikowano łącznie 4580 chorych poddanych radioterapii samodzielnej lub skojarzonej z chemioterapią opartą na Cisplatynie. Wyniki jednoznacznie wykazały istotnie statystycznie lepsze przeżycia ogólne, wydłużenie czasu do progresji choroby i rzadsze występowanie wznów miejscowych oraz odległych u pacjentek, u których zastosowano chemioradioterapię. Jednocześnie opisano znacząco wyższą, lecz akceptowalną toksyczność leczenia skojarzonego, szczególnie ze strony układu hematologicznego i przewodu pokarmowego. Jednakże, opublikowana w roku 2004 powtórna analiza badania RTOG 90-01, uwzględniająca dłuższy czas obserwacji (mediana 6,6 roku), nie wykazała istotnych różnic w późnej toksyczności leczenia (15).

Przez ostatnich piętnaście lat skojarzona radiochemioterapia oparta na Cisplatynie stała się standardowym schematem leczenia zaawansowanego raka szyjki macicy na całym świecie. Dopiero w roku 2009 na zjeździe Amerykańskiego Towarzystwa Onkologii Klinicznej (American Society of Clinical Oncology, ASCO) przedstawiono porównanie radioterapii skojarzonej z Cisplatyną i Gemcytabiną ze standardową radiochemioterapią opartą wyłącznie na Cisplatynie (16). W grupie badanej chore otrzymywały cotygodniowo Cisplatynę w standardowej dawce  $40\text{mg}/\text{m}^2$  powierzchni ciała i Gemcytabinę w dawce  $125\text{mg}/\text{m}^2$  przez cały okres trwania radioterapii, a następnie dwa cykle chemioterapii uzupełniającej (Cisplatyna  $50\text{mg}/\text{m}^2$  i Gemcytabiana  $1000\text{mg}/\text{m}^2$ ) w odstępach co 21 dni. W trakcie trzyletniej obserwacji grupy 515 pacjentek autorzy wykazali istotne statystycznie wydłużenie czasu wolnego od choroby i przeżyć całkowitych. Jednocześnie odnotowano istotny, jednakże akceptowalny według autorów doniesienia, wzrost toksyczności hematologicznej i ze strony przewodu pokarmowego. Badanie to nie wyjaśniło jednak, czy poprawa wyników leczenia wynikała z dodania gemcytabiny do jednoczasowej chemioterapii, dodania chemioterapii po zakończeniu radioterapii czy obu czynników jednocześnie.

Aktualne zalecenia Polskiej Unii Onkologii w zakresie ginekologii onkologicznej uznają za standard leczenia skojarzoną radiochemioterapię opartą na Cisplatynie podawanej w dawce  $40\text{mg}/\text{m}^2$  co 7 dni u wszystkich chorych z zaawansowanym rakiem szyjki macicy. Analogiczne leczenie zaleca także amerykańska organizacja National Comprehensive Cancer Network.

## 2.4 Znaczenie hipoksji w odpowiedzi komórek na radioterapię

Hipoksja, czyli niedobór tlenu w tkankach, uważana jest za najistotniejszy czynnik oporności na radioterapię. Stężenie parcjalne tlenu w tkance prawidłowej wynosi około 7% (53mmHg), zaś w tkance nowotworowej mieści się w przedziale od 7% do nawet poniżej 1% (17). W tkance nowotworowej wynika ona przede wszystkim z bardzo szybkiego podziału komórek i zwiększaniu objętości guza, przy jednocześnie stosunkowo wolnej angiogenezie. Perfuzja tlenu z naczyń do tkanek możliwa jest bowiem na głębokość około 100 do 180  $\mu\text{m}$  (18). Zmienną wrażliwość na promieniowanie jonizujące tkanki w warunkach hipoksji i normoksji opisuje współczynnik wzmożenia tlenowego WWT (oxygen enhancement ratio, OER). Jest on definiowany jako stosunek dawki promieniowania dającej ten sam efekt w różnych warunkach tlenowych. Tym samym parametr ten pokazuje, jak wzrasta wrażliwość komórek na letalne działanie promieniowania wraz ze wzrostem ciśnienia parcjalnego tlenu (19). Dotychczasowe badania wskazują, że dla dawek frakcyjnych w przedziale 1,8 do 2,0Gy WWT przyjmuje wartości od 1,2 do 2,0 (20).

Cząsteczka tlenu bierze udział w stabilizacji uszkodzeń DNA wywołanych promieniowaniem jonizującym. Wiązka promieniowania fotonowego na zasadzie wtórnych zderzeń camptonowskich wzbudza w komórce wtórny strumień elektronów. Elektrony te powodują jonizację napotkanych cząsteczek, którymi w komórce najczęściej są cząsteczki wody. Efektem takich oddziaływań jest jonizacja wody i powstanie wolnych rodników hydroksylowych i wodorowych. Strumień elektronów może także oddziaływać z cząsteczką DNA powodując powstanie wolnych rodników organicznych. Powstałe w ten sposób rodniki reagują dalej z cząsteczką DNA prowadząc do pęknięć dwuniciowych (double-strand breakage, DSB) i jednoniciowych (single-strand breakage, SSB) (20). Zarówno ilość powstałych pęknięć dwuniciowych, jak i wewnętrzna zdolność komórki do ich naprawy warunkuje skuteczność radioterapii (21,22). Rola tlenu polega na utrwaleniu powstałych uszkodzeń DNA w mechanizmie fizykochemicznym, w wyniku czego są one niedostępne dla enzymów naprawczych (23). Tlen musi jednak być obecny w komórce w chwili napromieniania lub nie później niż 5ms (24).

Najpowszechniej stosowaną metodą oceny stężenia parcjalnego tlenu w tkance jest użycie elektrody Eppendorfa. Jest to jednak metoda inwazyjna, której wartość predykcyjna pomimo upływu lat nie została jednoznacznie udowodniona. W ostatnich latach coraz większe zainteresowanie badaczy kierowane jest w stronę białek, których ekspresja indukowana jest właśnie hipoksją. Należą do nich przede wszystkim białko HIF-1, CAIX oraz GLUT-3.

## **2.5 Mechanizm działania Cisplatyny**

Cisplatyna jest jednym z najstarszych i jednocześnie najszerzej stosowanych cytostatyków w onkologii. Należy do tzw. związków alkilujących, których działanie polega na tworzeniu wiązań z DNA uniemożliwiających jego replikację. Uważa się, że blisko 65% takich połączeń stanowią dwufunkcyjne 1,2-wewnątrznicowe, krzyżowe połączenia, w których kompleks platyny tworzy krzyżowe wiązanie pomiędzy dwoma sąsiednimi atomami N(7) guaniny. Wspomniany, nukleofilowy azot N(7) jest dobrze dostępny na głównym rowku podwójnej helisy i nie bierze udziału w tworzeniu wiązania wodorowego pomiędzy komplementarnymi parami zasad azotowych (25). Wiązanie takie jest bardzo stabilne i może być przerwane jedynie przez związki silnie nukleofilowe (np. cyjanek, tiomocznik). Ponadto wiązanie takie powoduje charakterystyczne zagięcie podwójnej nici DNA, w wyniku czego powstają dodatkowe naprężenia, których efektem jest rozplatanie helisy prowadzące do zaburzeń struktury małych i dużych rowków. (26). W następstwie tych zmian powstają pęknięcia nici DNA (jedno- i dwuniciowe), uniemożliwiające prawidłową replikację i transkrypcję. Uważa się, że oporność na pochodne platyny wynika głównie z wysokiej aktywności układu glutationu, który wiąże wolne rodniki oraz z podwyższonej aktywności enzymów naprawy DNA.

## 2.6 Naprawa uszkodzeń DNA wywołanych napromienianiem i Cisplatyną

Efektom oddziaływania zarówno promieniowania jonizującego jak i Cisplatyny na komórki jest przede wszystkim powstanie uszkodzeń jądrowego DNA pod postacią pęknięć jedno- i dwuniciowych. W komórkach występuje szereg mechanizmów molekularnych umożliwiających naprawę takich uszkodzeń. Uważa się, że stopień sprawności tych mechanizmów ma kluczowe znaczenie w oporności na zastosowane leczenie.

Najważniejszym mechanizmem naprawy pęknięć jednoniciowych jest naprawa przez wycinanie zasady (base-excision repair, BER) oraz naprawa przez wycinanie nukleotydu (nucleotide-excision repair, NER). Z kolei pęknięcia dwuniciowe naprawiane są na drodze naprawy rekombinacyjnej (tzw. rekombinacja homologiczna, homologous recombination repair, HRR) oraz łączenia niehomologicznych zakończeń (non-homologous end joining, NHEJ).

Naprawa przez wycinanie zasad polega na usuwaniu uszkodzeń powstałych w pojedynczych zasadach DNA. Uważa się, że proces ten zainicjowany jest przez białko PARP, które rozpoznaje miejsce uszkodzenia DNA, łączy się z tym miejscem i rekrutuje białka naprawy. W kolejny etap procesu zaangażowane są przede wszystkim glikozylazy DNA i endonukleazy AP. Zadaniem pierwszych z nich jest przecięcie wiązania  $\beta$ -N glikozydowego między uszkodzoną zasadą a deoksyrybozą. W ten sposób usunięta zostaje uszkodzona zasada, a w jej miejscu powstaje tzw. miejsce apurynowe/apirymidynowe. Miejsce to rozpoznawane jest przez endonukleazę AP, która nacina DNA w kierunku 5' tworząc wolny koniec 3'-OH. W następnym etapie polimeraza DNA (Pol I) wydłuża nić DNA na matrycy nici siostrzanej. W ostatnim etapie tego procesu ligaza DNA łączy nowopowstały fragment DNA ze starym za pomocą wiązania fosfodiesterowego.

Z kolei naprawa przez wycinanie nukleotydu dotyczy przede wszystkim większych uszkodzeń. Mechanizm tej naprawy rozpoczyna się od rozpoznania uszkodzenia przez białko XPA i XPC. W kolejnym etapie następuje wycięcie fragmentu DNA (zwykle o długości ok. 30 par zasad) przez endonukleazę (XPG, XPF-ERCC1). Po rozpleceniu wolnych fragmentów DNA przez helikazy XPB i XPD, w miejsce wyciętego fragmentu syntetyzowana jest nowa

nić na drodze parowania zasad dzięki aktywności polimerazy  $\delta$  lub polimerazy  $\epsilon$  w obecności białek PCNA i RFC. Podobnie jak w przypadku naprawy przez wycinanie zasad, proces kończy ligaza DNA syntetyzująca wiązanie fosfodiesterowe pomiędzy nowym i starym fragmentem DNA. Proces ten uważany jest za bezbłędny, wiernie odtwarza strukturę DNA i nie prowadzi do powstania mutacji.

Z punktu widzenia komórki, znacznie bardziej niebezpieczne są pęknięcia dwuniciowe, gdyż w trakcie ich naprawy brak jest siostrzanej nici DNA, umożliwiającej wierne odtworzenie kolejności zasad. Ich naprawa odbywa się najczęściej na drodze łączenia niehomologicznych zakończeń. Uszkodzenia takie rozpoznawane są przez białko Ku, które jest heterodimerem (Ku70 i Ku80). W drugim etapie przyłączana jest DNA-zależna kinaza białek (DNA-dependent protein kinase), której podjednostka katalityczna tworzy kompleks DNA-PK. Tym samym dochodzi do rekrutacji enzymów przetwarzających końce DNA: polimeraz i ligazy IV, której kofaktorem jest białko XRCC4. Mechanizm ten jest stosunkowo szybki, może zachodzić w każdej fazie cyklu komórkowego, może jednak prowadzić do błędów i powstania mutacji (27).

Drugim mechanizmem naprawy uszkodzeń dwuniciowych jest naprawa rekombinacyjna, która może zachodzić jedynie w fazie S i G2 cyklu komórkowego. Kluczową rolę odgrywa tu kompleks białek MRN (MRE11, RAD50, NBS1), który syntetyzuje krótkie odcinki jednoniciowego DNA (ssDNA). Następnie dzięki białkom BRCA1 i BRCA2 oraz RAD51 dochodzi do połączenia tych odcinków ssDNA z nieuszkodzoną matrycą, którą stanowi siostrzana chromatyda. W dalszej kolejności przy udziale polimeraz, nukleaz i helikaz dochodzi do odtworzenia ciągłości brakujących sekwencji na drodze parowania zasad. W ostatnim etapie, czteroniciowy produkt ulega rozdzieleniu i poprzez nacięcie i ponowne połączenie. W procesie tym może dochodzić do wymiany informacji genetycznej pomiędzy siostrzanymi chromatydami.

Zaburzenia w komórkach nowotworowych prowadzące do zamian ekspresji poszczególnych białek biorących udział w wymienionych powyżej procesach mogą prowadzić do powstania oporności na stosowaną terapię. Ponadto prowadzone są próby

farmakologicznego blokowania poszczególnych białek naprawy, które mają być źródłem opracowania w przyszłości nowych terapii celowanych.

## **2.7 Czynniki prognostyczne raka szyjki macicy**

Wśród dotychczas zdefiniowanych czynników prognostycznych zaawansowanego raka szyjki macicy, za najważniejsze uznaje się: stopień zaawansowania procesu nowotworowego, przerzuty w węzłach chłonnych oraz wielkości guza nowotworowego. Za czynniki o mniejszym znaczeniu uważa się: stopień złośliwości histologicznej G, wiek chorej i stan ogólny zdrowia. W odniesieniu do miejscowo zaawansowanego raka szyjki macicy, czynniki takie jak typ histologiczny raka oraz wynik badania cytologicznego pobranego z otrzewnej nie mają istotnego znaczenia prognostycznego (28)

### **2.7.1 Stopień zaawansowania klinicznego**

Stopień zaawansowania klinicznego nowotworu oceniony według kryteriów zaproponowanych przez FIGO jest uważany za jeden z najistotniejszych czynników prognostycznych u chorych na raka szyjki macicy. Szacuje się, że pięcioletnie przeżycia całkowite u chorych w stopniu IA wynosi 95 – 100%, w stopniu IB już 75 – 100% zaś w stopniu IV zaledwie ok. 5%. W badaniu Fylesa i współpracowników (29), oceniającym wyniki leczenia 965 pacjentek we wszystkich stopniach zaawansowania, autorzy wykazali, że stopień FIGO jest najważniejszym czynnikiem prognostycznym i wyprzedza takie czynniki jak dawka z radioterapii oraz czas trwania radioterapii. Ponadto, po wyłączeniu z analizy chorych, które otrzymały dawkę mniejszą niż 75Gy na punkt A dawka promieniowania nie była już istotna pod względem statystycznym. Z kolei Stehman i wsp. (28) w badaniu GOG wskazują na fakt, że klasyfikacja FIGO nie uwzględnia tak ważnego czynnika jak zajęcie przez proces nowotworowy węzłów chłonnych.

### **2.7.2 Przerzuty w węzłach chłonnych**

W wielu badaniach zajęcie przez proces nowotworowy regionalnych węzłów chłonnych uważane jest za najważniejszy czynnik prognostyczny, istotniejszy nawet od stopnia zaawansowania klinicznego według FIGO (28). Wykazano, że u chorych leczonych operacyjnie z powodu raka szyjki macicy pięcioletnie przeżycia w grupie bez zajętych węzłów chłonnych wynoszą powyżej 90%, podczas gdy u chorych z przerzutami w węzłach miednicznych zaledwie 50-60%. W przypadku zajęcia węzłów chłonnych okołoaortalnych przeżycia te są jeszcze niższe i wynoszą 20-40%. Ponadto wykazano istotne statystycznie różnice w przeżyciach w zależności od ilości zajętych węzłów chłonnych – 62% w sytuacji przerzutu do pojedynczego węzła, 36% przy przerzutach w dwóch węzłach i 20% u chorych z przerzutami do trzech lub czterech węzłów (30). W cytowanym powyżej badaniu GOG, Stehman i wsp. (28) wskazują, że samodzielnym, najistotniejszym niekorzystnym czynnikiem rokowniczym u chorych z miejscowo zaawansowanym procesem jest właśnie zajęcie węzłów chłonnych okołoaortalnych (co jednocześnie kwalifikuje chore do IV stopnia zaawansowania według FIGO), zaś w drugiej kolejności węzłów chłonnych miednicy.

### **2.7.3 Wielkość guza nowotworowego**

W wielu doniesieniach podkreśla się także prognostyczną wartość wielkości guza przed leczeniem, jako czynnika niezależnego od stopnia zaawansowania według FIGO (28,31,32,33). W kontekście miejscowo zaawansowanej choroby najciekawsze wyniki dostarczyło badanie Eiffla, w którym retrospektywnie oceniono długość czasu wolnego od choroby u 1526 chorych w stopniu IB, otrzymujących radykalną radioterapię. U chorych, u których maksymalna średnica guza oceniona w badaniu ultrasonograficznym wynosiła poniżej 5 cm, pięcioletnie przeżycia wolne od choroby wynosiły 97%, podczas gdy u chorych z guzem większym już tylko 84%.

## **2.8 Czynniki predykcyjne raka szyjki macicy**

Czynnikiem predykcyjnym jest parametr, który warunkuje spodziewaną odpowiedź na leczenie. W odróżnieniu od czynnika prognostycznego, dotyczy on jedynie konkretnego sposobu leczenia. Czynniki predykcyjnymi są na ogół parametry bezpośrednio lub pośrednio związane z mechanizmem działania danego typu terapii, a ich stopień ekspresji determinuje skuteczność zastosowanego leczenia. Rozwój genetyki, immunologii i biologii molekularnej w ostatnich latach pozwolił na wyodrębnienie szeregu nowych czynników predykcyjnych, takich jak stężenie antygenu karcynoembrionalnego (CEA), stężenie antygenu raka płaskonabłonkowego, Ca-125 i Cyfra 21-1, a także immunohistochemiczna ocena ekspresji P53, P16, Ki-67, EGFR. (34) Wyniki badań oceniających ich przydatność kliniczną są jednak rozbieżne, stąd dotychczas żaden z nich nie wszedł do standardowego panelu badań diagnostycznych u chorych z zaawansowanym rakiem szyjki macicy.

## **2.9 Uzasadnienie podjęcia badania**

Rak szyjki macicy stanowi nadal istotny problem terapeutyczny. W Polsce dotyczy on przede wszystkim choroby miejscowo zaawansowanej. Opracowania epidemiologiczne odległych wyników leczenia wykazują, że wraz z postępem i doskonaleniem metod leczenia nie uległo istotnej poprawie rokowanie chorych na raka szyjki macicy. Od kilkunastu lat standardem terapeutycznym w miejscowo zaawansowanej chorobie jest radiochemioterapia oparta na Cisplatynie. Prowadzone w ostatnim czasie badania nad zastosowaniem nowych chemioterapeutyków (Gemcytabina) wydają się obiecujące, lecz związane są z istotnym wzrostem toksyczności leczenia. Jednym z najistotniejszych problemów terapeutycznych w zaawansowanym raku szyjki macicy jest duże zróżnicowanie odpowiedzi na leczenie chorych w tym samym stopniu zaawansowania i z porównywalnymi czynnikami prognostycznymi. Z obserwacji klinicznych wynika, że pomimo przeprowadzenia pełnej radiochemioterapii zgodnie z obowiązującym standardem, u części chorych obserwuje się przetrwały proces nowotworowy. Przyczyny oporności na leczenie upatruje się głównie w hipoksji komórek nowotworowych jak i zaburzeniu ekspresji białek naprawy DNA. Prowadzone dotychczas

badania nad wyodrębnieniem czynników predykcyjnych odpowiedzi na jednoczasową radiochemioterapię nie przyniosły spodziewanych wyników. Ponadto jedyne uznane czynniki prognostyczne są ściśle związane z zaawansowaniem procesu nowotworowego i nie pozwalają na personalizację leczenia onkologicznego. Wobec powyższego wydaje się celowe podjęcie badania, oceniającego predykcyjne i prognostyczne znaczenie najważniejszych czynników molekularnych związanych z opornością na radioterapię i chemioterapię.

### **3 Cel pracy**

#### **3.1 Cel ogólny**

Celem pracy jest ocena nasilenia hipoksji i ekspresji białek związanych z chemioopornością jako potencjalnych czynników predykcyjnych i prognostycznych u chorych z miejscowo zaawansowanym rakiem szyjki macicy w stopniu IIB - IIIB poddanych radykalnej radiochemioterapii.

#### **3.2 Cele szczegółowe**

Powyższa ocena dokonana zostanie poprzez:

- ocenę stężenia hemoglobiny we krwi obwodowej przed radiochemioterapią oraz ekspresji białka CAIX w materiale biopsyjnym oraz ich korelacja z wczesną odpowiedzią na leczenie i przeżyciem pięcioletnim
- ocenę ekspresji białka ERCC1 w materiale biopsyjnym oraz jego korelacja z odpowiedzią na leczenie i przeżyciem pięcioletnim
- ocenę ekspresji białka PARP-1 w materiale biopsyjnym oraz jego korelacja z odpowiedzią na leczenie i przeżyciem pięcioletnim

## 4 Materiał i metodyka

### 4.1 Ogólna charakterystyka chorych

Zaplanowano badanie prospektywne, którym objęte były wszystkie chore z rozpoznaniem raka płaskonabłonkowego szyjki macicy leczone radykalną radiochemioterapią w okresie od września 2009 do końca października 2010 roku na Oddziale Radioterapii i Onkologii Ginekologicznej Wielkopolskiego Centrum Onkologii im. Marii Skłodowskiej-Curie w Poznaniu. Przed kwalifikacją do leczenia wykonano pełne badanie podmiotowe dotyczące wywiadu chorobowego, schorzeń dodatkowych i najważniejszych przyjmowanych leków, a także badanie przedmiotowe układu chłonnego dostępnego palpacyjnie oraz pełne badanie ginekologiczne wraz z badaniem per rectum. Ostateczne potwierdzenie rozpoznania choroby nowotworowej uzyskano poprzez pobranie wycinka z szyjki macicy i jego ocenę histopatologiczną. Badanie mikroskopowe pobranego materiału przeprowadzono w Zakładzie Patologii Nowotworów Wielkopolskiego Centrum Onkologii. U wszystkich chorych określono stopień zaawansowania klinicznego raka szyjki macicy według kryteriów FIGO. W tym celu zastosowano następujące metody:

- badanie palcem per vaginam i per rectum, w którym oceniono obecność zmienionej nowotworowo szyjki macicy, obecność i zakres naciekania przymaciczy oraz pochwy,
- badanie ultrasonograficzne per vaginam w celu oceny wielkości guza i jego stosunku do narządów sąsiednich; w trakcie badania zwrócono szczególną uwagę na ocenę węzłów chłonnych oraz nacieku w przymaciczach, ścianie pęcherza moczowego i odbytnicy,
- badanie ultrasonograficzne jamy brzusznej i miednicy mniejszej przez powłoki brzuszne dla oceny narządów mięszzowych oraz węzłów chłonnych okołoaortalnych i biodrowych,
- rentgenografia klatki piersiowej w projekcji tylnoprzodniej i bocznej w celu wykluczenia obecności przerzutów do płuc

U wszystkich chorych wykonano także tomografię komputerową miednicy mniejszej z dożylnym podaniem środka kontrastowego, jednak ocena radiologiczna uzyskanych obrazów

posłużyła jedynie do precyzyjnego zaplanowania leczenia zgodnie z zaleceniami FIGO i nie wpłynęła na zmianę stopnia zaawansowania klinicznego (35). Ponadto badanie to posłużyło do oceny porównawczej z tomografią komputerową wykonaną po zakończeniu terapii w celu oceny wczesnej odpowiedzi na leczenie. Przed zakwalifikowaniem do radiochemioterapii u każdej chorej wykonano także badanie laboratoryjne krwi obwodowej, w której ocenie podlegały przede wszystkim wartości morfologii (leukocytów, neutrocytów, erytrocytów, hemoglobiny, hematokrytu i płytek krwi), stężenia elektrolitów (sód, potas, chlorki), mocznika, kreatyniny oraz klirensu kreatyniny.

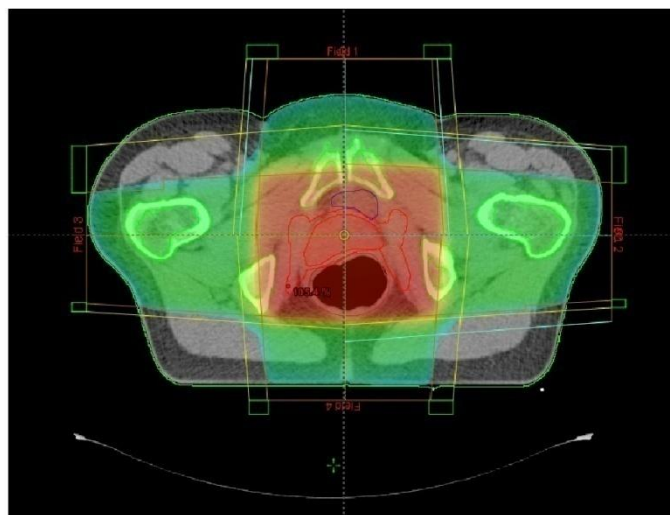
Przedmiotem analizy były wyłącznie chore, u których stopień zaawansowania klinicznego określony został w przedziale IIB – IIIB według wspomnianych kryteriów FIGO i których stan ogólny oraz wyniki badań dodatkowych pozwalały na bezpieczne przeprowadzenie skojarzonej radiochemioterapii.

## **4.2 Radioterapia**

### **4.2.1 Teleradioterapia**

Teleradioterapię zaplanowano w konformalnej technice 3D w oparciu o obrazy tomografii komputerowej wykonane przed leczeniem. W trakcie planowania i realizacji radioterapii pacjentki stabilizowane były w pozycji na plecach z użyciem podstawki pod kolana i stopy, tzw. knee-fix firmy RTA (Combifix SYS/2P). Badanie tomografii komputerowej wykonywano za pomocą 40 rzędowego aparatu Simens Somatom Sensation Open. Badaniem obejmowano obszar od wysokości drugiego kręgu lędźwiowego do guzów kulszowych w odstępach 3 mm. W celu dokładniejszego zobrazowania zmian nowotworowych badanie wykonywano przed oraz 90 sekund po dożylnym podaniu środka kontrastowego Ultravist 370 w ilości 1 ml/kg masy ciała z prędkością przepływu 2,5 ml/s. Na każdym z uzyskanych obrazów wyznaczano struktury istotne z punktu widzenia radioterapii: guz nowotworowy wraz z szyjką i trzonem macicy oraz węzły chłonne biodrowe zewnętrzne, wewnętrzne i wspólne, które w systemie planowania leczenia określano mianem klinicznego

obszaru tarczowego (tzw. Clinical Target Volume, CTV), a także narządy krytyczne takie jak odbytnica, pęcherz moczowy, jelito grube i głowy kości udowych. Odbytnica konturowana była od dolnego poziomu zdefiniowanego na wysokości mięśni zwieraczy odbytu do zagięcia odbytniczno-esiczego. Ze względu na brak w piśmiennictwie jednoznacznego standardu wyznaczania odbytnicy w trakcie planowania radioterapii – ściana narządu wraz z zawartością lub wyłącznie ściana – dla potrzeb niniejszego badania wyznaczano całą objętość odbytnicy wraz z jej zawartością. Takie same kryteria zastosowano w przypadku wyznaczania pęcherza moczowego. Wokół obszaru CTV stosowano 1 centymetr marginesu uzyskując tzw. planowany obszar tarczowy (Planning Target Volume, PTV). Margines ten podyktowany był zarówno błędem ułożenia podczas każdej frakcji napromieniania (tzw. margines zewnętrzny, External Margin) jak i możliwością codziennych zmiany położenia guza nowotworowego względem struktur kostnych (tzw. margines wewnętrzny, Internal Margin). Obliczenia planowanego rozkładu dawek w obszarze tarczowym i narządach krytycznych dokonywano w Pracowni Planowania Leczenia Zakładu Fizyki Medycznej Wielkopolskiego Centrum Onkologii w oparciu o system planowania leczenia Eclipse v.8 firmy Varian. U wszystkich chorych zastosowano trójwymiarową technikę czteropolową (tzw. „box”), w której wiązki promieniowania ustawione są po kącie 0, 90, 180 i 270 stopni względem osi podłużnej pacjenta (fotografia 1).

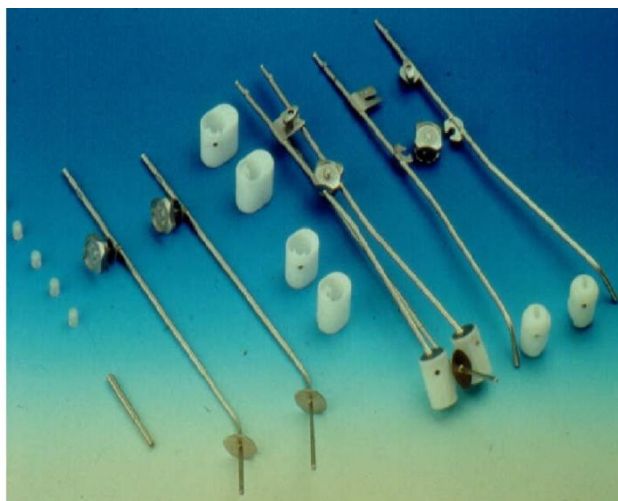


Fotografia 1. Przykład zastosowania czteropolowej techniki 3D (tzw. „box”) u pacjentki napromienianej z powodu raka szyjki macicy..

Dla każdego z pól zastosowano kolimator wielolistkowy w celu maksymalnego osłonięcia struktur kostnych przed promieniowaniem jonizującym. Zastosowano wiązki fotonowe o energii 20 MV. Kryterium akceptacji planowanego rozkładu dawek było maksymalne możliwe obniżenie dawki w narządach krytycznych przy zachowaniu homogenności dawki w (PTV) w zakresie 95-107% dawki zadanej, zgodnie z protokołem ICRU (36,37). W odniesieniu do pęcherza moczowego i odbytnicy zastosowano następujące kryteria ograniczające zaaplikowaną dawkę: 50% objętości narządu otrzymać może nie więcej niż 50Gy (parametr  $D_{50} < 50\text{Gy}$ ). Napromienianie realizowano na akceleratorach liniowych typu Clinac 2300 firmy Varian w cyklach pięciodniowych od poniedziałku do piątku, z przerwą sobotnio – niedzielną. Wszystkie pacjentki otrzymały 50,4Gy na obszar PTV w dwudziestu ośmiu frakcjach po 1,8Gy każda, przy czym od dawki 45Gy teloradioterapia realizowana była z zastosowaniem osłony centralnej obszaru objętego wysoką dawką z brachyterapii. W trakcie całego cyklu napromieniania okresowo wykonywane były zdjęcia portalowe fotonową wiązką megawoltową, weryfikujące poprawność geometryczną napromienianej okolicy (tzw. weryfikacja portalowa), oraz pomiary in vivo dawki w osi każdej z wiązek promieniowania.

#### **4.2.2 Brachyterapia**

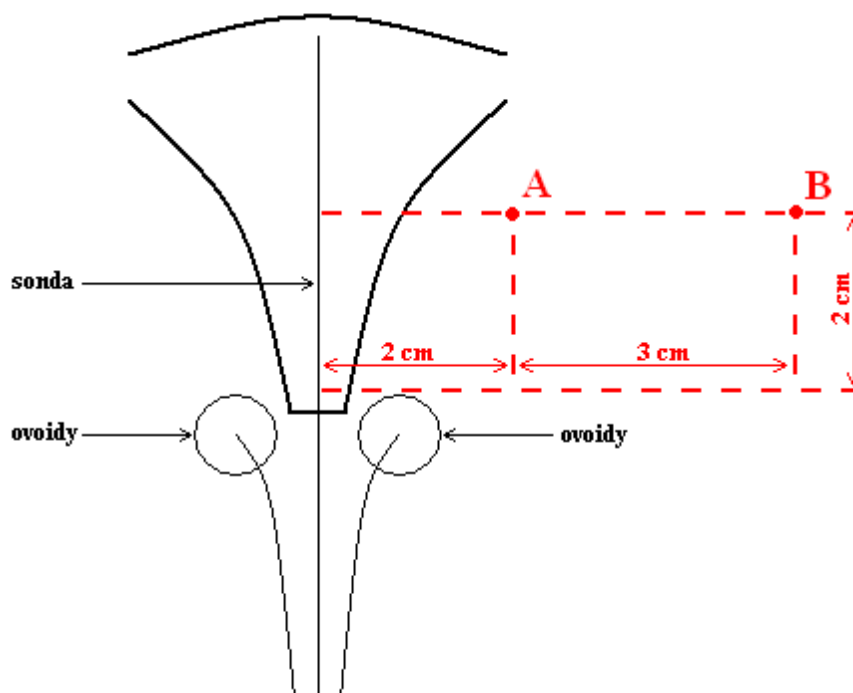
Teloradioterapia kojarzona była z brachyterapią dojamową. Najczęściej stosowany był aplikator Fletchera, w skład którego wchodzi sonda domaciczna zakładana do kanału szyjki macicy oraz dwa sferyczne aplikatory dopochwowe (tzw. ovoidy) zakładane do sklepień pochwy (fotografia 2).



Fotografia 2. Aplikator śródjamowy Fletchera do brachyterapii raka szyjki macicy.

Decyzja o terminie rozpoczęcia brachyterapii podejmowana była na podstawie badania przedmiotowego, wykonanego po przekroczeniu połowy dawki z teloradioterapii. Zarówno długość sondy i jej kąt jak i wielkość ovoidów dostosowane były do indywidualnych warunków anatomicznych określanych na podstawie badania przedmiotowego i ultrasonograficznego per vaginam. W sytuacji, w której stwierdzany był brak sklepień pochwy lub jej wąski szczyt stosowano aplikator składający się z sondy domaciczej oraz aplikator dopochwowy w kształcie walca. Również w tym przypadku wymiary sondy i średnica walca dobierane były indywidualnie. Po założeniu odpowiedniego aplikatora przeprowadzano tamponowanie pochwy (tzw. packing) w celu odsunięcia odbytnicy i pęcherza moczowego maksymalnie daleko od aplikatorów. Cały zabieg założenia aplikatorów wykonywano w krótkim znieczuleniu ogólnym. Na podstawie dwóch zdjęć rentgenowskich wykonanych pod kątem 60 stopni względem siebie w projekcji bocznej i przednio-tylnej za pomocą zintegrowanego aparatu rentgenowskiego (Integrated Brachytherapy Unit, IBU) dokonywano przestrzennej rekonstrukcji położenia aplikatorów względem pęcherza moczowego, do którego zakładano cewnik Foleya z balonikiem wypełnionym środkiem cieniującym, oraz odbytnicy, do której z kolei zakładano odpowiednie markery. Obliczenia planowanego rozkładu dawek dokonywano na podstawie rekonstrukcji obrazu w 3D zgodnie z zaleceniami Raportu 38 ICRU (38). W Raporcie tym wyznaczano punkty referencyjne A i B. Położenie punktu A określano w płaszczyźnie czołowej 2 centymetry powyżej ujścia zewnętrznego i 2 centymetry w bok od środka kanału szyjki macicy. Punkt ten odpowiada

skrzyżowaniu tętnicy macicznej i moczowodu na bocznej powierzchni szyjki macicy. Punkt B natomiast położony jest 3 centymetry bocznie od punktu A i odpowiada anatomicznie węzłom chłonnyom zasłonowym. Topografię punktów A i B względem aplikatorów i macicy przedstawiono na rycinie 1.



Rycina 1. Topografia punktów referencyjnych A i B względem aplikatora Fletchera i szyjki macicy.

Planowany rozkład dawek w punktach referencyjnych i narządach krytycznych obliczono za pomocą systemu planowania Plato firmy Nucletron w Pracowni Planowania Brachyterapii Zakładu Fizyki Medycznej Wielkopolskiego Centrum Onkologii zgodnie z zaleceniami Raportu 38 ICRU (38). Napromienianie realizowane było w Zakładzie Brachyterapii Wielkopolskiego Centrum Onkologii za pomocą MicroSelectronu HDR firmy Nucletron do brachyterapii wysoką mocą dawki (high dose rate, HDR), który wykorzystuje krocząca źródło Irydu 192. Dawka frakcyjna podczas pojedynczego seansu wynosiła 7Gy i była specyfikowana na punkt A. Stosowano cztery frakcje brachyterapii w odstępach siedmiodniowych w trakcie teleradioterapii, przy czym w dniu, w którym stosowano brachyterapię zalecano przerwę w realizacji napromieniania ze źródeł zewnętrznych.

Warunkiem rozpoczęcia brachyterapii było uzyskanie optymalnych warunków anatomicznych umożliwiających wprowadzenie aplikatorów do jamy macicy i sklepień pochwy. Z tego względu leczenie rozpoczynano od teleradioterapii, a po uzyskaniu częściowej regresji guza kojarzono ją z brachyterapią.

#### 4.2.3 Sumowanie dawek promieniowania z tele- i brachyterapii

Dawki promieniowania jonizującego otrzymane przez każdą pacjentkę z teleradioterapii i brachyterapii sumowano po przeliczeniu na dawkę efektywną biologicznie (BED) i dawkę izoefektywną (dawkę ekwiwalentną dawce frakcyjnej 2Gy, EQD2) stosując wzór przedstawiony na rycinie 2.

$$BED = n Df \left[ 1 + Df / ( \alpha/\beta ) \right]$$

$$EQD2 = BED / \left[ 1 + 2 ( \alpha/\beta ) \right]$$

gdzie:

BED – dawka efektywna biologicznie

n – liczba frakcji

Df – dawka frakcyjna

$\alpha/\beta$  - współczynnik zdolności naprawczej komórek

EQD2 – dawka izoefektywna

Rycina 2. Obliczenie dawki efektywnej biologicznie i izoefektywnej na podstawie wartości dawki frakcyjnej, ilości frakcji i współczynnika zdolności naprawczej komórek  $\alpha/\beta$ .

Wzór ten uwzględnia odmienne efekty biologiczne napromieniania ciągłego (brachyterapia) i frakcjonowanego (teleradioterapia). W obliczeniach przyjęto wartość

współczynnika  $\alpha/\beta$  równą 10Gy dla komórek nowotworowych oraz wartość 3Gy dla komórek pęcherza moczowego i odbytnicy. Zastosowano następujące kryteria akceptacji planowanego rozkładu dawki z brachyterapii i teleradioterapii: sumaryczna dawka EQD2 nie większa niż odpowiednio 80Gy w pęcherzu moczowym i 75Gy w odbytnicy. Jednocześnie sumaryczna dawka EQD2 w referencyjnym punkcie A u wszystkich napromienianych chorych była wyższa niż 85Gy, zgodnie z zaleceniami Polskiej Unii Onkologii (35).

#### **4.3 Chemioterapia skojarzona z teleradioterapią**

Radioterapia kojarzona była z chemioterapią monolekową z zastosowaniem Cisplatyny podawanej co siedem dni przez cały okres trwania teleradioterapii. Stosowano dawkę cytostatyku  $40\text{mg}/\text{m}^2$  w ciągłym, dożylnym wlewie kroplowym w czasie 1–4 godzin. Dawkę leku ustalano w przeliczeniu na metr kwadratowy powierzchni ciała, którą obliczano stosując wzór zaproponowany przez Mostellera (39) wykorzystujący pomiar masy ciała i wzrostu pacjenta. Przed podaniem Cisplatyny stosowano wstępne nawodnienie w postaci 500ml dożylnego wlewu kroplowego 5% glukozy lub 0,9% roztworu soli fizjologicznej w czasie 1–2 godzin. Nawodnienie końcowe obejmowało dożylnie podanie 100ml 20% roztworu mannitolu w ciągu 30 minut i 500ml 5% glukozy lub 0,9% roztworu soli fizjologicznej w ciągu 1 godziny. Z uwagi na dużą hematotoksyczność i nefrotoksyczność Cisplatyny przed rozpoczęciem każdego kolejnego kursu chemioterapii u wszystkich chorych rutynowo wykonywano badanie morfologii z rozmazem krwi obwodowej i oznaczenie stężenia kreatyniny w osoczu krwi obwodowej. Ponadto przed pierwszym kursem prowadzono także dobową zbiórkę moczu, w którym określano stężenie kreatyniny oraz objętość wydalonego moczu. Na podstawie powyższych wartości obliczano klirens kreatyniny stosując wzór przedstawiony na rycinie 3.

$$C_{Cr} = \frac{V \times Cr_m}{Cr_s}$$

gdzie:

$C_{Cr}$  – klirens kreatyniny

$V$  – objętość moczu

$Cr_m$  – stężenie kreatyniny w moczu

$Cr_s$  – stężenie kreatyniny w surowicy

Rycina 3. Obliczenie wartości klirensu kreatyniny na podstawie wartości objętości moczu z dobowej zbiórki, stężenia kreatyniny w moczu i surowicy krwi obwodowej.

Badania laboratoryjne i wspomniane obliczenia przeprowadzono w Pracowni Diagnostyki Laboratoryjnej Wielkopolskiego Centrum Onkologii. Do skojarzonej radiochemioterapii kwalifikowano wyłącznie chore w dobrym stanie ogólnym i wartościami morfologii, kreatyniny i klirensu kreatyniny w granicach wartości referencyjnych.

#### **4.4 Ocena wczesnej odpowiedzi na leczenie**

W celu oceny wczesnych wyników leczenia u każdej chorej wykonano badanie kontrolne miesiąc po zakończeniu radiochemioterapii. Badanie to obejmowało pełne badanie podmiotowe i przedmiotowe z uwzględnieniem badania per vaginam i per rectum. Ponadto u każdej pacjentki wykonano także tomografię komputerową miednicy mniejszej przed i po dożylnym podaniu środka kontrastowego w identycznych warunkach jak przed rozpoczęciem leczenia. Oba badania poddano radiologicznej ocenie porównawczej w Zakładzie Radiologii Wielkopolskiego Centrum Onkologii. W celu określenia obiektywnej odpowiedzi na leczenie

zastosowano kryteria zaproponowane przez Therasse i wsp. (40) i zmodyfikowane w 2009 roku przez Eisenhauera i wsp. (41) – tzw. kryteria RECIST (Response Evaluation Criteria in Solid Tumours). Zgodnie z tymi wytycznymi do oceny posłużyły badania wstępne wykonane nie wcześniej niż 4 tygodnie przed rozpoczęciem leczenia oraz badanie kontrolne wykonane w okresie 4 do 6 tygodni po jego zakończeniu. W obu badaniach dokonano pomiaru średnicy guza w największym wymiarze oraz wszystkich powiększonych węzłów chłonnych (zgodnie z definicją węzłów, które w osi krótkiej mają wymiar 15 milimetrów lub większy). Uzyskane pomiary zsumowano dla każdego z badań osobno, a ich porównanie procentowe posłużyło do ustalenia odpowiedzi na leczenie według następujących kryteriów:

- odpowiedź całkowita (Complete Remission, CR) – całkowita regresja guza nowotworowego; wszystkie widoczne węzły chłonne w wymiarze krótkim nie przekraczają 10 milimetrów,
- odpowiedź częściowa (Partial Remission, PR) – zmniejszenie sumy wymiarów obserwowanych zmian o 30% lub więcej w stosunku do badania wyjściowego,
- progresja choroby (Progressive Disease, PD) – zwiększenie sumy wymiarów obserwowanych zmian o 20% lub więcej (lecz nie mniej niż 5 milimetrów) w stosunku do badania wyjściowego lub pojawienie się nowych mierzalnych zmian nowotworowych nie obserwowanych w badaniu wyjściowym,
- stabilizacja choroby (Stable Disease, SD) – zmniejszenie sumy wymiarów obserwowanych zmian o mniej niż 30% lub jej zwiększenie o mniej niż 20%.

#### **4.5 Ocena odległej odpowiedzi na leczenie**

Po zakończonym leczeniu onkologicznym wszystkim chorym proponowana była obserwacja kliniczna i badania kontrolne w ramach Poradni Radioterapii i Onkologii Ginekologicznej w Wielkopolskim Centrum Onkologii. Pierwsza wizyta kontrolna odbywała się po miesiącu od zakońzonego leczenia. W trakcie tej wizyty wykonywane było badanie podmiotowe obejmujące dolegliwości związane z możliwą toksycznością terapii oraz pełne badanie przedmiotowe – badanie per vaginam i per rectum.

Kolejne kontrole obejmujące ten sam zakres badania odbywały się co 3 miesiące przez okres pierwszych dwóch lat od zakończonej terapii, a następnie co 6 miesięcy do zakończenia okresu obserwacji przewidzianej badaniem. Dodatkowo raz w roku przez cały okres obserwacji wykonywana była ocena ultrasonograficzna jamy brzusznej i miednicy przy użyciu sondy do badania przez powłoki brzuszne i sondy vaginalnej. Także co roku wykonywany był wymaz cytologiczny z tarczy i kanału szyjki macicy. Prowadzona w ten sposób kontrola pozwoliła na ocenę przeżyć całkowitych (OS) w okresie 5 lat od zakończonego leczenia.

#### **4.6 Ocena immunohistochemiczna materiału biopsyjnego**

Wycinki pobrane jeszcze przed leczeniem od każdej chorej z guza szyjki macicy stanowił materiał do przeprowadzenia oznaczeń immunohistochemicznych ekspresji białek: anhydrazy węglanowej IX (carbonic anhydrase IX, CAIX), białka ERCC1 (excision repair cross-complementation group 1 polypeptide) i polimerazy poli(ADP-rybozy)-1 (Poly(ADP-ribose) polymerase 1, PARP-1). Oznaczenia te wykonano w Pracowni Immunohistochemii Zakładu Patologii Nowotworów Wiekopolskiego Centrum Onkologii w Poznaniu. Do wykonania tych badań użyto przeciwciał firmy Abcam z siedzibą w Cambridge w Wielkiej Brytanii: poliklonalne przeciwciało królicze przeciw CAIX (numer katalogowy: ab15086), monoklonalne przeciwciało przeciw ERCC1 (numer katalogowy: ab2356) i poliklonalne przeciwciało przeciw PARP (numer katalogowy: ab6079).

Ekspresję wszystkich trzech białek oceniono w trzech skalach: jakościowej, ilościowej i półilościowej. W pierwszej brano pod uwagę intensywność reakcji barwnej i oceniono ją w czterostopniowej skali, gdzie:

0 – brak reakcji

1 – intensywność reakcji słaba

2 – intensywność reakcji średnia

3 – intensywność reakcji duża

Ekspresję badanych białek oceniono także w skali ilościowej, w której wyrażono procent komórek nowotworowych, w których zaobserwowano reakcję barwną. W tym przypadku potencjalny zakres wyników wynosi od 0 do 100%, gdzie 0 oznacza brak reakcji a 100% wybarwienie wszystkich komórek.

Do dalszych analiz statystycznych wykorzystano zarówno dwie powyższe skale oceny, jak i ocenę półilościową, według zasad podanych przez McCarty'ego – tzw. skala „H”. W tym przypadku wynikiem reakcji immunohistochemicznej jest iloczyn intensywność reakcji barwnej (ocenionej jakościowo w skali od 0 do 3 wg kryteriów podanych powyżej) oraz procentu wybarwionych komórek (42).

#### **4.7 Kryteria kwalifikacji i dyskwalifikacji do badania**

Przedmiotem badania były chore spełniające następujące kryteria:

- kobiety w wieku od 18 do 70 lat
- potwierdzony badaniem histopatologicznym rak płaskonabłonkowy szyjki macicy w stopniu klinicznego zaawansowania IIB-IIIIB według kryteriów FIGO
- brak przerzutów odległych stwierdzonych na podstawie dostępnych badań dodatkowych
- dobry stan ogólny (według klasyfikacji WHO w stopniu 0 lub 1), wyniki morfologii, kreatyniny, mocznika i klirensu kreatyniny w granicach wartości referencyjnych
- przebyte leczenie chemioterapią skojarzoną z radioterapią (co najmniej 3 kursy Cisplatyny w dawce  $40\text{mg}/\text{m}^2$  powierzchni ciała)
- radiologiczna ocena wyników leczenia na podstawie porównania obrazów tomografii komputerowej miednicy mniejszej wykonanych przed leczeniem i 4-6 tygodni po zakończeniu terapii
- dostępność do oceny immunohistochemicznej materiału pobranego z guza nowotworowego

Z badania wyłączone zostały chore u których:

- ocena histopatologiczna wycinak z guza nowotworowego wykazała budowę komórkową inną niż płaskonabłonkową
- stwierdzono zły stan ogólny oraz nieprawidłowe wyniki morfologii lub wspomnianych parametrów wydolności nerek
- podano mniej niż 3 kursy skojarzonej chemioterapii (z uwagi na hemato- i/lub nefrotoksyczność)
- nie przeprowadzono oceny tomograficznej narządów miednicy mniejszej przed lub po leczeniu

#### **4.8 Analiza statystyczna**

Zmienne ilościowe (wiek, stężenie hemoglobiny, nasilenie reakcji immunohistochemicznej w skali ilościowej i półilościowej) wyrażono jako średnią arytmetyczną wraz z odchyleniem standardowym oraz medianą. Z kolei zmienne jakościowe (zaawansowanie według FIGO, liczba kursów chemioterapii, nasilenie reakcji immunohistochemicznej w skali jakościowej, odpowiedź na leczenie, przeżycia) przedstawiono jako liczbę zaobserwowanych pomiarów, którą opisano także jako odsetek całej badanej grupy. Celem określenia wpływu badanych cech na odpowiedź na leczenie posłużono się testem U Manna - Whitneya dla zmiennych nieparametrycznych. Wyniki testów oceniono na poziomie istotności statystycznej  $p=0,05$ .

Z uwagi na niską liczebność, grupa poddana pięcioletniej obserwacji nie spełniała warunków statystycznych do wyznaczenia tablic trwania życia oraz rozkładu przeżycia. Jednocześnie ze względu na znaczną dysproporcję liczebności podgrupy przeżywających okres obserwacji i podgrupy chorych zmarłych, dla oceny wpływu badanych czynników na przeżycia posłużono się jedynie statystyką opisową.

Powyższe obliczenia wykonano przy użyciu pakietu statystycznego STATISTICA v.12 firmy StatSoft Inc.

#### **4.9 Zgoda komisji bioetycznej**

Przedstawiona powyżej metodyka i plan badania zostały zatwierdzone przez Komisję Bioetyczną przy Uniwersytecie Medycznym im. Karola Marcinkowskiego w Poznaniu uchwałą nr 477/09 z dnia 6 maja 2009 roku. Uchwała ta stanowi załącznik nr 1 do niniejszej rozprawy.

## 5 Wyniki

### 5.1 Ogólna charakterystyka badanej grupy

Charakterystkę badanej grupy chorych przedstawiono w wynikach pracy z uwagi na prospektywny charakter badania. W okresie 14 miesięcy trwania rekrutacji, do badania wstępnie zakwalifikowano 44 chore z rakiem szyjki macicy w stopniu IIB – IIIB wg FIGO. Wszystkie te chore w chwili przyjęcia spełniały kryteria włączenia opisane w poprzednim rozdziale.

W trakcie prowadzonego leczenia u 8 chorych (18,2% ogółu grupy) po podaniu dwóch kursów Cisplatyny wystąpiła toksyczność uniemożliwiająca kontynuację jednoczasowej chemioterapii. U 4 z nich była to nefrotoksyczność, u 2 niedokrwistość i u kolejnych 2 neutropenia. Chore te otrzymały zatem mniej niż trzy kursy Cisplatyny i zostały wykluczone z dalszego badania i analizy.

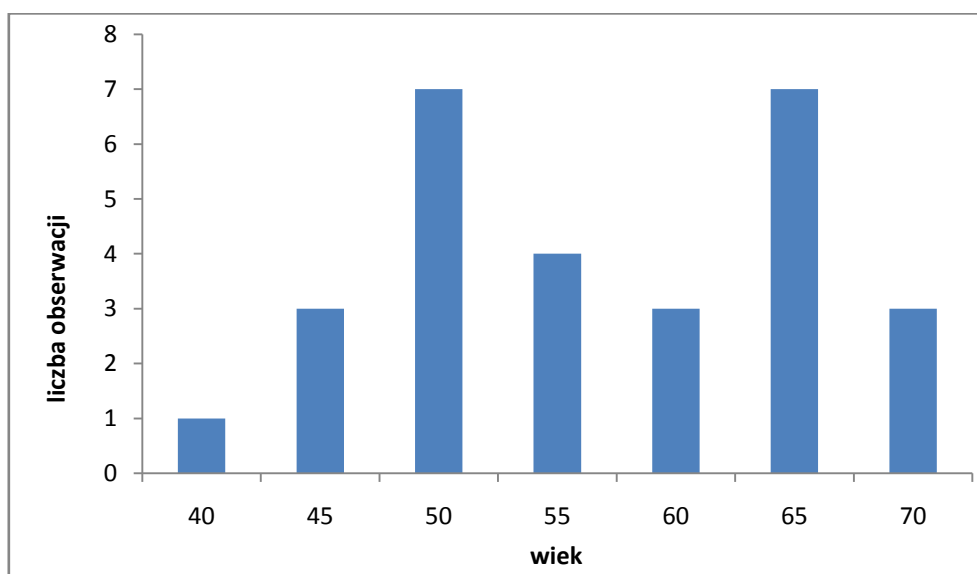
Ponadto u 7 chorych (15,9% wyjściowej grupy) stwierdzono, że fragment wycinka z guza szyjki macicy, przeznaczony do badania immunohistochemicznego nie zawiera komórek raka inwazyjnego. W 4 przypadkach stwierdzono dysplazję średniego i wysokiego stopnia, w 3 pozostałych w materiale znajdowały się jedynie nacieki limfocytarne. Ponieważ ocena patologiczna wycinków wykonywana była już w trakcie trwania leczenia, nie było możliwości ponownego pobrania materiału celem wiarygodnej i porównywalnej oceny ekspresji badanych białek przed leczeniem. Stąd również ta podgrupa została ostatecznie wykluczona z analizy.

Dodatkowo 1 chora (2,3%) nie zgłosiła się na kontrolne badanie tomografii komputerowej w okresie 6 tygodni od zakończonej radiochemioterapii. Tym samym nie było możliwości uzyskania informacji o wczesnej odpowiedzi na leczenie wg kryteriów RECIST. Także ta chora została wykluczona z końcowej analizy.

Ostatecznie analizą objęto 28 chorych z rakiem szyjki macicy, które przeszły pełną radiochemioterapię, a następnie zgłosiły się na badanie kontrolne po zakończonej terapii.

## 5.2 Charakterystyka populacyjna badanej grupy

Zgodnie z kryteriami włączenia, do badania rekrutowano chore w przedziale wiekowym pomiędzy 18 i 70 rokiem życia. W chwili rozpoczęcia leczenia najmłodsza chora miała 39 lat, zaś najstarsza 68 lat. Średni wiek w badanej grupie wynosił 54,9 lat (SD=8,6), zaś mediana wieku to 55lat. Rozkład wieku przedstawiono na rycinie 4.



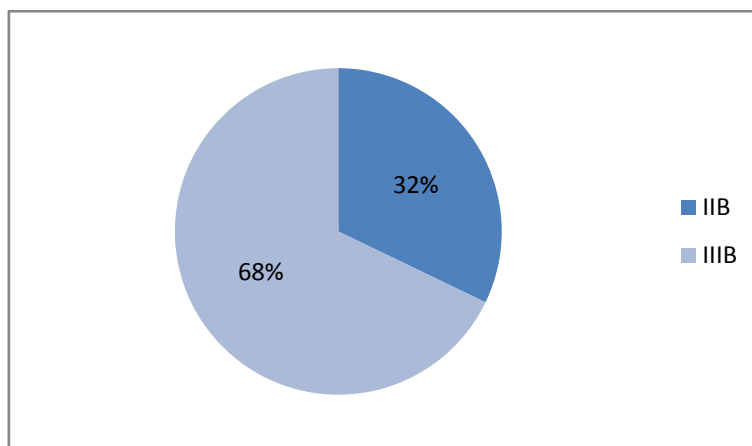
Rycina 4. Rozkład wieku w analizowanej grupie.

Średni wiek chorych z zaawansowaniem IIB wynosił 55,5 lat (SD=10,3), zaś mediana wieku w tej podgrupie to 60 lat. Jednocześnie średni wiek w podgrupie chorych z zaawansowaniem IIIB wyniósł 54,7 lat (SD=7,9), a mediana 55 lat.

## 5.3 Charakterystyka kliniczna badanej grupy

Na podstawie przeprowadzonej przed leczeniem diagnostyki (zgodnie z kryteriami opisanymi w poprzednim rozdziale) ustalono zaawansowanie kliniczne wg kryteriów FIGO

dla każdej chorej. Stopień IIB stwierdzono u 9 chorych, co stanowiło 32,2% badanej grupy. U pozostałych 19 chorych (67,8%) zaawansowanie określono jako IIIB. Rozkład procentowy zaawansowania procesu nowotworowego przedstawiono także na rycinie 5.



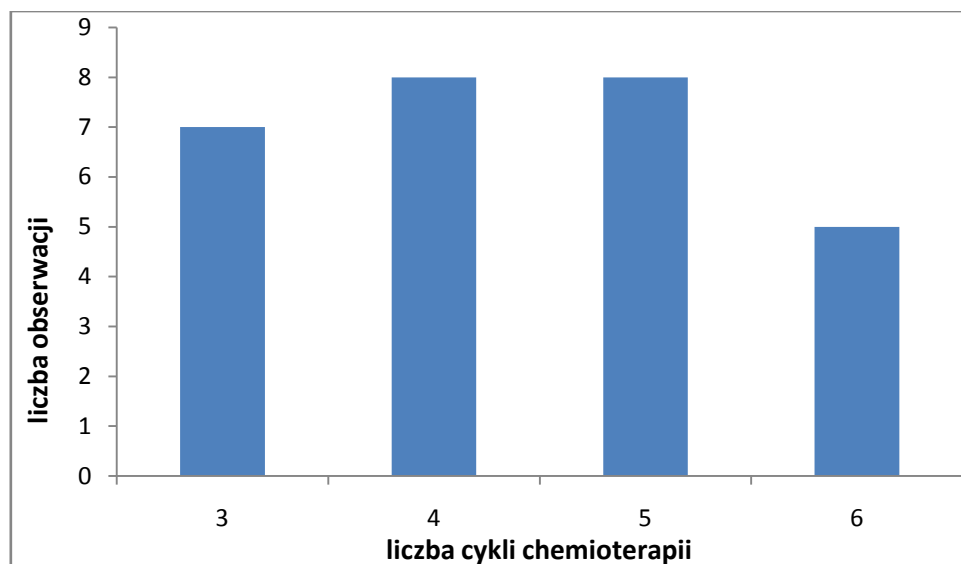
Rycina 5. Rozkład procentowy zaawansowania choroby wg FIGO.

Wszystkie 28 chorych poddanych końcowej analizie otrzymało teleradioterapię do dawki końcowej 50,4Gy, przy czym od dawki 45Gy stosowano osłonę obszaru objętego wysoką dawką z brachyterapii. W analizowanej grupie nie zaobserwowano ostrych odczynów w stopniu wymagającym wcześniejszego zakończenia napromieniania.

Cała badana grupa chorych otrzymała także pełną zaplanowaną brachyterapię śródjamową, tj. cztery frakcje po 7 Gy specyfikowane na izidozę referencyjną przechodzącą przez punkt A zgodnie z opisem zawartym we wcześniejszym rozdziale. Tym samym wszystkie chore (100% analizowanych chorych) otrzymało sumaryczną dawkę EQD2 powyżej 85Gy.

Radioterapia kojarzona była z jednoczasową chemioterapią w dawce 40mg/m<sup>2</sup> powierzchni ciała. W analizowanej grupie, 5 chorych (17,8%) otrzymało pełnych 6 kursów Cisplatyny. U pozostałych 8 chorych (28,6%) podano 5 kursów, tyle samo chorych

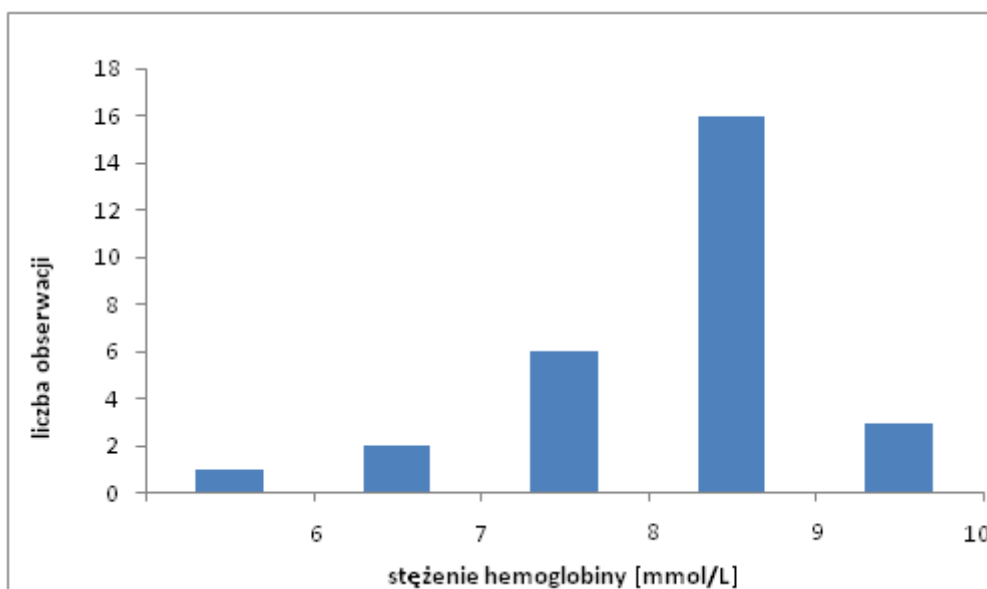
otrzymało 4 kursy, zaś 7 chorych (25%) jedynie 3 kursy chemioterapii. Rozkład liczby kursów chemioterapii w badanej grupie przedstawiono także na rycinie 6.



Rycina 6. Rozkład liczby kursów chemioterapii w analizowanej grupie.

Najczęstszą przyczyną przerwania chemioterapii była nefrotoksyczność, którą stwierdzono u 12 chorych (42,9%). Zdecydowanie rzadziej odstępowano od chemioterapii z powodu niedokrwistości (5 chorych, tj. 17,8%), neutropenii (4 chore, tj. 14,3%) i trombocytopenii (1 chora, tj. 3,6%). W jednym przypadku (3,6%) za wcześniejsze zakończenie leczenia systemowego odpowiadała jednocześnie niedokrwistość i neutropenia.

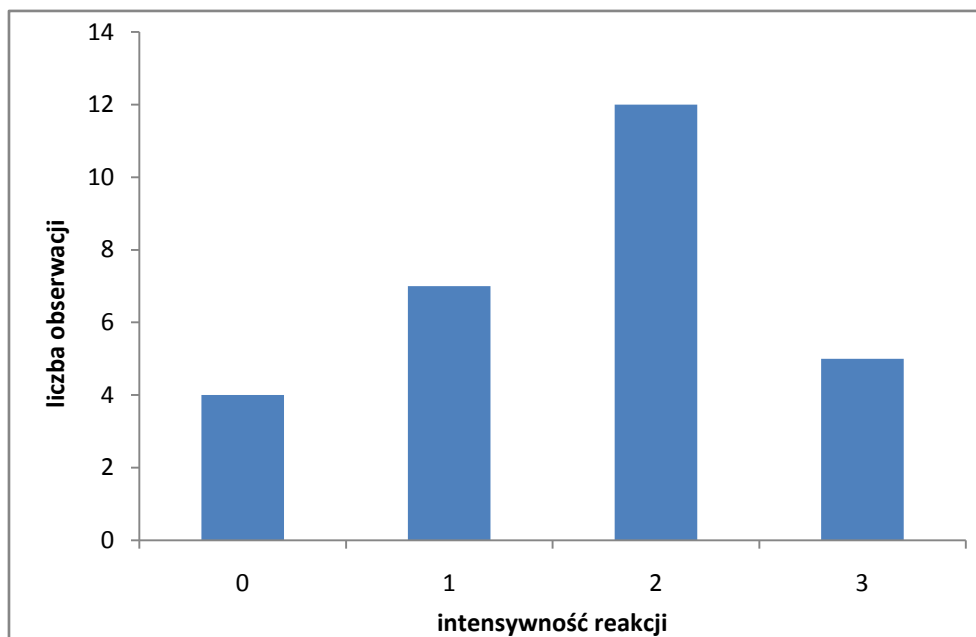
U wszystkich chorych przed rozpoczęciem leczenia wykonano oznaczenie stężenia hemoglobiny we krwi żyłnej. Jej wartości wahały się w przedziale od 5,6 do 9,68 mmol/L, przy czym średnie stężenie hemoglobiny w badanej grupie wynosiło 8,2 mmol/L (SD=8,4), zaś mediana 8,4 mmol/L. Uwzględniając wartości referencyjne przyjęte w Zakładzie Diagnostyki Laboratoryjnej Wielkopolskiego Centrum Onkologii (7,6 - 10,0 mmol/L) stwierdzono, że w całej badanej grupie jedynie 5 chorych (17,8%) miało obniżony poziom hemoglobiny. Rozkład wartości stężenia hemoglobiny w badanej grupie przedstawiono na rycinie 7.



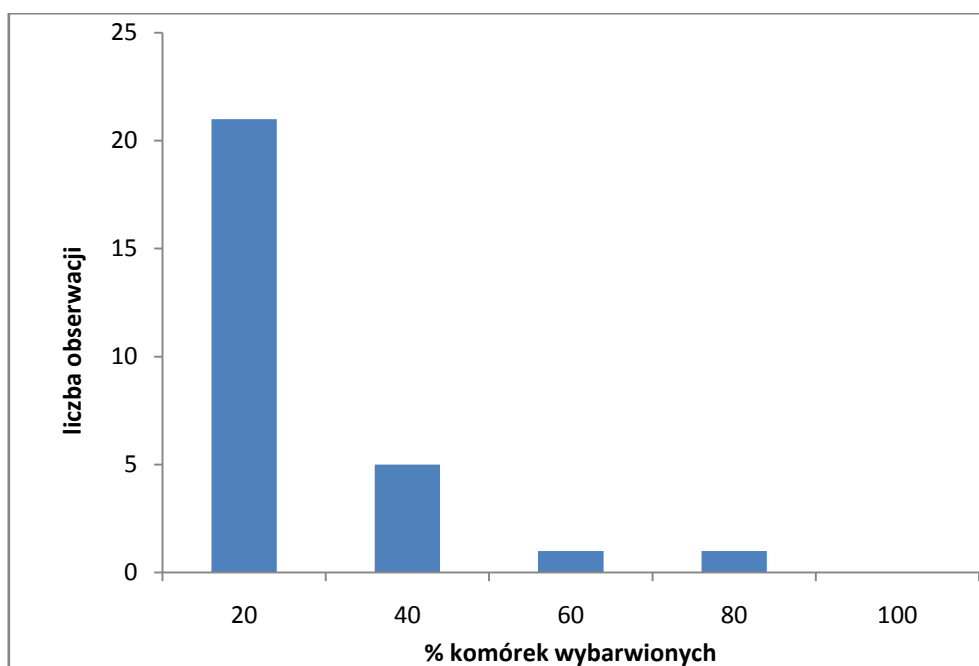
Rycina 7. Rozkład wartości stężenia hemoglobiny w badanej grupie.

#### 5.4 Ekspresja białek CAIX, ERCC1 i PARP w badanej grupie

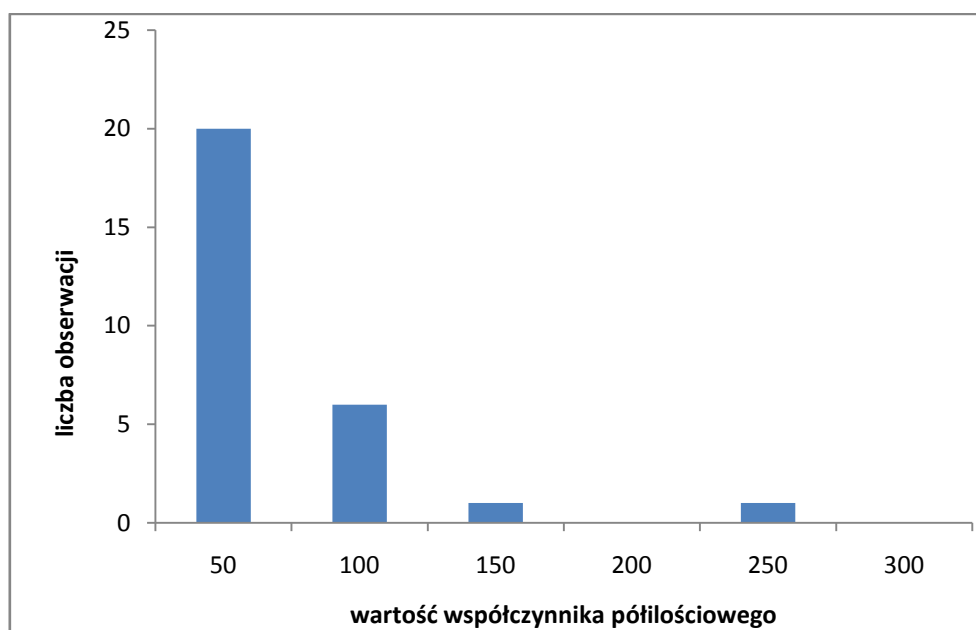
Jakościowa ocena immunohistochemiczna ekspresji białka CAIX w materiale tkankowym pobranym z guza nowotworowego, wykazała, że intensywność przeprowadzonej reakcji wahała się w zakresie od 0 do 3, przy czym brak reakcji stwierdzono u 4 chorych (14,3%), reakcję w stopniu 1 u 7 chorych (25%), w stopniu 2 aż u 12 chorych (42,9%) i w stopniu 3 u 5 chorych (17,8%). Jednocześnie ocena ilościowa wykazała, że średni odsetek wybarwionych komórek wynosił 14,3% (SD=18), a mediana 5%. Półilościowa ocena ekspresji białka CAIX wahała się w zakresie od 0 do 210, jej średnia wartość wyniosła 32,9 (SD=46,8), zaś mediana 10. Ocenę jakościową, ilościową i półilościową ekspresji białka CAIX przedstawiono graficznie na rycinach 8 - 10.



Rycina 8. Rozkład intensywności reakcji immunohistochemicznej z p/ciałem anti-CAIX w badanej grupie.

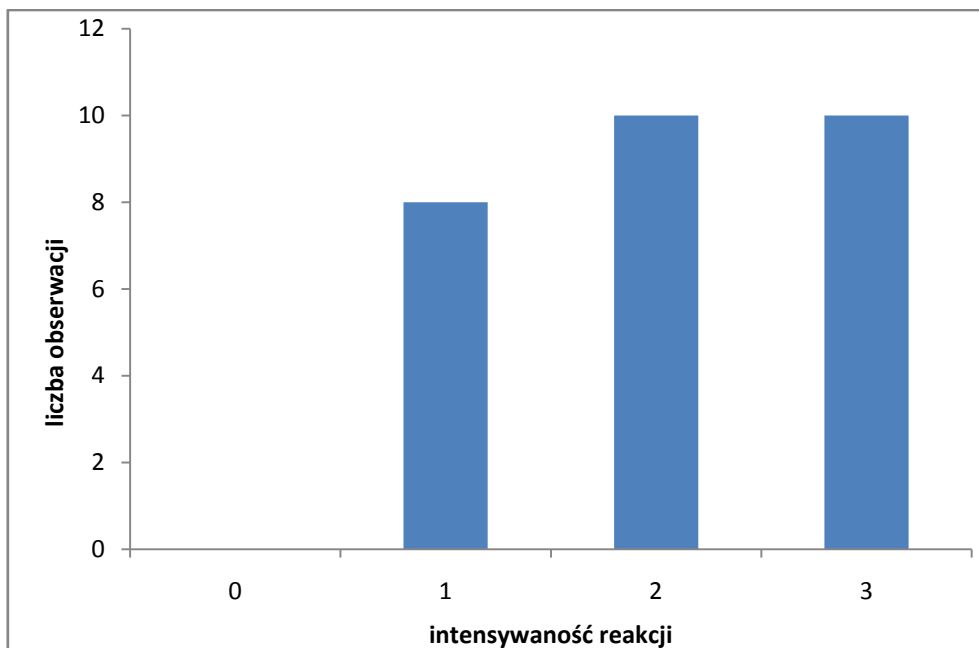


Rycina 9. Rozkład odsetka wybarwionych komórek w reakcji immunohistochemicznej z p/ciałem anti-CAIX w badanej grupie.

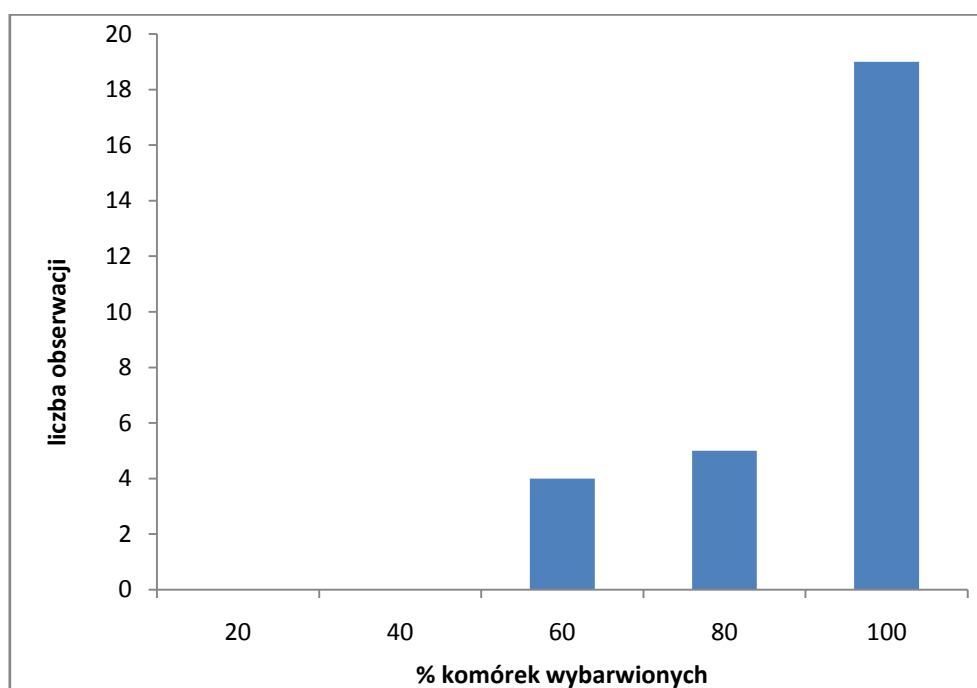


Rycina 10. Rozkład współczynnika półilościowego w reakcji immunohistochemicznej z p/ciałem anti-CAIX w badanej grupie.

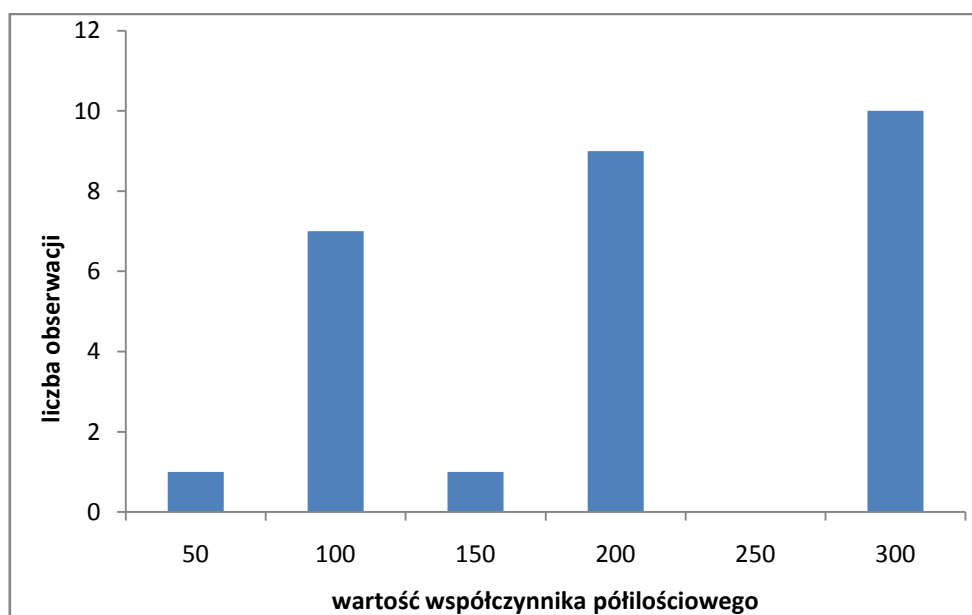
Z kolei jakościowa ocena ekspresji białka ERCC1 zawierała się w przedziale od 1 do 3. Tym samym u wszystkich analizowanych chorych stwierdzono ekspresję ERCC1, przy czym u 8 chorych (28,6%) intensywność reakcji oceniono na 1, u 10 chorych (35,7%) na 2 i u kolejnych 10 chorych (35,7%) na 3. Przeprowadzona ocena ilościowa reakcji immunohistochemicznej pozwoliła stwierdzić, że średni odsetek wybarwionych komórek wynosił 86,8% (SD=15), zaś mediana 90%. Jednocześnie średnia wartość współczynnika półilościowej wyniosła 188,6 (zakres od 50 do 300; SD=93,3) zaś jej mediana 180. Ocenę jakościową, ilościową i półilościową ekspresji białka ERCC1 przedstawiono graficznie na rycinach 11 - 13.



Rycina 11. Rozkład intensywności reakcji immunohistochemicznej z p/ciałem anti-ERCC1 w badanej grupie.

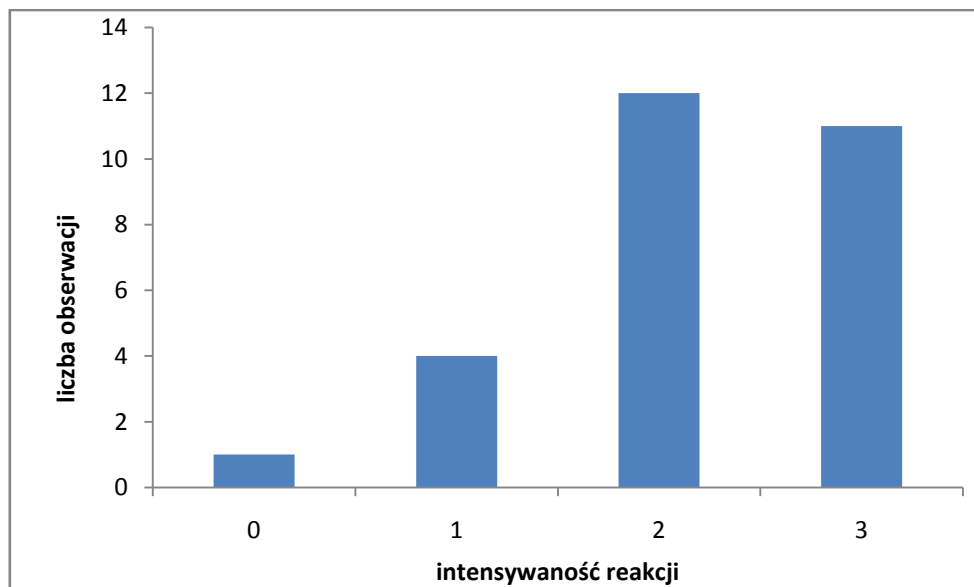


Rycina 12. Rozkład odsetka wybarwionych komórek w reakcji immunohistochemicznej z p/ciałem anti-ERCC1 w badanej grupie.

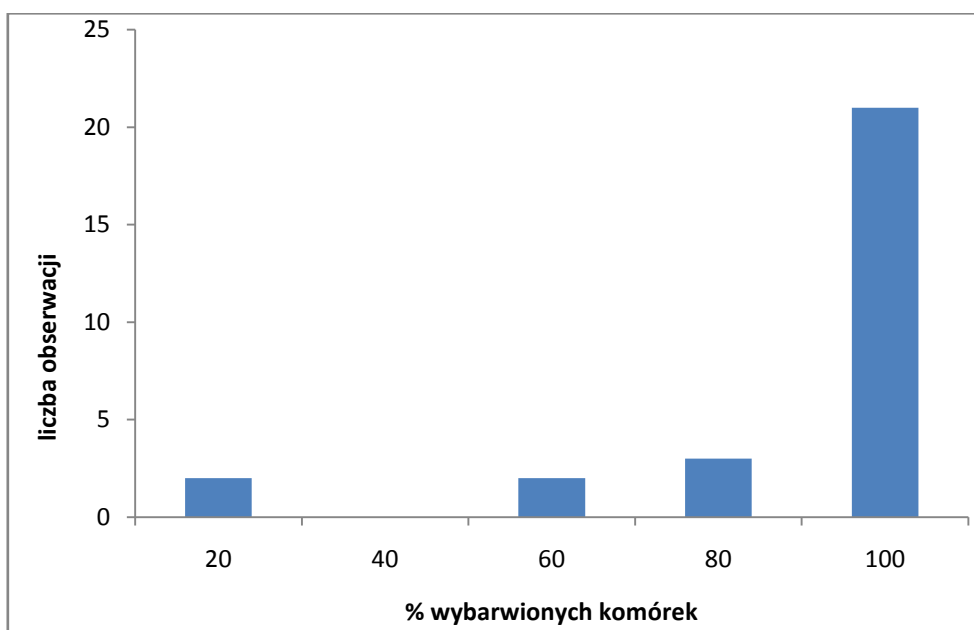


Rycina 13. Rozkład współczynnika półilościowego w reakcji immunohistochemicznej z p/ciałem anti-ERCC1 w badanej grupie.

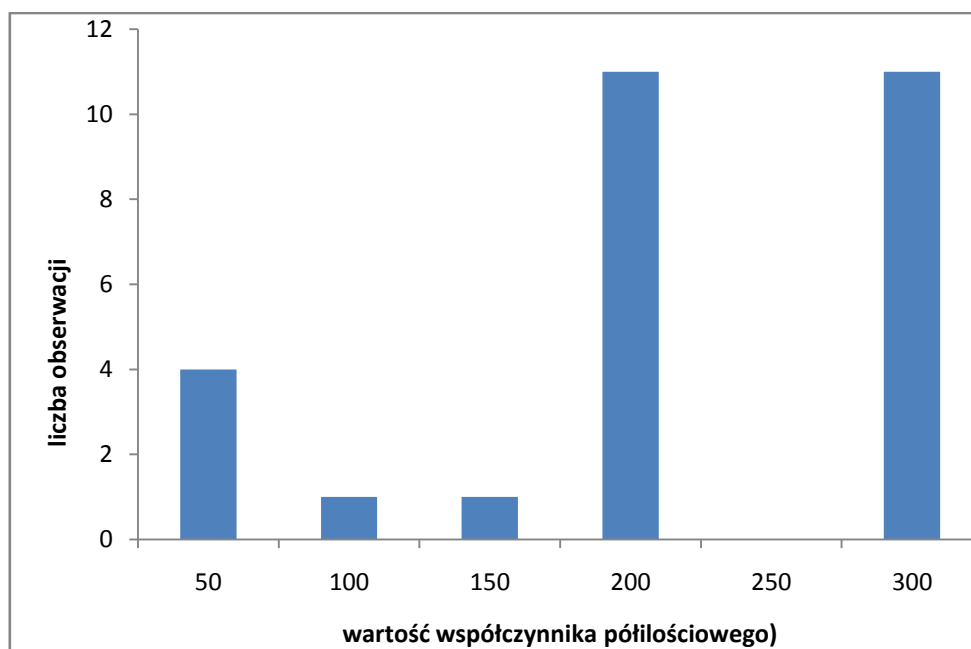
Podobnie jak w przypadku ekspresji białka CAIX, wynik jakościowej oceny ekspresji białka PARP mieścił się w zakresie od 0 do 3. Jednak w przypadku białka PARP, brak reakcji stwierdzono tylko u 1 chorej (3,6%). Jednocześnie intensywność reakcji w stopniu 1 zaobserwowano u 4 chorych (14,3%), w stopniu 2 u 12 chorych (42,9%) i w stopniu 3 u 11 chorych (39,2%). Ocena ilościowa wykazała, że średni odsetek wybarwionych komórek wynosił 85,75% (SD=25,6), zaś mediana 99%. Półilościowa ocena ekspresji białka PARP wahała się w zakresie od 0 do 300, jej średnia wartość wyniosła 203,5 (SD=95,4), zaś mediana 198. Ocenę jakościową, ilościową i półilościową ekspresji białka ERCC1 przedstawiono graficznie na rycinach 14 - 16.



Rycina 14. Rozkład intensywności reakcji immunohistochemicznej z p/ciałem anti-PARP w badanej grupie.



Rycina 15. Rozkład odsetka wybarwionych komórek w reakcji immunohistochemicznej z p/ciałem anti-PARP w badanej grupie.

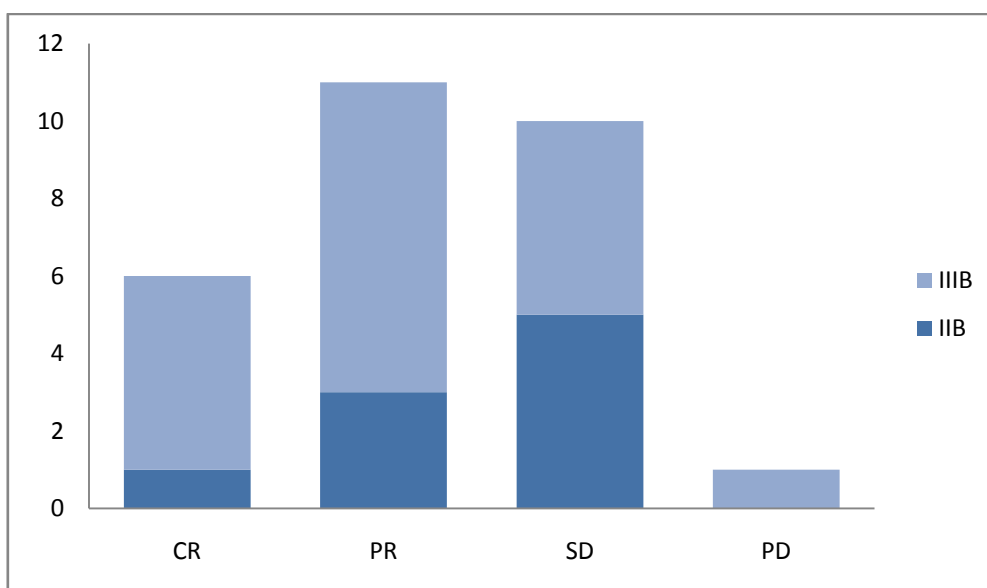


Rycina 16. Rozkład współczynnika pólnościowego w reakcji immunohistochemicznej z p/ciałem anti-PARP w badanej grupie.

### 5.5 Wczesna odpowiedzi na leczenie w badanej grupie.

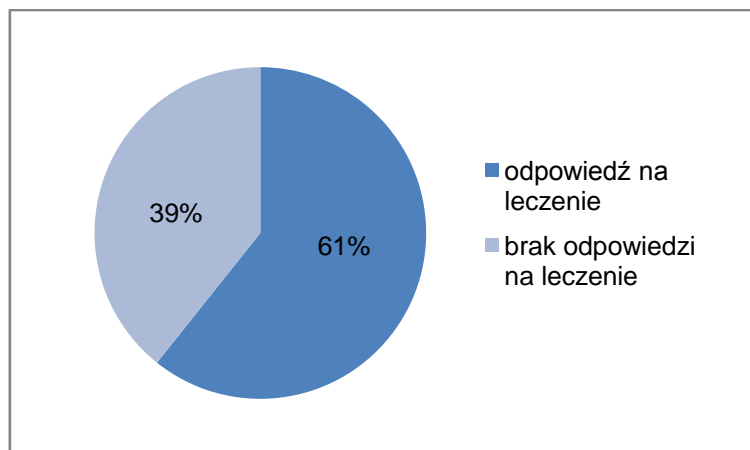
U wszystkich 28 analizowanych chorych dokonano oceny odpowiedzi na leczenie na podstawie porównania obrazów tomografii komputerowej, wykonanych przed rozpoczęciem napromieniania oraz w okresie od 4 do 6 tygodni po jego zakończeniu.

Całkowitą remisję (CR) zmian nowotworowych według kryteriów RECIST stwierdzono u 6 chorych (21,4%), z czego 1 chora wyjściowo była w stopniu zaawansowania IIB, a pozostałych 5 w stopniu IIIB. Odpowiedź częściowa (PR) zaobserwowano natomiast u 11 chorych (39,3%), w tym u 3 chorych w zaawansowaniu IIB i u 8 chorych w IIIB. Z kolei stabilizację choroby (SD) stwierdzono u 10 chorych (35,7%). Na tę liczbę składało się po 5 chorych z zaawansowaniem FIGO IIB i IIIB. U 1 chorej (3,6%) w stopniu IIIB wystąpiła progresja choroby. Rozkład odpowiedzi na leczenie w podziale na zaawansowanie kliniczne przedstawiono graficznie na rycinie 17.



Rycina 17. Rozkład odpowiedzi na leczenie wg kryteriów RECIST w podziale na zaawansowanie kliniczne wg FIGO w badanej grupie.

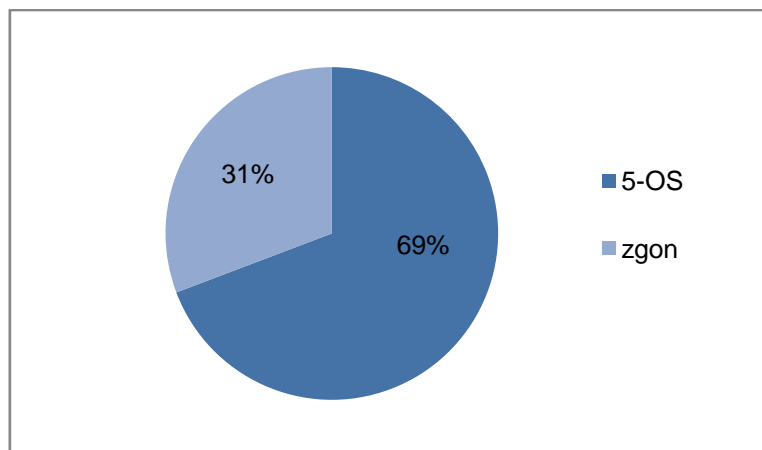
Z uwagi na stosunkowo małą liczebność badanej grupy, dla celów statystycznych dokonano podziału na dwie podgrupy. W pierwszej znalazły się chore, u których stwierdzono odpowiedź na leczenie (CR i PR), zaś w drugiej podgrupie chore nie odpowiadające na leczenie (SD lub PD). Tym samym odpowiedź na leczenie zaobserwowano u 17 chorych (60,7%), zaś jej brak u 11 chorych (39,3%). Rozkład procentowy obu podgrup w odniesieniu do całej badanej grupy przedstawiono graficznie na rycinie 18.



Rycina 17. Rozkład procentowy podgrupy odpowiadającej na leczenie (CR i PR wg RECIST) i nie odpowiadającej na leczenie (SD i PD wg RECIST) w badanej grupie.

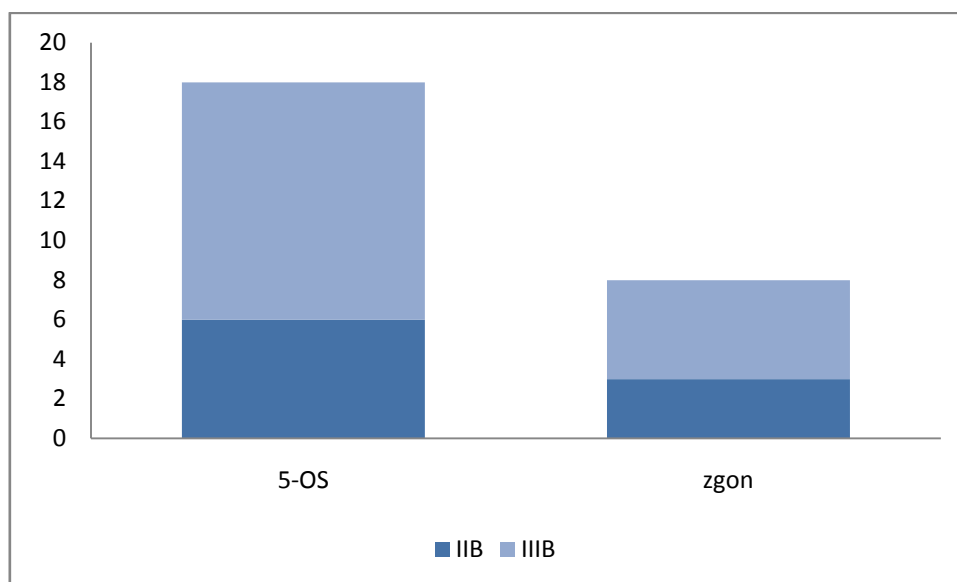
### 5.5 Odległa odpowiedzi na leczenie w badanej grupie

Odległej analizy wyników leczenia dokonano u 26 chorych (92,8%), gdyż 2 chore (7,2%) nie zgłosiły się na zaproponowane badania kontrolne po zakończonym leczeniu. W trakcie pięcioletniej obserwacji, zgon stwierdzono u 8 chorych (30,7%). U pozostałych 18 chorych (69,3%) po 5 latach od zakończonej radiochemioterapii nie stwierdzono wznowy choroby na podstawie przeprowadzonych badań obrazowych. Rozkład procentowy przeżyć pięcioletnich w odniesieniu do całej grupy poddanej obserwacji (wspomniane 26 chorych) przedstawiono na wykresie 18.



Rycina 18. Rozkład procentowy zgonów i przeżyć pięcioletnich (5 OS) w badanej grupie

Wśród 18 chorych, u których odnotowano przeżycia pięcioletnie, u 6 chorych pierwotny stopień zaawansowania choroby według FIGO określony był jako IIB, zaś u 12 chorych IIIB. Jednocześnie podgrupę chorych, u których stwierdzono zgon, stanowiły 3 chore ze stopniem IIB i 5 chorych ze stopniem IIIB według FIGO. Rozkład przeżyć pięcioletnich w podziale na stopień zaawansowania nowotworu przedstawiono na rycinie 19.

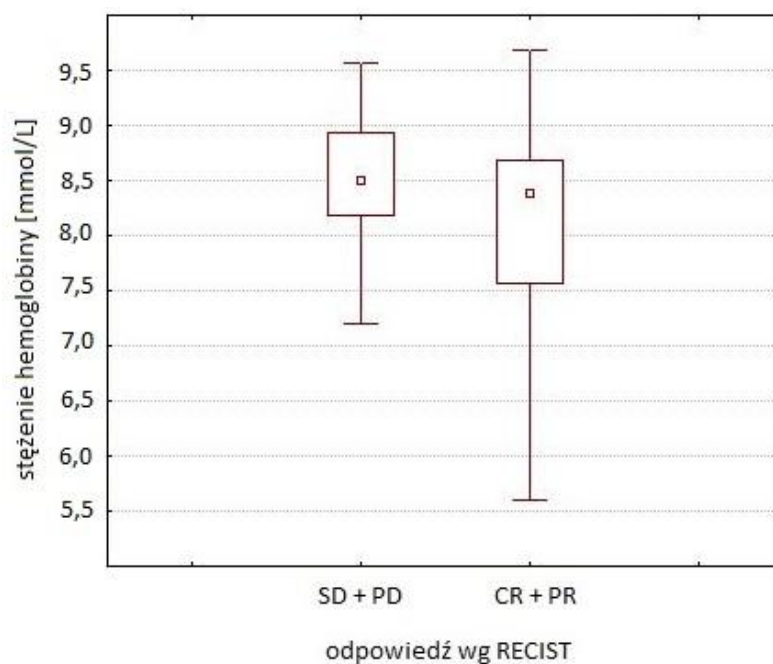


Rycina 19. Rozkład przeżyć pięcioletnich (5 OS) i zgonów w podziale na zaawansowanie kliniczne według FIGO w badanej grupie

Najczęstszą przyczyną niepowodzenia terapii była wznowa miejscowa choroby (5 chorych), dodatkowo u jednej chorej stwierdzono jednoczesną wznowę miejscową i przerzuty do kości. U pozostałych dwóch chorych, które nie przeżyły okresu obserwacji, wykazano rozsiew choroby do ośrodkowego układu nerwowego lub wątroby.

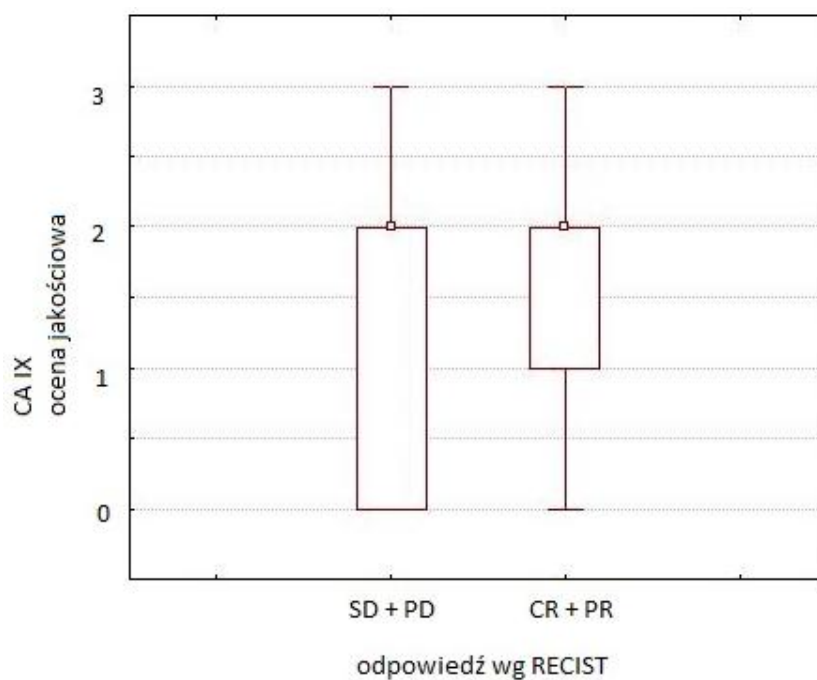
## 5.6 Ocena wartości predykcyjnej badanych czynników

Analiza statystyczna zebranego materiału wykazała brak zależności statystycznej pomiędzy stężeniem hemoglobiny we krwi obwodowej a wczesną odpowiedzią na leczenie, określoną według kryteriów RECIST ( $p=0,230$ ). Średnie stężenie hemoglobiny w podgrupie odpowiadającej na leczenie wynosiło 8,0 mmol/L (mediana 8,38 mmol/L,  $SD=1,02$ ), zaś w podgrupie, w której nie stwierdzono odpowiedzi 8,48 mmol/L (mediana 8,50 mmol/L,  $SD=0,65$ ). Wartości te przedstawiono szczegółowo na rycinie 20.



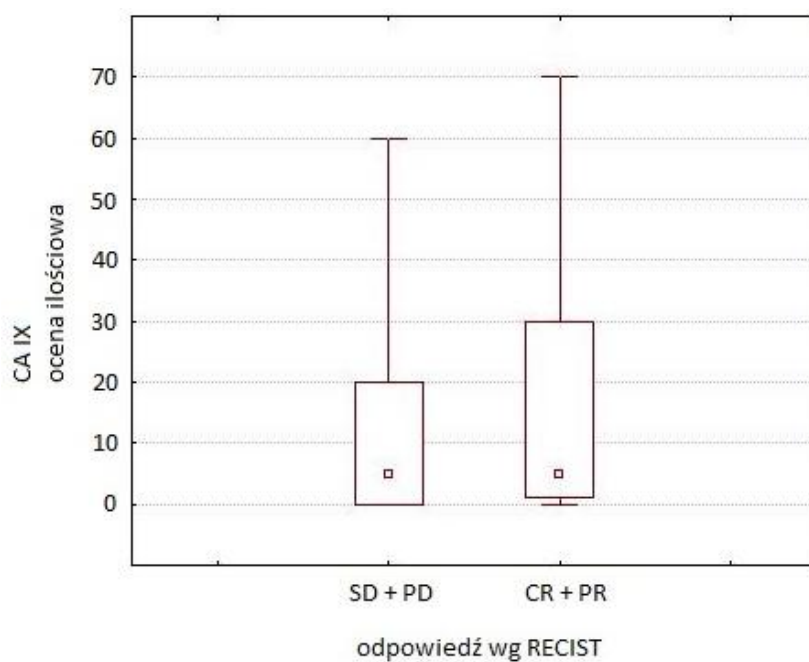
Rycina 20. Wartości stężenia hemoglobiny we krwi obwodowej przed leczeniem w podziale na podgrupy odpowiadające na leczenie i bez odpowiedzi na radiochemioterapię

Ocena korelacji pomiędzy ekspresją białka CAIX, ocenioną w skali jakościowej, a odpowiedzią wczesną na leczenie nie wykazała różnic istotnych statystycznie ( $p=0,264$ ). Mediana intensywności reakcji w obu badanych podgrupach była identyczna i wynosiła 2. Szczegółowe wyniki przedstawiono na rycinie 21.



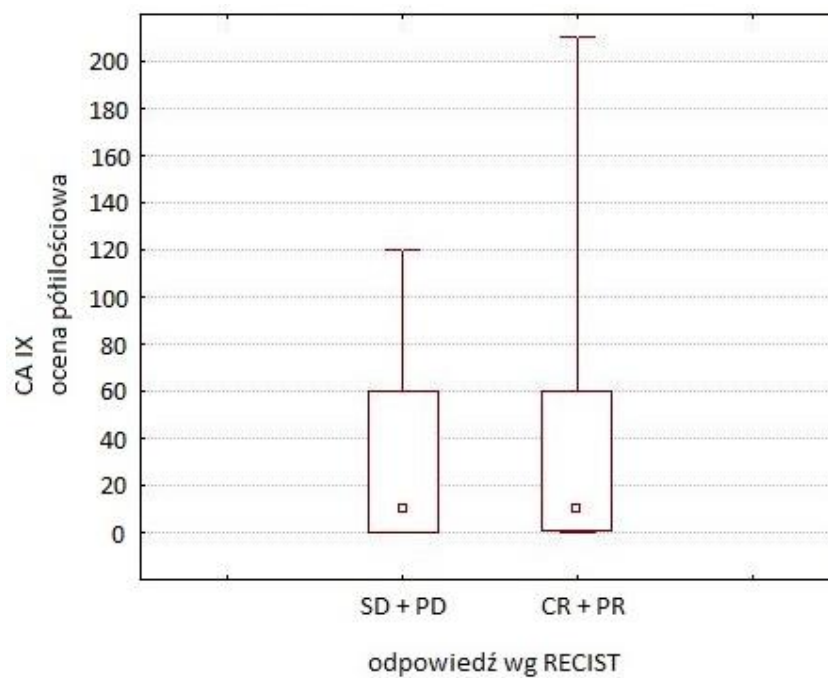
Rycina 21. Wyniki oceny jakościowej ekspresji białka CAIX w podziale na podgrupy odpowiadające na leczenie i bez odpowiedzi na radiochemioterapię

Analiza zależności pomiędzy ekspresją CAIX ocenioną w skali ilościowej a wynikami leczenia także nie wykazała różnic istotnych statystycznie ( $p=0,585$ ). Średnie wartości odsetka wybarwionych komórek były zbliżone do siebie i wynosiły 14,65% i 13,91% odpowiednio dla grupy odpowiadającej na leczenie i grupy bez odpowiedzi. Jednocześnie mediana tych wartości była w obu podgrupach identyczna i wynosiła 5,0%. Szczegółowe wyniki tej analizy przedstawiono na rycinie 22.



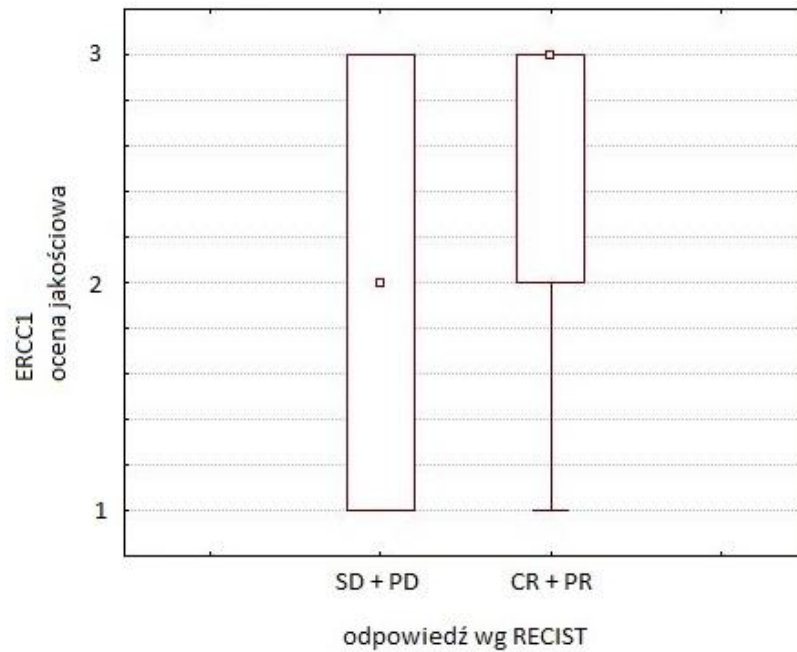
Rycina 22. Wyniki oceny ilościowej ekspresji białka CAIX w podziale na podgrupy odpowiadające na leczenie i bez odpowiedzi na radiochemioterapię

Także w przypadku oceny w skali półilościowej nie wykazano istotnych zależności statystycznych w stosunku do odpowiedzi na leczenie ( $p=0,601$ ). Średnia wartość tego współczynnika w podgrupie odpowiadającej na leczenie wynosiła 35,24 (SD 52,63), zaś w podgrupie bez odpowiedzi 26,36 (SD=38,37). Mediana oceny półilościowej w obu podgrupach wynosiła 10. Wyniki te przedstawiono szczegółowo na rycinie 23.



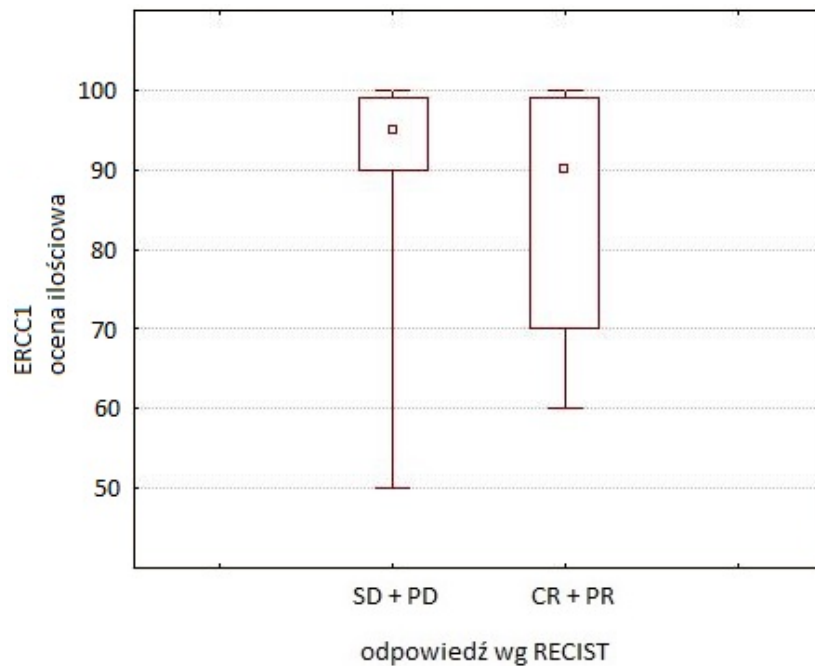
Rycina 23. Wyniki oceny półilościowej ekspresji białka CAIX w podziale na podgrupy odpowiadające na leczenie i bez odpowiedzi na radiochemioterapię

Analiza statystyczna nie wykazała również korelacji pomiędzy ekspresją ERCC1 wyrażoną w skali jakościowej a odpowiedzią wczesną na leczenie ( $p=0,294$ ). Mediana intensywności reakcji w podgrupie odpowiadającej na leczenie i nieodpowiadającej była identyczna i wynosiła 2. Szczegółowe wyniki tej analizy przedstawiono na rycinie 24.



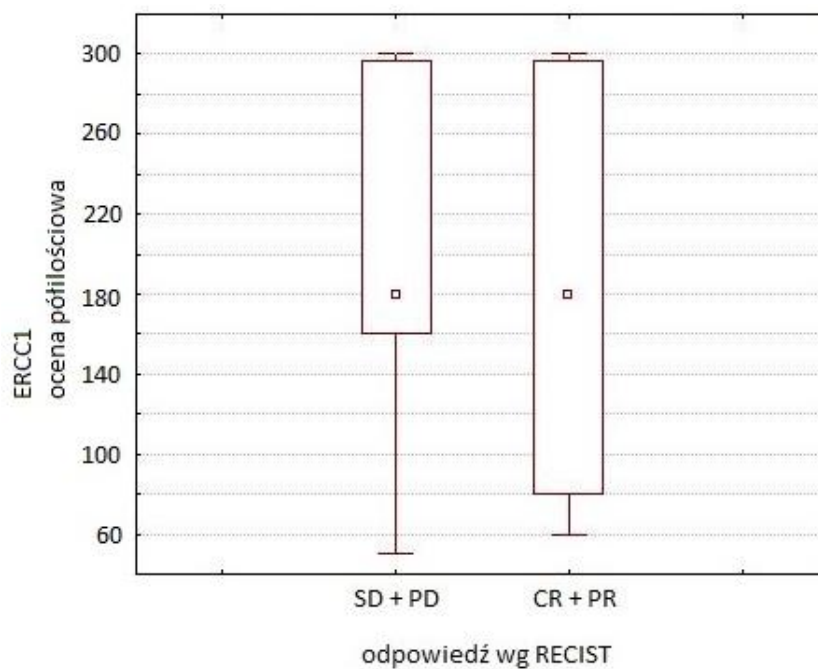
Rycina 24. Wyniki oceny jakościowej ekspresji białka ERCC1 w podziale na podgrupy odpowiadające na leczenie i bez odpowiedzi na radiochemioterapię

Nie stwierdzono także istotnej statystycznie zależności pomiędzy oceną immunohistochemiczną ERCC1 w skali ilościowej a odpowiedzią na leczenie ( $p=0,475$ ). Średni odsetek wybarwionych komórek w obu podgrupach był podobny i wynosił 84,82% (SD=15,44; mediana 90%) w grupie odpowiadającej na leczenie oraz 89,82% (SD=14,53; mediana 95%) w grupie bez odpowiedzi. Wyniki te zobrazowano na rycinie 25.



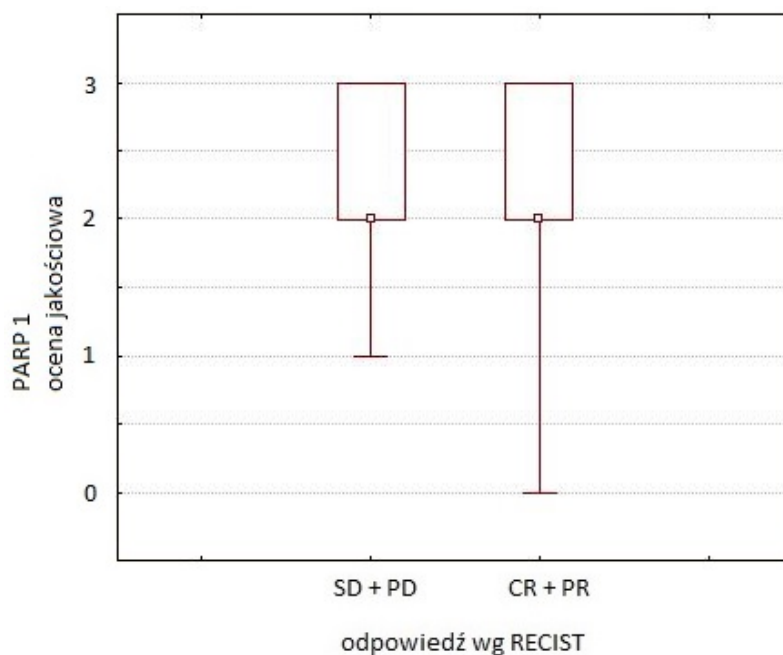
Rycina 25. Wyniki oceny ilościowej ekspresji białka ERCC1 w podziale na podgrupy odpowiadające na leczenie i bez odpowiedzi na radiochemioterapię

Ocena w skali półilościowej wykazała natomiast, że średnia wartość współczynnika reakcji immunohistochemicznej w grupie odpowiadającej na leczenie wynosiła 173,94 (SD=95,13), zaś w grupie nieodpowiadającej 211,27 (SD=89,98). Różnice te nie były jednak istotne statystycznie ( $p=0,418$ ). Jednocześnie mediany tego współczynnika dla obu podgrup były identyczne i wyniosły 180. Wyniki tej analizy przedstawiono na rycinie 26.



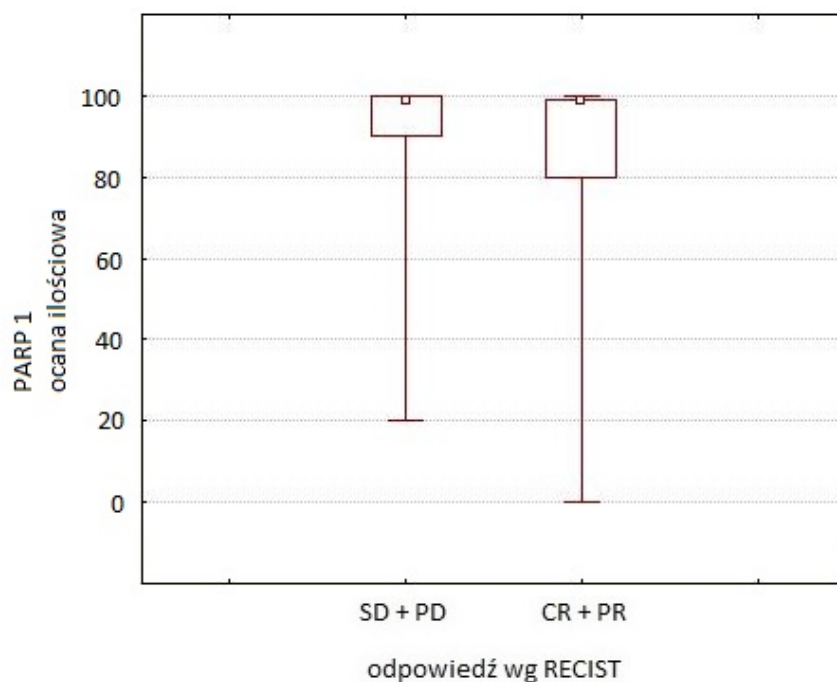
Rycina 26. Wyniki oceny półilościowej ekspresji białka ERCC1 w podziale na podgrupy odpowiadające na leczenie i bez odpowiedzi na radiochemioterapię

Podobnie jak w przypadku oceny jakościowej reakcji z przeciwciałami anti-CAIX i anti-ERCC1, także wyniki reakcji z anti-PARP-1 wykazały, że mediana intensywności reakcji w podgrupach odpowiadającej na leczenie i nieodpowiadającej była identyczna i wynosiła 2 ( $p=0,402$ ). Szczegółowe wyniki korelacji oceny jakościowej ekspresji PARP1 z odpowiedzią na leczenie przedstawiona na rycinie 27.



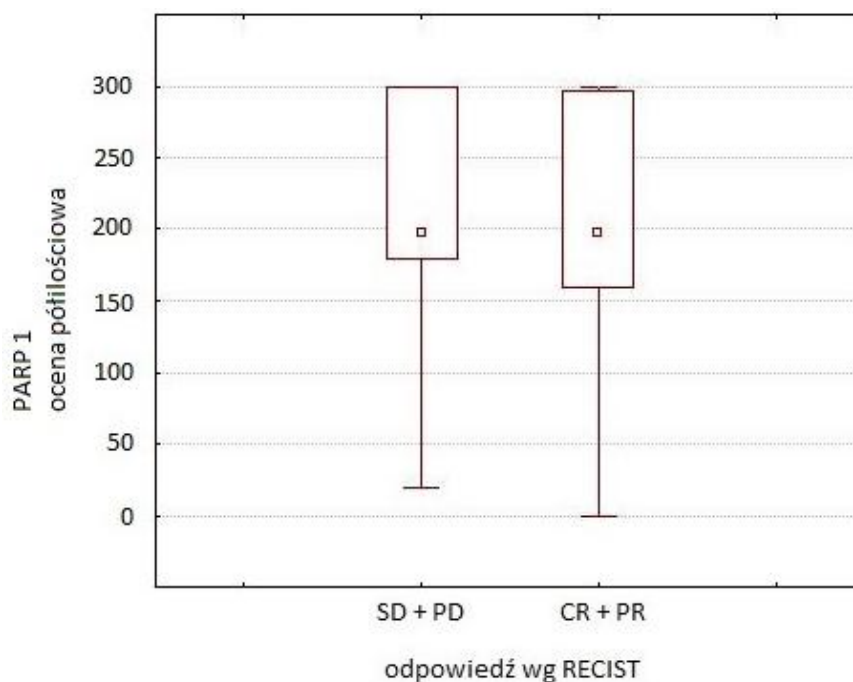
Rycina 27. Wyniki oceny jakościowej ekspresji białka PARP1 w podziale na podgrupy odpowiadające na leczenie i bez odpowiedzi na radiochemioterapię

Z kolei ocena jakościowa wykazała, że średni odsetek wybarwionych komórek w obu podgrupach był zbliżony i wynosił odpowiednio 84,29% (SD=27,17) i 88,0% (SD=24,22). Jednocześnie mediany tego odsetka w obu podgrupach były identyczne i wyniosły 99,0%. Stąd analiza statystyczna nie wykazała istotnych różnic ( $p=0,515$ ). Wyniki te zobrazowano na rycinie 28.



Rycina 28. Wyniki oceny ilościowej ekspresji białka PARP1 w podziale na podgrupy odpowiadające na leczenie i bez odpowiedzi na radiochemioterapię

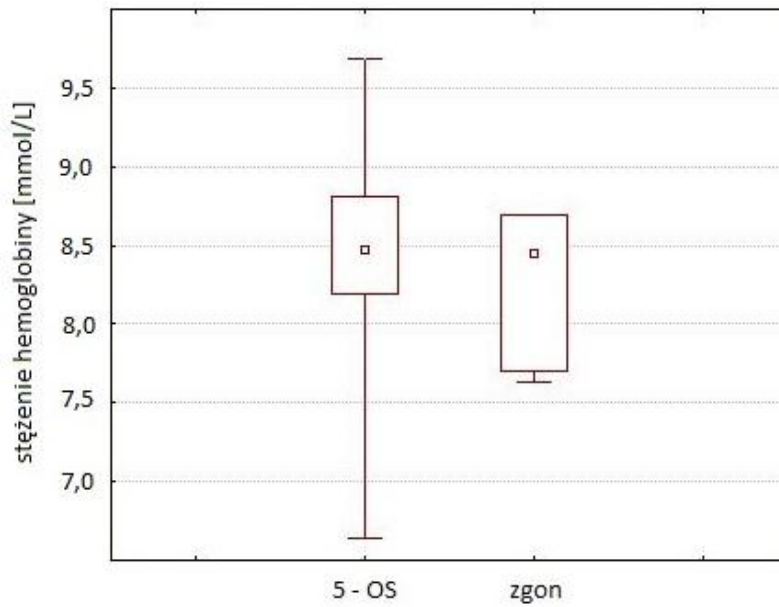
Tym samey zbliżone były wartości współczynnika półilościowego dla obu podgrup. Ich średnia w grupie chorych odpowiadających na leczenie wynosiła 193,12 (SD=99,76), zaś w grupie nieodpowiadających 219,55 (SD=90,45), podczas gdy mediany w obu grupach były identyczne i wyniosły 198. Analiza statystyczna nie wykazała istotnych różnic ( $p=0,475$ ). Szczegółowe wyniki tej analizy przedstawia rycina 29.



Rycina 29. Wyniki oceny ilościowej ekspresji białka PARP1 w podziale na podgrupy odpowiadające na leczenie i bez odpowiedzi na radiochemioterapię

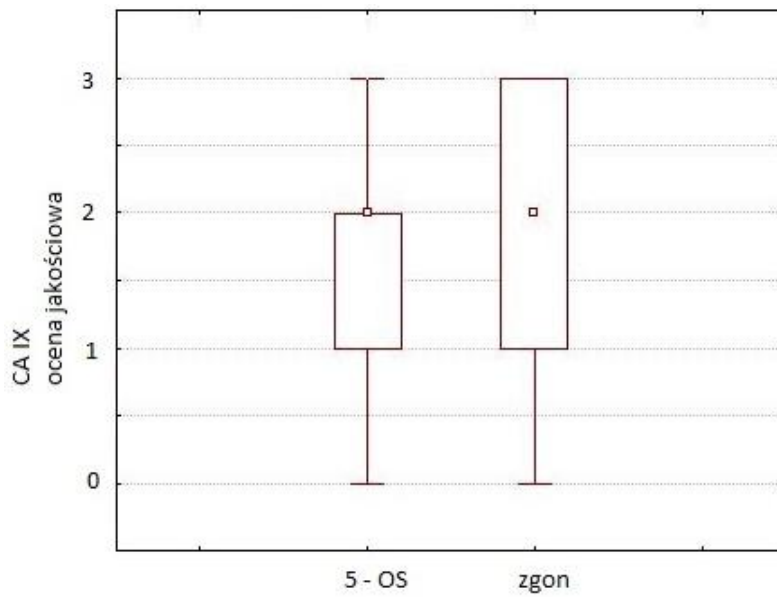
### 5.7 Ocena wartości prognostycznej badanych czynników

Średnie stężenie hemoglobiny w podgrupie chorych, które osiągnęły przeżycia pięcioletnie oraz w podgrupie chorych które zmarły były zbliżone i wynosiły odpowiednio 8,36 mmol/L (SD=0,78) oraz 8,23 mmol/L (SD=0,53). Jednocześnie mediany tych wartości były niemal identyczne i wynosiły odpowiednio 8,47 mmol/L oraz 8,44 mmol/L. Wyniki te zobrazowano na rycinie 30.



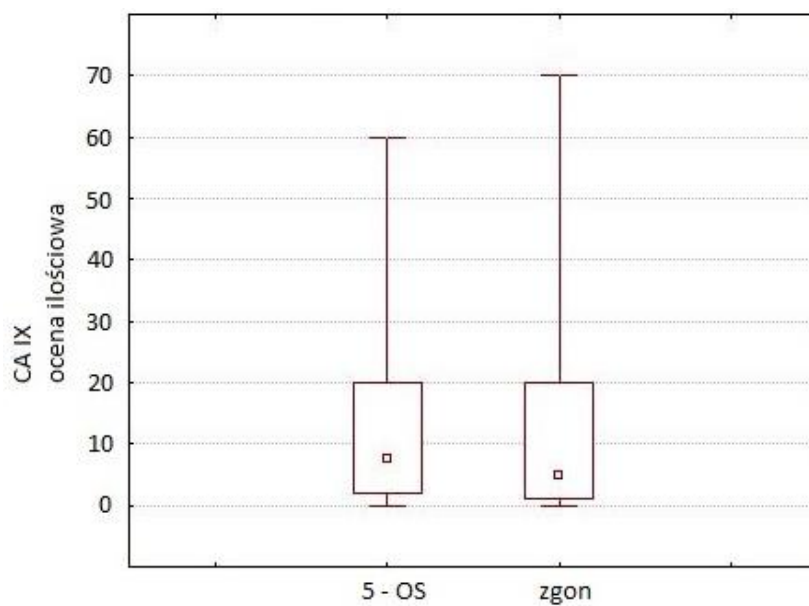
Rycina 30. Wartości stężenia hemoglobiny we krwi obwodowej przed leczeniem w podziale na przeżycia pięcioletnie (5-OS) i zgony

Stopień ekspresji białka CAIX wśród chorych które przeżyły okres pięcioletni oraz chorych które zmarły był zbliżony. Mediana oceny w skali jakościowej dla obu podgrup była identyczna i wyniosła 2. Szczegółowe wyniki oceny jakościowej w obu tych podgrupach przedstawiono na rycinie 31.



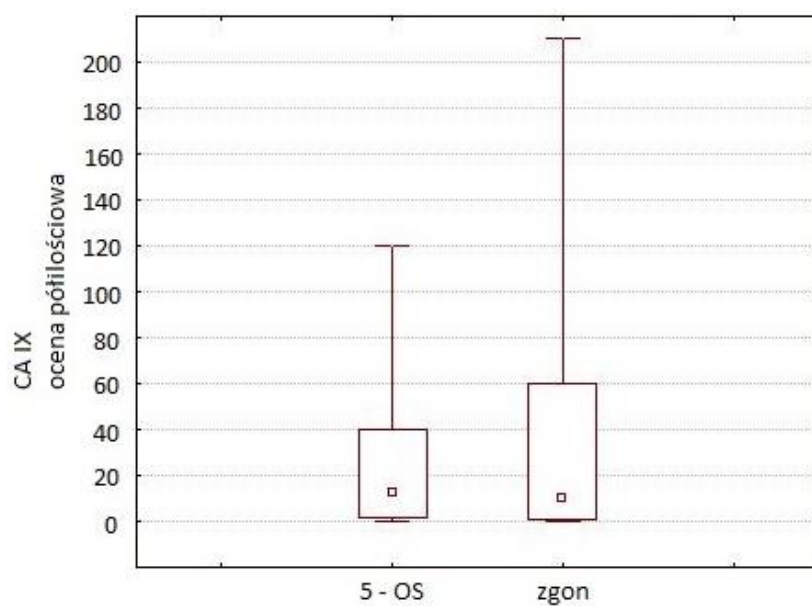
Rycina 31. Wyniki oceny jakościowej ekspresji białka CAIX w podziale na przeżycia pięcioletnie (5-OS) i zgony

Z kolei średni odsetek wybarwionych komórek wyniósł odpowiednio 13,61% (SD=15,57) i 19,20% (SD=29,51). Jednocześnie mediana intensywności reakcji u chorych, które przeżyły okres obserwacji wynosiła 7,5%, zaś u chorych które zmarły 5%. Wyniki oceny ilościowej w obu podgrupach przedstawiono na rycinie 32.



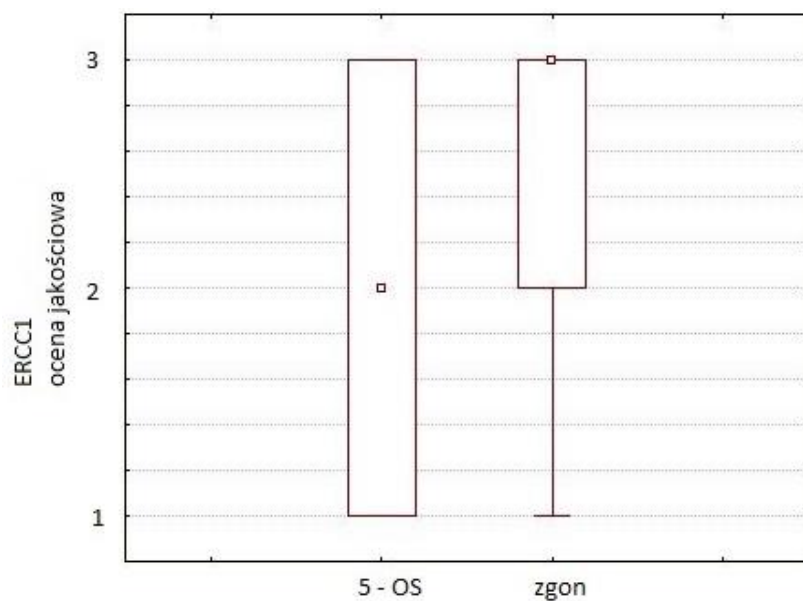
Rycina 32. Wyniki oceny ilościowej ekspresji białka CAIX w podziale na przeżycia pięcioletnie (5-OS) i zgony

Tym samym nie stwierdzono znamiennej różnicy w ocenie półilościowej. W podgrupie chorych z przeżyciem pięcioletnim średnia wartość współczynnika półilościowego wyniosła 28,89 (SD=33,96), zaś jego mediana 12,5. Natomiast w drugiej podgrupie średnia ta osiągnęła nieco wyższy poziom i wyniosła 56,20 (SD=89,46) przy medianie 10. Wartości te zobrazowano na rycinie 33.



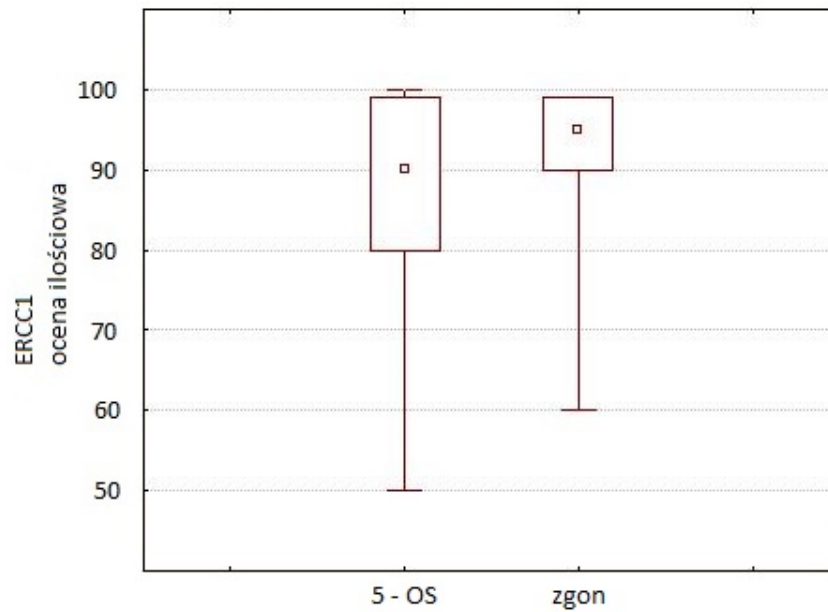
Rycina 33. Wyniki oceny ilościowej ekspresji białka CAIX w podziale na przeżycia pięcioletnie (5-OS) i zgony

Także stopień ekspresji białka ERCC1 w obu podgrupach był podobny. W tym przypadku jednak mediana oceny jakościowej u chorych, które przeżyły 5 lat wyniosła 2, zaś w drugiej podgrupie 3. Szczegółowe wyniki oceny jakościowej w podgrupach przedstawiono na rycinie 34.



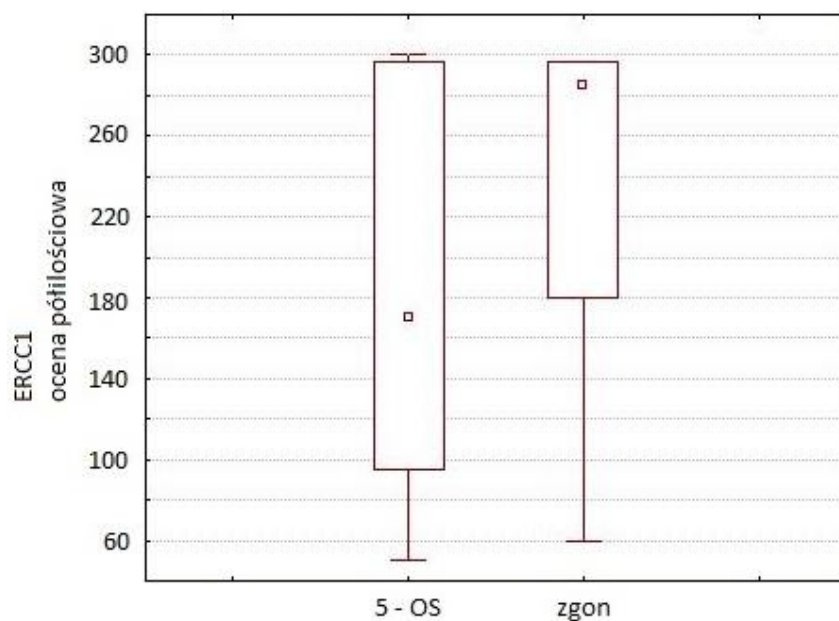
Rycina 34. Wyniki oceny jakościowej ekspresji białka ERCC1 w podziale na przeżycia pięcioletnie (5-OS) i zgony

Średni odsetek wybarwionych komórek wynosił 86,0% (SD=15,19) i 88,6% (SD=16,41) odpowiednio u chorych, u których osiągnięto przeżycie pięcioletnie i u chorych, które zmarły. Mediany tych wartości także były zbliżone i wyniosły odpowiednio 90% i 95%. Wyniki te zobrazowano na rycinie 35.



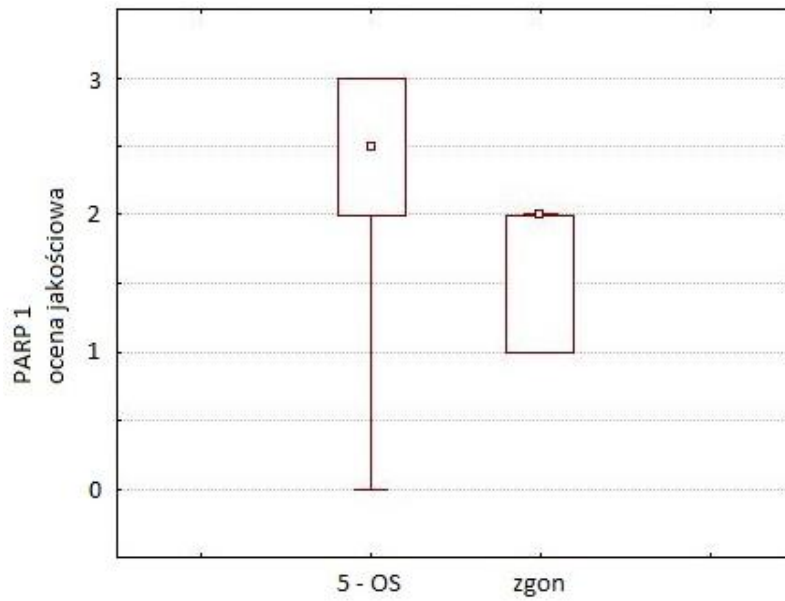
Rycina 35. Wyniki oceny ilościowej ekspresji białka ERCC1 w podziale na przeżycia pięcioletnie (5-OS) i zgony

Natomiast ocena ekspresji ERCC1 w skali półilościowej wykazała większe różnice. Średnia wartość tego współczynnika dla chorych przeżywających 5 lat wyniosła 180,22 (SD=95,56; medniana 170), podczas gdy u chorych zmarłych 223,80 (SD=103,94; mediana 285). Wyniki oceny półilościowej w obu podgrupach przedstawiono na rycinie 36.



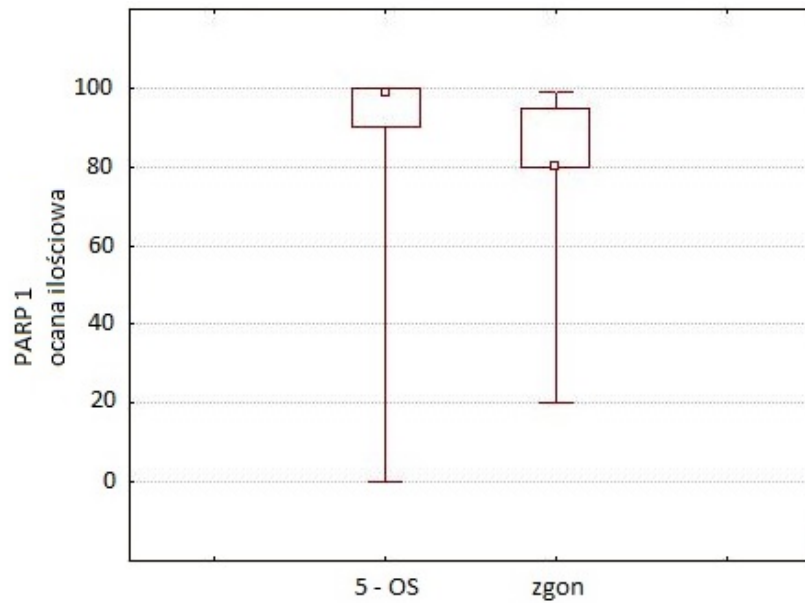
Rycina 36. Wyniki oceny półilościowej ekspresji białka ERCC1 w podziale na przeżycia pięcioletnie (5-OS) i zgony

Podobnie jak w przypadku CAIX i ERCC1, także ekspresja PARP w obu podgrupach była podobna. Ocena w skali jakościowej wykazała, że mediana intensywności reakcji immunohistochemicznej w podgrupie z przeżyciem pięcioletnim wyniosła 3, podczas gdy w podgrupie chorych zmarłych 2. Szczegółowe wyniki tej analizy przedstawiono na rycinie 37.



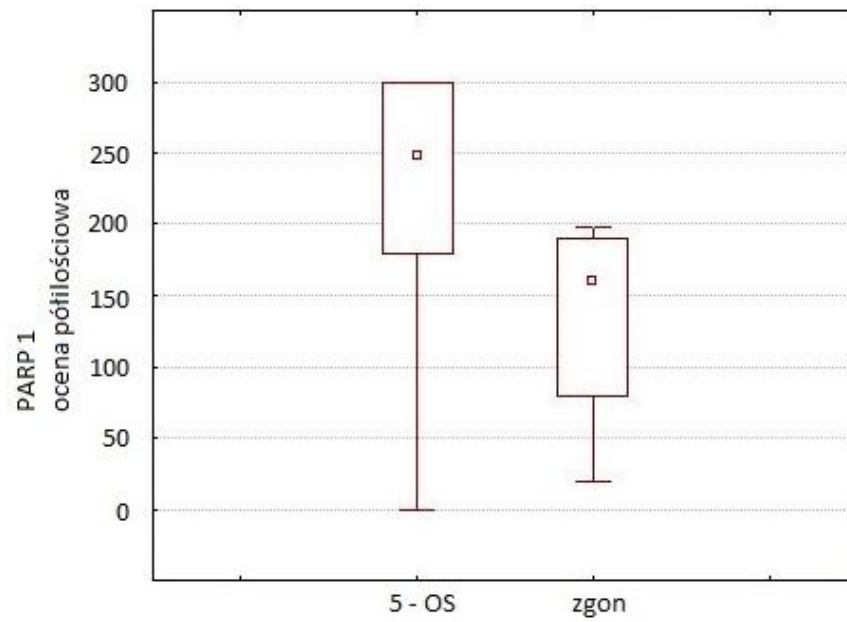
Rycina 37. Wyniki oceny jakościowej ekspresji białka PARP1 w podziale na przeżycia pięcioletnie (5-OS) i zgony

Z kolei średni odsetek wybarwionych komórek w pierwszej podgrupie wyniósł 87,94% (SD=15,54), zaś jej mediana 25,54%. W podgrupie chorych zmarłych wartości te były podobne i wyniosły odpowiednio 74,80% (SD=31,82) i 80%. Wyniki te zobrazowano na rycinie 38.



Rycina 38. Wyniki oceny ilościowej ekspresji białka PARP1 w podziale na przeżycia pięcioletnie (5-OS) i zgony

Jednocześnie średnia wartość współczynnika półilościowego w podgrupie chorych przeżywających 5 lat wyniosła 222,89 (SD=92,52), zaś jej medniana 247,5. Z kolei w drugiej analizowanej podgrupie wartości te były niższe i wyniosły odpowiednio 129,60 (SD=77,01) i 160. Wyniki oceny półilościowej w obu podgrupach przedstawia rycina 39.



Rycina 39. Wyniki oceny półilościowej ekspresji białka PARP1 w podziale na przeżycia pięcioletnie (5-OS) i zgony

## 6 Dyskusja

Podstawą terapii spersonalizowanej jest określenie u każdego chorego indywidualnych czynników predykcyjnych, które pozwolą na oszacowanie spodziewanego wyniku zaplanowanego leczenia. Na ich podstawie można próbować intensyfikować terapię u chorych z nowotworem potencjalnie opornym na leczenie, a także wzmoczyć nadzór onkologiczny po zakończeniu leczenia celem wcześniejszego wykrycia wznowy czy progresji choroby. Z drugiej strony, te same czynniki pozwalają odstąpić od agresywnego leczenia w obliczu np. wysokiej toksyczności u chorych z nowotworem o większej wrażliwości na dany typ terapii. Brak określenia wiarygodnych czynników predykcyjnych, których oznaczenie byłoby stosunkowo łatwe i dostępne w większości ośrodków onkologicznych, spowodował, że od blisko 20 lat niezmiennym standardem leczenia miejscowo zaawansowanego raka szyjki macicy jest stale radiochemioterapia oparta o Cisplatynę. Próby eskalacji dawki promieniowania przyniosły jedynie wzrost częstości odczynów popromiennych (43). Z kolei intensyfikacja chemioterapii i próby łączenia Cisplatyny z Gemcytabiną (16) pozwoliły na zwiększenie odsetka przeżyć całkowitych, jednak ze względu na stosunkowo dużą toksyczność tego schematu nie znalazł on zastosowania w codziennej praktyce klinicznej. Jednocześnie w literaturze brakuje rzetelnych badań dotyczących znaczenia czynników predykcyjnych w grupie chorych na miejscowo zaawansowanego raka szyjki macicy. Fakt ten podyktowany jest stosunkowo rzadkim występowaniem choroby w stopniu II i III wg FIGO w krajach, w których prowadzona jest większość badań klinicznych (kraje Unii Europejskiej, USA, Kanada).

Prezentowane badanie poddało analizie stosunkowo nieliczną grupę 28 chorych z rakiem szyjki macicy w stopniu IIB i IIIB według FIGO. Dzięki rygorystycznym kryteriom włączenia i wyłączenia z badania, była to jednak bardzo jednolita grupa, szczególnie pod względem podanej dawki radioterapii, ilości kursów chemioterapii, przeprowadzonej analizy wczesnej odpowiedzi na leczenie według kryteriów RECIST, a także pod względem przeprowadzonej oceny immunohistochemicznej. Ponadto badanie miało charakter prospektywny, co dodatkowo podnosi wiarygodność przedstawionych wyników. Pięcioletnia obserwacja chorych wykazała niespodziewanie wysoki odsetek przeżyć na poziomie 78%.

Tym samym pośrednio wykazano wysoką skuteczność radiochemioterapii, pod warunkiem podania pełnej dawki radioterapii i chemioterapii. Duża dysproporcja liczebności podgrupy zmarłych chorych i przeżywających okres obserwacji nie pozwoliła jednak na rzetelną ocenę wartości prognostycznej padanych czynników.

## **6.1 Ocena znaczenia hipoksji w odpowiedzi na radiochemioterapię**

Hipoksja jest od lat dobrze udokumentowanym czynnikiem oporności komórek nowotworowych na radioterapię. Pomimo szeregu przeprowadzonych badań, nie udało się jednak określić optymalnego sposobu jej pomiaru.

Jedną z najstarszych metod jest pomiar ciśnienia parcjalnego tlenu przy użyciu elektrody Eppendorfa. Jest to elektroda polarograficzna rejestrująca wielkość prądu dyfuzyjnego, którego wartość jest proporcjonalna do ciśnienia parcjalnego tlenu. W badaniu Höckela i wsp. (44) analizowano 103 chore z rakiem szyjki macicy w stopniu IB do IV według FIGO, u których przeprowadzono leczenie operacyjne lub radykalną radioterapię. Badanie charakteryzuje zatem stosunkowo duża heterogenność grupy pod względem zaawansowania klinicznego i sposobu leczenia. Pooperacyjne badanie histopatologiczne wykazało większą częstość nacieku przymacicz i inwazji naczyń przez komórki nowotworowe w grupie chorych, u których ciśnienie parcjalne tlenu wynosiło poniżej 10mmHg. Ponadto analiza całej badanej grupy wykazała istotne statystycznie różnice w przeżyciach całkowitych i przeżyciach wolnych od choroby na korzyść chorych, u których ciśnienie parcjalne tlenu wynosiło powyżej 10mmHg. Jednocześnie w podgrupie poddanej radykalnej radioterapii istotność statystyczną osiągnięto jedynie w odniesieniu do przeżyć wolnych od choroby. Analogiczne badania przeprowadzono także w odniesieniu do chorych na raka płaskonabłonkowego głowy i szyi, których biologia jest zbliżona do raka szyjki macicy. Badanie Nordsmarka i wsp. (45) dotyczyło 397 chorych (z 7 ośrodków) na miejscowo zaawansowanego raka głowy i szyi poddanych radioterapii samodzielnej, radiochemioterapii radykalnej oraz radioterapii uzupełniającej po leczeniu operacyjnym. Analiza całej badanej grupy wykazała, że podgrupa chorych u których ciśnienie parcjalne

tlenu wynosiło poniżej 2,5mmHg rokowała gorzej w zakresie przeżycia całkowitego. Również to badanie charakteryzuje jednak duża heterogenność grupy. Pomiar nasilenia hipoksji przy użyciu elektrody Eppendorfa ograniczony jest inwazyjnością metody, możliwością pomiaru jedynie w płytko położonych nowotworach oraz brakiem możliwości rozróżnienia tkanek hipoksycznych od nekrotycznych. Stąd metoda ta nie znalazła powszechnego zastosowania w praktyce klinicznej.

Z kolei ocena poziomu unaczynienia guza pozwala uzyskać pośrednią informację o utlenowaniu komórek nowotworu. Oceny takiej dokonuje się w trakcie badania mikroskopowego wycinka pobranego z guza. Analiza taka była przedmiotem badania Gasińskiej i wsp. (46), w którym oceniano średnią liczbę naczyń przypadającą na 1 mm<sup>2</sup> preparatu utrwalonego w formalinie. Wspomniane badanie obejmowało 152 chore z rakiem szyjki macicy w stopniu IB - IIIB wg FIGO, które były leczone radioterapią. Autorzy opracowania wykazali, że średnia ilość naczyń większa niż 190/mm<sup>2</sup> była pozytywnym czynnikiem rokowniczym w zakresie przeżyć ogólnych. Analiza podgrup wskazała jednak, że parametr ten odgrywa istotne znaczenie jedynie u chorych z podtypem raka rogowaciejącego. Jednocześnie badanie obejmowało dość zróżnicowaną grupę chorych pod względem zaawansowania klinicznego.

Wspomniane powyżej badanie Gasińskiej i wsp. (46) zwróciło uwagę na fakt, że parametrem pośrednio odpowiadającym za poziom hipoksji w guzie może być stężenie hemoglobiny we krwi obwodowej. W analizie przeżyć ogólnych wykazano bowiem, że poziom hemoglobiny powyżej 116 g/l jest pozytywnym czynnikiem rokowniczym. Przeprowadzona analiza podgrup wykazała jednak brak istotności statystycznej u chorych z rakiem rogowaciejącym. Wyniki istotne statystycznie osiągnięto natomiast w podgrupie z rakiem nierogowaciejącym.

W prezentowanej rozprawie, autor także poddał analizie znaczenie wpływu poziomu hemoglobiny oznaczonej przed rozpoczęciem leczenia na odpowiedź na skojarzoną radiochemioterapię. Analiza statystyczna nie wykazała istotności. W porównaniu do badania Gasińskiej i wsp., badana grupa charakteryzowała się znacznie większą homogennością w odniesieniu do wyjściowego zaawansowania i przeprowadzonego leczenia, kosztem znacznie

mniejszej liczebności grupy. Jednocześnie kryteria wyłączenia nie dopuszczały do badania chorych z niedokrwistością uniemożliwiającą podanie Cisplatyny (poziom poniżej 6 mmol/L). Także chore, u których wystąpiła anemia po podaniu pierwszego lub drugiego kursu chemioterapii były wykluczone z ostatecznej analizy, tak by wiarygodnie określić wpływ stężenia hemoglobiny i innych ocenianych czynników w grupie chorych poddanych pełnej radiochemioterapii (minimum 3 kursy Cisplatyny 40mg/m<sup>2</sup>). W efekcie względnie wysoki poziom hemoglobiny (powyżej 7 mmol/L) zaobserwowano u 25 chorych, co stanowiło blisko 90% badanej grupy. Podkreślić należy także fakt, że głównym punktem końcowym badania była wczesna odpowiedź na leczenie oceniona według kryteriów RECIST. Stąd uzyskane wyniki mogą być odmienne od cytowanych powyżej.

Rozwój i upowszechnienie metod immunohistochemii umożliwił ocenę utlenowania guza poprzez oznaczenie ekspresji białek indukowanych hipoksją. Jako najczęstsze biomarkery hipoksji podaje się: czynnik indukowany hipoksją 1 (hypoxia-inducible factor 1, HIF-1), czynnik wzrostu śródbłonna naczyniowego (vascular endothelial growth factor, VEGF), transporter glukozy 1 (glucose transporter 1, GLUT1) oraz anhidrazę węglanową IX (carbonic anhydrase IX, CAIX). Białko HIF-1 jest heterodimerem składającym się z podjednostki  $\alpha$  i  $\beta$ . W warunkach normoksji podjednostka HIF-1 $\alpha$  podlega szybkiemu rozkładowi przy udziale białka pVHL (białko von Hippel-Lindaua). Degradacja ta jest jednak wstrzymywana w warunkach hipoksji prowadząc do akumulacji białka w komórkach. Znaczenie tego białka jako markera oporności na radioterapię chorych na raka szyjki macicy jest jednak kontrowersyjne. Burri i wsp. (47) w analizie 78 chorych poddanych radioterapii wykazali, że wysoka ekspresja białka HIF-1 $\alpha$  jest niezależnym negatywnym czynnikiem rokowniczym w zakresie przeżycia całkowitego. Z kolei Hutchison i wsp. (48) w badaniu obejmującym 99 chorych z rakiem szyjki macicy w zaawansowaniu IB do IVB według FIGO, leczonych radykalną radioterapią, stwierdzili brak istotnej statystycznie zależności pomiędzy ekspresją białka HIF-1 a przeżyciem wolnym od choroby, przeżyciem wolnym od przerzutów i przeżyciem wolnym od wznowy miejscowej. Podobny brak znaczenia prognostycznego ekspresji białka HIF-1 potwierdzony został w badaniu Mayera i wsp. (49). Autorzy tej analizy wykazali jednocześnie brak związku pomiędzy ekspresją HIF-1 a pomiarem ciśnienia parcjalnego tlenu przy użyciu elektrody Eppendorfa. Tym samym uznali, że białko HIF-1 nie

powinno być wewnątrzkomórkowym markerem hipoksji w komórkach raka szyjki macicy. W obliczu tych doniesień, jednym z najbardziej obiecujących markerów hipoksji w raku szyjki macicy stało się białko CAIX, które katalizuje reakcję powstania jonu wodorowęglanowego z wody i dwutlenku węgla, tym samym odgrywając ważną rolę w regulacji pH. Jego nadekspresja jest indukowana hipokszą w szeregu różnych typów komórek (50). Loncaster i wsp. wykazali istotny związek pomiędzy niskim ciśnieniem parcjalnym tlenu zmierzonym za pomocą elektrody Eppendorfa a ekspresją białka CAIX (51). Opierając się na analizie retrospektywnej 130 chorych z rakiem szyjki macicy w stopniu IB do IVA autorzy potwierdzili także rolę białka CAIX jako negatywnego czynnika prognostycznego w odniesieniu do takich punktów końcowych, jak przeżycie wolne od choroby i przeżycie wolne od przerzutów, ale nie dla przeżycia wolnego od wznowy miejscowej. Z kolei Hedley i wsp. (52) w prospektywnym badaniu obejmującym 110 chorych z rakiem szyjki macicy w stopniu IB - IIIB według FIGO, leczonych radykalną radioterapią lub radiochemioterapią, nie wykazali istotnej zależności pomiędzy ekspresją CAIX a czasem wolnym od choroby w okresie 3-letnie obserwacji. Co ciekawe, autorzy tego opracowania dokonali dodatkowego porównania pomiędzy pomiarem wykonanym za pomocą elektrody Eppendorfa a ekspresją CAIX nie wykazując zależności statystycznej. Analiza statystyczna badania Hedleya i wsp. potwierdziła jednak silną zależność pomiędzy ciśnieniem parcjalnym tlenu (zmierzonym elektrodą polarograficzną) a przeżyciem wolnym od choroby. Badanie charakteryzowała stosunkowo duża różnorodność grupy pod względem zaawansowania choroby i przeprowadzonego leczenia (w analizie ujęto zarówno chore poddane samodzielnej radioterapii, jak i radiochemioterapii).

Autor niniejszej rozprawy poddał analizie wpływ ekspresji białka CAIX na odpowiedź na leczenie, oceniając jednak jednorodną pod względem zaawansowania i leczenia grupę chorych. Dodatkowo uwzględnione zostały trzy różne metody oceny reakcji immunohistochemicznej (jakościowa, ilościowa i półilościowa). Analiza statystyczna nie potwierdziła wartości oznaczenia białka CAIX jako czynnika predykcyjnego wczesnej odpowiedzi na skojarzoną radiochemioterapię oraz jako czynnika prognostycznego przeżycia pięcioletniego. Przyczyny takich wyników upatrywać można w fakcie, że immunohistochemiczna ocena CAIX nie dostarcza informacji o nasileniu hipoksji ostrej,

która z punktu widzenia oporności na radioterapię ma istotniejsze znaczenie. Dla utrwalenia uszkodzeń DNA wywołanych promieniowaniem tlen musi być bowiem obecny w chwili napromieniania lub w czasie do 5ms (24). Ponadto badana grupa była dość homogenna pod względem ekspresji CAIX - u 17 chorych, co stanowi blisko 60% badanej grupy, odsetek wybarwionych komórek nie przekraczał 10%, zaś u 26 chorych (92,8%) nie przekraczał 30%. Podobnie jak w przypadku stężenia hemoglobiny, także stopień ekspresji CAIX może wynikać z zastosowanych wąskich kryteriów kwalifikacji do badania, które obejmowały głównie chore w dobrym stanie ogólnym. Wielu autorów podkreśla także dużą rolę heterogenności różnych obszarów guza pod względem utleniania. W cytowanym powyżej badaniu Hedleya i wsp. (52) u 9 chorych wykonano biopsję z 3 różnych obszarów guza uzyskując w ponad 40% rozbieżne wyniki reakcji immunohistochemicznej z CAIX. Stąd wynikać może brak zależności pomiędzy oznaczeniami immunohistochemicznymi endogennych markerów hipoksji a kontrolą miejscową procesu nowotworowego w wyselekcjonowanej grupie chorych poddanych pełnej radiochemioterapii.

Obecnie duże nadzieje pokłada się w obrazowaniu obszarów hipoksji przy użyciu badania pozytonowej tomografii emisyjnej (PET). Analiza taka dotycząca chorych na raka szyjki macicy była przedmiotem badania Dehdashtiego i wsp. (53), w którym autorzy wykonali u 38 chorych przed planowaną radioterapią lub radiochemioterapią badanie PET, wykorzystując jako znacznik  $^{60}\text{CuATSM}$ . Jest to radiofarmaceutyk gromadzący się specyficznie w komórka hipoksycznych. W badaniu tym stwierdzono, że wysoki wychwyt  $^{60}\text{CuATSM}$  w guzie jest negatywnym czynnikiem rokowniczym w odniesieniu do przeżycia wolnego od progresji. Jednocześnie autorzy wykazali brak korelacji wychwytu  $^{60}\text{CuATSM}$  z wychwytem  $^{18}\text{F-FDG}$  stosowanym w rutynowym badaniu PET. Obrazowanie obszarów hipoksji w badaniu PET stwarza w przyszłości potencjalną możliwość precyzyjnej eskalacji dawki promieniowania w obszarach hipoksycznych przy użyciu nowoczesnych technik planowania i realizacji radioterapii (intensywna modulacja dawki - IMRT, techniki łukowe - VMAT oraz techniki spiralne - Tomoterapia). O celowości takiej strategii terapeutycznej może świadczyć fakt, że przeprowadzona przez autora rozprawy analiza niepowodzeń leczenia wykazała, iż najczęściej dochodzi do wznowy miejscowej.

## 6.2 Ocena znaczenia ekspresji ERCC1 w odpowiedzi na radiochemioterapię

Białko ERCC1 jest jednym z zasadniczych elementów biorących udział w naprawie uszkodzeń DNA na drodze wycinania nukleotydu (nucleotide-excision repair, NER). Razem z białkiem xeroderma pigmentosum (XPF) tworzy heterodimer o właściwościach endonukleazy wycinającej uszkodzony fragment DNA (54,55). Ponieważ naprawa DNA na drodze wycinania nukleotydu jest głównym mechanizmem usuwania uszkodzeń powstałych na skutek działania pochodnych platyny, podjęto szereg badań oceniających wartość predykcyjną ekspresji ERCC1 w odniesieniu do nowotworów leczonych tymi cytostatykami. Wykazały one, że niski poziom ekspresji ERCC1 jest związany z lepszą odpowiedzią na chemioterapię pochodnymi platyny w takich nowotworach jak: niedrobnokomórkowy rak płuca (56), rak jajnika (57), rak żołądka (58), rak jelita grubego (59) i rak przełyku (60). Ponadto wykazano związek polimorfizmu genu ERCC1 i odpowiedzi na radioterapię w grupie chorych na wczesnego raka płaskonabłonkowego okolicy głowy i szyi, pośrednio wykazując tym samym jego rolę w naprawie uszkodzeń popromiennych (61). Istotną statystycznie zależność pomiędzy ekspresją białka ERCC1 (ocenioną immunohistochemicznie) a czasem wolnym od choroby w odniesieniu do chorych poddanych radiochemioterapii z powodu raka głowy i szyi potwierdziło badanie Jun i wsp. (62). Jednakże rola ekspresji ERCC1 jako czynnika predykcyjnego odpowiedzi na skojarzoną radiochemioterapię w raku szyjki macicy pozostaje dyskusyjna. Jednym z pierwszych badań poruszających tę kwestię było opracowanie Brittena i wsp. (63), którzy analizie *in vitro* poddali 15 linii komórkowych, w których oznaczono zarówno ekspresję białka ERCC1, jak i mRNA. Autorzy wykazali istotną statystycznie zależność pomiędzy wysokim poziomem ekspresji genu ERCC1 a opornością na cisplatynę, przy jednoczesnym braku związku pomiędzy poziomem ekspresji białka ERCC1 a wrażliwością na cisplatynę. Nie stwierdzono także korelacji pomiędzy poziomem ekspresji genu i białka ERCC1. Z kolei badanie Bai i wsp. (64) oceniało bezpośrednią zależność pomiędzy ekspresją genu ERCC1, określoną za pomocą reakcji łańcuchowej z odwrotną transkryptazą (reverse transcriptase polymerase chain reaction, RT-PCR), a odpowiedzią na leczenie ocenioną według kryteriów RECIST. Badanie to miało charakter prospektywny i obejmowało 60 chorych z rakiem szyjki macicy w stopniu II i III według FIGO, leczonych radykalną radiochemioterapią. Autorzy wykazali, że niski

poziom ekspresji ERCC1 mRNA jest związany z istotnie statystycznie większym odsetkiem całkowitych odpowiedzi na leczenie. Natomiast badanie Doll i wsp. (65) poddało ocenie korelację pomiędzy ekspresją ERCC1 mRNA (ocenioną w RT-PCR) a ekspresją białka (ocenioną immunohistochemicznie). Jednocześnie autorzy retrospektywnie ocenili wpływ obu czynników na przeżycia chorych z rakiem szyjki macicy po radykalnej radioterapii. Analiza wyników wykazała, że niska ekspresja ERCC1 mRNA była związana z gorszymi przeżyciami ogólnymi i przeżyciami wolnymi od choroby, co stoi w opozycji do wyników uzyskanych przez Bai i wsp. Ponadto Doll i wsp. wskazali, że niski poziom ekspresji białka ERCC1 był także związany z gorszym rokowaniem w zakresie przeżyć całkowitych i wolnych od choroby. Warto jednak podkreślić, że wyniki dotyczyły chorych poddanych samodzielnej radioterapii, bez jednoczasowego leczenia Cisplatiną. Kilka lat później ci sami autorzy (66) przedstawili analogiczną analizę u chorych poddanych jednoczasowej radiochemioterapii. Badanie to objęło grupę aż 264 pacjentek z trzech ośrodków kanadyjskich i dotyczyło głównie chorych z zaawansowaniem w stopniu II według FIGO. Tym razem nie wykazano jednoznacznego związku pomiędzy statusem ERCC1 a wynikami leczenia.

W świetle przedstawionych powyżej badań, autor prezentowanej rozprawy także podjął próbę określenia wartości predykcyjnej oznaczenia statusu ERCC1 w grupie chorych poddanych jednoczasowej radiochemioterapii. Analiza zebranego materiału wykazała, że stopień ekspresji białka ERCC1, oceniony metodami immunohistochemii, nie był związany z wczesną odpowiedzią na zastosowane leczenie ani przeżyciami pięcioletnimi. Uzyskane wyniki były zatem zbieżne z cytowanym powyżej badaniem Doll i wsp. Ocenie poddano zarówno wyniki w skali ilościowej, jakościowej jak i półilościowej, które dotychczas nie były badane u chorych z rakiem szyjki macicy. Badana grupa okazała się jednak dość homogenna pod względem ekspresji ERCC1 - aż u 22 chorych (78%) stwierdzono reakcję w >80% komórek biopsji. W przeprowadzonym badaniu nie oceniano natomiast ekspresji mRNA techniką RT-PCR, ponieważ stale jest to badanie stosunkowo kosztowne i trudno dostępne, co przekłada się na ograniczoną jego wartość w codziennej praktyce klinicznej.

### 6.3 Ocena znaczenia ekspresji PARP w odpowiedzi na radiochemioterapię

Mianem PARP określana jest cała rodzina białek, które charakteryzują się obecnością domeny katalitycznej odpowiedzialnej za przeprowadzenie reakcji poli(ADP-rybozyl)acji (67). Aktywność enzymatyczną wykazano jednak tylko u 6 z kilkunastu polimeraz PARP, z czego największą charakteryzuje się PARP-1 i PARP-2 (68). Co więcej, badanie Amé i wsp. wykazało, że to PARP-1 jest odpowiedzialne za najważniejsze funkcje komórkowe przypisywane całej rodzinie (69). Do funkcji tych należy przede wszystkim udział w rozpoznawaniu uszkodzeń DNA, głównie jednoniciowych, a następnie aktywacja kolejnych białek naprawy. Większość doniesień wskazuje na współpracę przede wszystkim z enzymami systemu naprawy przez wycinanie zasad. Rola PARP-1 w tym systemie jest na tyle duża, że zahamowanie funkcji tego białka prawie całkowicie uniemożliwia naprawę na drodze wycinania zasad (70). Z kolei badania oceniające skuteczność inhibitorów PARP (przede wszystkim trzeciej generacji) w terapii przeciwnowotworowej wykazały dość selektywną ich skuteczność, ograniczoną głównie do nowotworów z uszkodzonymi szlakami naprawy pęknięć dwuniciowych na drodze rekombinacji homologicznej. Wykazano ok 50 - 1 000 razy większą skuteczność inhibitorów PARP w stosunku do komórek z mutacjami BRCA1 i BRCA2 (71) ATM, RAD51, NBS1, ATR (72). Ostatnie badania wykazały ponadto wysoką skuteczność inhibitorów PARP w nowotworach z mutacjami genów szlaku anemii Fanconiego (FANCA, FANCC, FANCD2) (72), który jest jednym z głównych mechanizmów naprawy wiązań krzyżowych powstałych na skutek działania m.in. Cisplatyny. Wy tłumaczeniem mechanizmu skuteczności inhibitorów PARP-1 może być teoria "sprzężonej letalności" (synthetic lethality), zaproponowana przez Kaelin (73). Zakłada ona, że zahamowanie aktywności enzymatycznej PARP-1 prowadzi do nagromadzenia pęknięć jednoniciowych. W trakcie replikacji, gdy polimeraza trafia na przerwę na jednej z nici, dochodzi do pęknięcia drugiej nici, w wyniku czego powstaje pęknięcie dwuniciowe. W komórkach z uszkodzonym szlakiem rekombinacji homologicznej, pęknięcia te nie mogą być naprawione, co skutkuje fragmentacją DNA i śmiercią komórki przez apoptozę. Dotychczas najlepiej udokumentowane w literaturze jest zastosowanie inhibitorów PARP u chorych na raka piersi, zwłaszcza z mutacją w genie BRCA1 lub BRCA2. Uwzględniając jednak przytoczone powyżej badania in vitro wskazujące na potencjalnie wysoką skuteczność tej

terapii w przypadku defektu pozostałych białek szlaku rekombinacji homologicznej, należy spodziewać się w przyszłości rozszerzenia badań klinicznych o kolejne nowotwory. Prawie całkowity brak ekspresji ATM, ATR i RAD51 wykazano bowiem u ponad 50% chorych na płaskonabłonkowego raka głowy i szyi (74), znacznie obniżoną ekspresję RAD51 u blisko 30% chorych z rakiem piersi (75), zaburzenie ekspresji BRCA1 i 2, RAD51C, ATM i ATR u blisko 50% chorych z rakiem surowiczym jajnika (76). Z kolei zaburzenia szlaku anemii Fanconiego wykazano aż u około 30% chorych na raka szyjki macicy (77). Z punktu widzenia terapii spersonalizowanej najważniejsze jest jednak wyselekcjonowanie chorych, którzy odniosą z tego leczenia największy zysk. W przypadku inhibitorów PARP konieczna jest zatem ocena mutacji genów rekombinacji homologicznej. Obecnie możliwe jest określenie sprawności tego szlaku poprzez badania na macierzach, a także immunofluorescencyjne oznaczanie  $\gamma$ H2AX i RAD51 (78). Są to jednak oznaczenia stale niedostępne w codziennej praktyce klinicznej. Wstępne badania obejmujące chore z rakiem piersi wykazały natomiast, że potencjalnym markerem wrażliwości na terapię inhibitorami PARP może być także immunohistochemiczna ocena ekspresji jądrowego PARP-1 (79). Ponadto udowodniono, że wysoka ekspresja PARP-1 jest niekorzystnym czynnikiem rokowniczym w odniesieniu do przeżycia całkowitego i wolnego od choroby u chorych na raka piersi (80).

Ponieważ, jak przytoczono wcześniej, u 30% chorych na raka szyjki macicy występuje zaburzenie szlaku anemii Fanconiego (77), a zatem istnieje potencjalny zysk z zastosowania inhibitorów PARP, autor niniejszej rozprawy poddał ocenie ekspresję białka PARP-1 u chorych na raka szyjki macicy poddanych radykalnej radiochemioterapii. Analiza statystyczna nie wykazała jednak zależności pomiędzy odpowiedzią na leczenie a wynikiem reakcji immunohistochemicznej ocenionej zarówno w skali ilościowej, jakościowej i półilościowej. Ogólnie w całej badanej grupie stwierdzono wysoką ekspresję PARP-1 - u 24 chorych (85,7%) wykazano reakcję w >70% komórek, z czego intensywność reakcji w tej podgrupie była średnia lub wysoka. Zatem na podstawie przeprowadzonego badania można wnioskować, że u chorych z rakiem szyjki macicy w stopniu IIB i IIIB ekspresja białka PARP-1 jest wysoka, co świadczyć może o dużej sprawności mechanizmu naprawy DNA na drodze wycinania zasad. Ponieważ pod wieloma względami biologia raka szyjki macicy jest zbliżona do płaskonabłonkowego raka głowy i szyi, w którym wykazano wysoką częstość

zaburzenia ekspresji genów ATM, ATR i RAD51, celowe wydaje się zaplanowanie kolejnych badań oceniających ekspresję genów szlaku rekombinacji homologicznej u chorych na miejscowo zaawansowanego raka szyjki macicy.

## 6.4 Podsumowanie

Dyskutowana powyżej ocena nasilenia hipoksji i ekspresji czynników związanych z naprawą uszkodzeń popromiennych i wywołanych Cisplatyną nadal nie pozwala określić wiarygodnych czynników predykcyjnych odpowiedzi na skojarzoną radiochemioterapię. Większość cytowanych wyników badań jest rozbieżna, co wynika głównie z niejednorodności badanych grup chorych. Przeprowadzone badanie nie potwierdziło jednak wartości predykcyjnej oceny stężenia hemoglobiny, ekspresji białka CAIX, ERCC1 i PARP w wąskiej i homogennej grupie chorych poddanych pełnemu leczeniu skojarzonemu. Jednocześnie w badaniu tym uzyskano stosunkowo wysokie przeżycia 5 - letnie, co świadczy o skuteczności dotychczasowego leczenia, pod warunkiem podania optymalnej dawki radioterapii i chemioterapii. Tym samym jedynymi czynnikami mającymi znaczenie w leczeniu miejscowo zaawansowanego raka szyjki macicy pozostaje nadal stopień zaawansowania procesu nowotworowego, pierwotna wielkość guza i obecność przerzutów do węzłów chłonnych (28). Brak molekularnych czynników predykcyjnych związanych z prowadzonym leczeniem systemowym w tej grupie chorych skłania do zadania pytania o znaczenie chemioterapii w dobie wysoce konformalnych technik radioterapii. Dotychczasowe badania oceniające wartość eskalacji dawki prowadzone były bowiem w oparciu o planowanie w technice 3D (43). Obecny rozwój technik intensywnej modulacji wiązki (IMRT), technik łukowych (VMAT) oraz spiralnych (Tomoterapia) w połączeniu z technikami radioterapii sterowanej obrazem (IGRT) pozwala w wysoce precyzyjny sposób podać znacznie wyższą dawkę promieniowania na obszar tarczowy przy zachowaniu porównywalnej, co techniki 3D, dawki w sąsiednich narządach krytycznych (81). Ponadto techniki te pozwalają na jednoczesne dopromienienie wyższą dawką frakcyjną (SIB) obszarów hipoksji zobrazowanych w badaniu PET. Jednoczesne zastosowanie brachyterapii z planowaniem w oparciu o obraz rezonansu magnetycznego (a nie arbitralnie przyjętych punktów A i B) stwarza jeszcze większe szanse

bezpiecznej eskalacji dawki (82). Co więcej są to techniki szeroko dostępne w większości ośrodków onkologicznych. Tym samym przyszłość leczenia miejscowo zaawansowanego raka szyjki macicy można upatrywać w spersonalizowanej, wysoce konformalnej radioterapii, w której rola skojarzonego leczenia systemowego prawdopodobnie będzie stopniowo ograniczana.

## 7 Wnioski

Analizowana grupa chorych na zaawansowanego raka szyjki macicy (w stopniu IIB - IIIB), otrzymująca radiochemioterapię, charakteryzowała się w 82% prawidłowym poziomem hemoglobiny we krwi obwodowej oraz niską ekspresją białka CAIX, co wskazuje na ograniczoną hipoksję w komórkach raka płaskonabłonkowego.

Wynikające z analizy wartości hemoglobiny we krwi obwodowej i stopień ekspresji białka CAIX nie mają wartości predykcyjnej na wczesną odpowiedź na leczenie jak i prognostycznej na pięcioletnie przeżycia całkowite.

U chorych na zaawansowanego raka szyjki macicy stwierdza się wysoką ekspresję białka ERCC1 (związanego z chemioopornością) w komórkach nowotworowych. Stopień tej ekspresji nie ma jednak znaczenia predykcyjnego i prognostycznego w radiochemioterapii tych chorych.

W badanej grupie chorych stwierdza się wysoką ekspresję białka PARP1 (związanego z chemioopornością) w komórkach raka szyjki macicy. Z analizy ekspresji tego białka oraz odpowiedzi chorych na radiochemioterapię i przeżycia pięcioletnie wynika brak możliwości uznania go za czynnik predykcyjny bądź prognostyczny.

## 8 Streszczenie

### Wstęp

Rak szyjki macicy stanowi nadal istotny problem terapeutyczny. Pod względem epidemiologicznym Polska nie odbiega znacząco od średniej europejskiej w zakresie zachorowań. Jednocześnie, te same dane epidemiologiczne wskazują na około 70% wyższą umieralność w naszym kraju. Na tę sytuację największy wpływ ma fakt, że u zdecydowanej większości chorych nowotwór rozpoznawany jest w zaawansowanym stadium (stopnie IIB i wyższe wg FIGO). Jednym z najistotniejszych problemów terapeutycznych w raku szyjki macicy jest duże zróżnicowanie odpowiedzi na leczenie. Dotychczas nie udało się określić wiarygodnych czynników predykcyjnych, które pozwoliłyby na personalizację leczenia onkologicznego. Przyczyny oporności na leczenie upatruje się głównie w hipoksji komórek nowotworowych jak i zaburzeniu ekspresji białek naprawy DNA.

### Cel badania

Celem pracy jest ocena nasilenia hipoksji i ekspresji białek związanych z chemioopornością jako potencjalnych czynników predykcyjnych i prognostycznych u chorych z miejscowo zaawansowanym rakiem szyjki macicy w stopniu IIB - IIIB poddanych radykalnej radiochemioterapii. Wyznaczono następujące cele szczegółowe:

- ocenę stężenia hemoglobiny we krwi obwodowej przed radiochemioterapią oraz ekspresji białka CAIX w materiale biopsyjnym oraz ich korelacja z wczesną odpowiedzią na leczenie i przeżyciem pięcioletnim
- ocenę ekspresji białka ERCC1 w materiale biopsyjnym oraz jego korelacja z odpowiedzią na leczenie i przeżyciem pięcioletnim
- ocenę ekspresji białka PARP-1 w materiale biopsyjnym oraz jego korelacja z odpowiedzią na leczenie i przeżyciem pięcioletnim

## **Material i metodyka**

Realizacji powyższych celów dokonano na podstawie prospektywnej analizy chorych z rakiem szyjki macicy w stopniu FIGO IIB - IIIB leczonych radykalną radiochemioterapią. Rekrutację do badania prowadzono w latach 2009 - 2010 i objęto nią wyłącznie chore z rozpoznaniem raka płaskonabłonkowego, od których przed rozpoczęciem leczenia pobrano wycinek z guza celem oceny immunohistochemicznej ekspresji białek CAIX, ERCC1 i PARP. Wszystkie chore otrzymać miały pełną teleradioterapię techniką konformalną 3D do dawki całkowitej 50,4Gy (dawka frakcyjna 1,8Gy). Teleradioterapia kojarzona była z brachyterapią śródjamową - u wszystkich chorych zaplanowano 4 frakcje po 7Gy specyfikowane na punkt A. Jednocześnie w trakcie radioterapii podawano Cisplatinę w dawce 40mg/m<sup>2</sup> podawaną co 7 dni. Z badania wykluczono chore, które z uwagi na toksyczność leczenia otrzymały niepełną dawkę radioterapii lub mniej niż 3 kursy Cisplatiny. Oceny wczesnej odpowiedzi na leczenie dokonano na podstawie tomografii komputerowej wykonanej w okresie 4 - 6 tygodni od zakończonej radiochemioterapii posługując się kryteriami RECIST. Następnie prowadzono systematyczną kontrolę kliniczną chorych, która pozwoliła określić przeżycia pięcioletnie w badanej grupie.

## **Wyniki**

Do badania zakwalifikowano ostatecznie 28 chorych w wieku od 39 do 68 roku życia (średnia 54,9 lat) z rakiem szyjki macicy w stopniu IIB (32,2%) i IIIB (67,8%) według FIGO. Wszystkie chore otrzymały pełną tele- i brachyterapię. Zaplanowanych 6 kursów Cisplatiny otrzymało 5 chorych (17,8%), u pozostałych 8 chorych (28,6%) podano 5 kursów, tyle samo chorych otrzymało 4 kursy, zaś 7 chorych (25%) jedynie 3 kursy chemioterapii. Całkowitą odpowiedź na leczenie (CR) zaobserwowano u 6 chorych (21,4%), odpowiedź częściową (PR) u 11 chorych (39,3%), stabilizację choroby (SD) u 10 chorych (35,3%), zaś progresję (PD) u 1 chorej (3,6%). Z uwagi na stosunkowo małą liczebność badanej grupy, dla celów statystycznych dokonano podziału na dwie podgrupy. W pierwszej znalazły się chore, u których stwierdzono odpowiedź na leczenie (CR i PR), zaś w drugiej podgrupie chore nie odpowiadające na leczenie (SD lub PD). Z kolei analizy przeżyć dokonano na grupie 26 chorych, wśród których 18 (69,3%) przeżyło okres 5 lat.

Średnie stężenie hemoglobiny w podgrupie odpowiadającej na leczenie wynosiło 8,0 mmol/L (mediana 8,38 mmol/L), zaś w podgrupie, w której nie stwierdzono odpowiedzi 8,48 mmol/L (mediana 8,50 mmol/L). Analiza statystyczna nie wykazała istotnych różnic ( $p=0,230$ ). Mediana intensywności reakcji immunohistochemicznej z p/ciałem anti-CAIX w obu badanych podgrupach była identyczna i wynosiła 2 ( $p=0,264$ ). Także mediana odsetka wybarwionych komórek w tej reakcji była taka sama i wynosiła 5% ( $p=0,586$ ). Z kolei mediana intensywności reakcji z p/ciałem anti-ERCC1 w obu podgrupach wynosiła 2 ( $p=0,294$ ), zaś mediana odsetka wybarwionych komórek 90% i 95% odpowiednio dla podgrupy odpowiadającej na leczenie i nieodpowiadającej ( $p=0,475$ ). Ocena reakcji z p/ciałem anti-PARP-1 także nie wykazała różnic pomiędzy oboma analizowanymi podgrupami - mediana intensywności reakcji wynosiła 2 ( $p=0,402$ ), a odsetka wybarwionych komórek 99% ( $p=0,515$ ).

Wśród chorych, które przeżyły 5 lat, średnie stężenie hemoglobiny wyniosło 8,36mmol/L i było zbliżone do podgrupy zmarłych chorych (8,23mmol/L). Mediana intensywności reakcji z anti-CAIX w obu podgrupach była identyczna i wyniosła 2, zaś mediana odsetka wybarwionych komórek wyniosła odpowiednio 7,5% i 5%. Z kolei mediana oceny jakościowej reakcji z anti-ERCC1 u chorych osiągających 5 letnie przeżycia wyniosła 2, zaś w drugiej podgrupie 3. Jednocześnie mediany odsetka wybarwionych komórek wyniosły odpowiednio 90% i 95%. Ocena reakcji z p/ciałem anti-PARP1 wykazała, że mediana intensywności reakcji wyniosła 3 u chorych, które przeżyły 5 lat i 2 u zmarłych. Natomiast mediana wyniku oceny ilościowej wyniosła odpowiednio 25,54% i 80%.

### **Wnioski**

Analizowana grupa chorych na zaawansowanego raka szyjki macicy (w stopniu IIB - IIIB), otrzymująca radiochemioterapię, charakteryzowała się w 82% prawidłowym poziomem hemoglobiny we krwi obwodowej oraz niską ekspresją białka CAIX, co wskazuje na ograniczoną hipoksję w komórkach raka płaskonabłonkowego.

Wynikające z analizy wartości hemoglobiny we krwi obwodowej i stopień ekspresji białka CAIX nie mają wartości predykcyjnej na wczesną odpowiedź na leczenie jak i prognostycznej na pięcioletnie przeżycia całkowite.

U chorych na zaawansowanego raka szyjki macicy stwierdza się wysoką ekspresję białka ERCC1 (związanego z chemioopornością) w komórkach nowotworowych. Stopień tej ekspresji nie ma jednak znaczenia predykcyjnego i prognostycznego w radiochemioterapii tych chorych.

W badanej grupie chorych stwierdza się wysoką ekspresję białka PARP1 (związanego z chemioopornością) w komórkach raka szyjki macicy. Z analizy ekspresji tego białka oraz odpowiedzi chorych na radiochemioterapię i przeżycia pięcioletnie wynika brak możliwości uznania go za czynnik predykcyjny bądź prognostyczny.

## **9 Summary**

### **Introduction**

Cervical cancer has become a serious ological problem. While Poland does not stand out against the rest of the EU in terms of incidence (about 15% higher in 2009), the differences in mortality rate are quite significant. It is estimated that the mortality rate in Poland is higher by 70% than the rest of the EU. This epidemiological situation is mainly due to the fact that in most patients the cancer is diagnosed at an advanced stage (IIB and higher at FIGO scale). One of the main therapeutic problems in the advanced cervical cancer is high diversity of the response to therapy in patients at the same stage and with comparable prognostic factors. Reasons for resistance to therapy are mainly associated with the hypoxia of the neoplastic cells and abnormalities in the expression of DNA repair proteins.

### **Aim of the study**

The aim of the study is to evaluate the intensity of hypoxia and expression of proteins associated with chemoresistance as potential predictive and prognostic factors in patients with locally advanced cervical cancer in stage IIB to IIIB treated with radical chemoradiotherapy. The following specific objectives have been defined:

- the evaluation of hemoglobin level in the peripheral blood before the treatment and CAIX expression in biopsied material and their correlation with early response to therapy and 5 year overall survival
- the evaluation of ERCC1 expression in biopsied material and its correlation with early response to therapy and 5 year overall survival
- the evaluation of PARP-1 expression in biopsied material and its correlation with early response to therapy and 5 year overall survival

### **Materials and methods**

The abovementioned aims were achieved based on a prospective analysis of patients with cervical cancer in FIGO stage IIB to IIIB treated with radical chemoradiotherapy. Participants of the study were recruited in 2009-2010 and included only patients with

diagnosed squamous cell carcinoma. Prior to implementing the treatment a sample of tumor was collected for immunohistochemical determination of the CAIX, ERCC1 and PARP expression. All patients were to receive 3D conformal teleradiotherapy (4-field box technique) up to a total dose of 50.4 Gy (fraction dose 1.8 Gy). Teleradiotherapy was combined with intracavitary brachytherapy – 4 fractions of 7Gy targeting point A were planned for all patients. During the radiation therapy a dose of 40mg/m<sup>2</sup> of cisplatin was administered every 7 days. Those patients who, due to therapy toxicity received incomplete dose of radiation or fewer than 3 courses of cisplatin were excluded from the study. The evaluation of early response to treatment was done based on CT performed 4-6 weeks after ending chemoradiotherapy using the RECIST criteria. Systematic clinical follow-up of patients was then performed to determine the five-year survival in the study group

## **Results**

Twenty eight patients aged 39 to 68 years old (mean 54.9 y.o.) with cervical cancer at FIGO stage IIB (32.2%) and stage IIIB (67.8%) took part in the study. All patients received full teleradiotherapy and brachytherapy. Out of the planned 6 courses of cisplatin, 5 patients (17.8%) received them and the remaining 8 patients (28.6%) received 5 courses; 8 patients received 4 courses and 7 patients (25%) only 3 courses of chemotherapy. The complete response to treatment (CR) was observed in 6 patients (21.4%), partial response (PR) in 11 patients (39.3%), stable disease (SD) in 10 patients (35.3%), and progression (PD) in 1 patient (3.6%). Due to the relatively small size of the analyzed group, for statistical purposes, it was divided into two subgroups. The first subgroup included patients with a response to treatment (CR and PR), and in the second subgroup who did not respond to treatment (SD or PD). Survival analysis was performed on 26 patients, of whom 18 (69,3%) survived for 5 years.

The mean hemoglobin concentration in the responsive subgroup was 8,0 mmol/L (median 8,38 mmol/L) and in the no-responsive subgroup 8,48 mmol/L (median 8,50 mmol/L). The statistical analysis did not show any significant differences ( $p=0,230$ ). The median intensity of immunohistochemical reaction with anti-CAIX in both analyzed subgroups was 2 ( $p = 0.264$ ). Also, the median percentage of stained cells in this reaction revealed no differences and was 5% ( $p = 0.586$ ). In turn, the median response to anti-ERCC1

in both subgroups was 2 ( $p = 0.294$ ) and the median percentage of stained cells was 90% and 95% respectively for the responsive and non-responsive subgroup ( $p = 0.475$ ). Evaluation of the anti-PARP-1 also did not show any difference between the two analyzed subgroups. The median response was 2 ( $p = 0.402$ ) and the percentage of stained cells was 99% ( $p = 0.515$ ).

Among patients who survived for 5 years, the mean hemoglobin concentration was 8.36 mmol/L and was similar to the subgroup of no-survived subgroup (8.23mmol / L). The median intensity of immunohistochemical reaction with anti-CAIX in both subgroups was identical and amounted to 2, while the median percentage of stained cells was 7.5% and 5%, respectively. On the other hand, the median of qualitative response to anti-ERCC1 reaction in survived patients was 2, while in the second subgroup 3. At the same time, the median percentage of stained cells was 90% and 95%, respectively. Evaluation of anti-PARP1 showed that median response intensity was 3 in survived patients and 2 in no-survived subgroup. The median percentage of stained cells in anti-PERP-1 reaction was 25.54% and 80%, respectively.

### **Conclusions**

Cervical stage IIB - IIIB patients undergoing complete radiochemotherapy are characterized by relatively high hemoglobin concentration and low expression of CAIX protein, indicating no significant hypoxia in tumor cells. The evaluation of the intensity of hypoxia in this group of patients by determining the hemoglobin concentration in peripheral blood and the CAIX expression in the biopsied material does not have predictive and prognostic value.

In the analyzed group of patients, high expression of ERCC1 in cervical cancer cells was observed. However, immunohistochemical determination of ERCC1 expression does not have predictive and prognostic value.

Patients in the study group showed relatively high expression of PARP-1 protein in squamous cell carcinoma cells. However, evaluation of the expression of this protein by immunohistochemistry does not have predictive and prognostic value.

## 10 Piśmiennictwo

1. Richardson H, Kelsall G, Tellier P, Voyer H i wsp. The natural history of type-specific human papillomavirus infections in female university students. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 2003;12:485-90
2. Franco EL, Villa LL, Sobrinho JP, Prado JM i wsp. Epidemiology of acquisition and clearance of cervical human papillomavirus infection in women from a high-risk area for cervical cancer. *J Infect Dis* 1999;180:1415-25
3. Naguib SM, Lundin FE Jr, Davis HJ. Relation of various epidemiologic factors to cervical cancer as determined by a screening program. *Obstet Gynecol* 1966;28:451-9
4. Waggoner S, Wang X. Effect of nicotine on proliferation of normal, malignant, and human papillomavirus-transformed human cervical cells. *Gynecol Oncol* 1994;55:91-5
5. de Villiers EM. Relationship between steroid hormone contraceptives and HPV, cervical intraepithelial neoplasia and cervical carcinoma. *Int J Cancer* 2003;103:705-8
6. Sillman FH, Sentovich S, Shafter D. Ano-genital neoplasia in renal transplant patients. *Ann Transplant* 1997;2:59-66
7. Dhar JP, Kmak D, Bhan R, Pishorodi L i wsp. Abnormal cervicovaginal cytology in women with lupus. A retrospective cohort study. *Gynecol Oncol* 2001;82:4-6
8. Ahdieh L, Munoz A, Vlahov D, Trimble CR i wsp. Cervical neoplasia and repeated positivity of human papillomavirus infection in human immunodeficiency virus-seropositive and seronegative women. *Am J Epidemiol* 2000;151:1148-57
9. Peterson O. Spontaneous course of cervical precancerous conditions. *Am J Obstet Gynecol* 1956;72:1063-71
10. Wojciechowska U, Didkowska J. Zachorowania i zgony na nowotwory złośliwe w Polsce. Krajowy Rejestr Nowotworów, Centrum Onkologii - Instytut im. Marii Skłodowskiej - Curie. Dostępne na stronie <http://onkologia.org.pl/raporty/> dostęp z dnia 25/05/2017

11. Morris M, Eifel PJ, Lu J, Grigsby PW i wsp. Pelvic radiation with concurrent chemotherapy compared with pelvic and para-aortic radiation for high-risk cervical cancer. *N Eng J Med.* 1999;340(15):1137-43
12. Whitney CW, Sause W, Bundy BN, Malfetano JH i wsp. Randomized comparison of fluorouracil plus cisplatin versus hydroxyurea as an adjunct to radiation therapy in stage IIB-IVA carcinoma of the cervix with negative para-aortic lymph nodes: a Gynecologic Oncology Group and Southwest Oncology Group study. *J Clin Oncol* 1999;17(5):1339-48
13. Rose PG, Bundy BN, Watkins EB, Thigpen JT i wsp. Concurrent cisplatin-based radiotherapy and chemotherapy for locally advanced cervical cancer. *N Eng J Med.*1999;340(15):1144-53
14. Green JA, Kirwan JM, Tierney JF, Symonds P i wsp. Survival and recurrence after concomitant chemotherapy and radiotherapy for cancer of the uterine cervix: a systematic review and meta-analysis. *Lancet* 2001;358(9284):781-6)
15. Eifel PJ, Winter K, Morris M, Levenback C i wsp. Pelvic irradiation with concurrent chemotherapy versus pelvic and para-aortic irradiation for high-risk cervical cancer: an update of radiation therapy oncology group trial (RTOG) 90-01. *J Clin Oncol* 2004;22(5):872-80
16. Duefias-Gonzalez A, Zarba JJ, Alcedo JC, Pattarunataporn P i wsp. A phase III study comparing concurrent gemcitabine (Gem) plus cisplatin (Cis) and radiation followed by adjuvant Gem plus Cis versus concurrent Cis and radiation in patients with stage IIB to IVA carcinoma of the cervix. *J Clin Oncol* 2009;27:18s (suppl; abstr CRA5507)
17. Heddleston JM, Li Z, Lathia JD, Bao S i wsp. Hypoxia inducible factors in cancer stem cells. *Br J Cancer* 2010; 102: 789-795
18. Bertout JA, Patel SA, Simon MC. The impact of O<sub>2</sub> availability on human cancer. *Nat Rev Cancer* 2008; 8: 967-975
19. Steel GG. *Basic Clinical Radiobiology*, 3rd ed. Arnold, London 2003
20. Marples B, Joiner MC, Skov KA. The effect of oxygen on low-dose hypersensitivity and increased radioresistance on Chinese hamster V79-379A cells. *Radiat Res* 1994; 138: S17-S20

21. Radford LR. Evidence for a general relationship between the induced level of DNA double-strand breakage and cell killing after X-irradiation of mammalian cells. *Int J Radiat Biol* 1986; 49: 611-620
22. Whitaker SJ, Ung YC, McMillan TJ. DNA double-strand break induction and rejoining as determinants of human tumor cell radiosensitivity. A pulsed field electrophoresis study. *Int J Radiat Biol* 1995; 67: 7-18
23. Prise KM, Gillies NE, Michael BD. Evidence for a hypoxic fixation reaction leading to the induction of ssb and dsb in irradiated DNA. *Inr J Radiat Oncol Biol Phys* 1998; 74: 53-59
24. Michale BD, Adams GE, Hewitt Hb, Jones WB i wsp. A posteffect of oxygen in irradiated bacteria: a submillisecond fast mixing study. *Radiat Res* 1973; 54: 239-251
25. Trynda-Lemisz L, Śliwińska-Hill U. Kompleksy metali w terapii nowotworowej. Terazniejszość i przyszłość. *Nowotwory Journal of Oncology* 2011; 61:465-474
26. Pizzaro AM, Sadler PJ. Unusual DNA binding modes for metal anticancer complexes. *Biochemie* 2009; 91: 1198-1211
27. Lieber MR. The mechanism of human nonhomologous DNA end joining *J Biol Chem* 2008; 283: 1-5
28. Stehman FB, Bundy BN, DiSaia PH, Keys HM i wsp. Carcinoma of the cervix treated with irradiation therapy. I. A multi-variate analysis of prognostic variables in the Gynecologic Oncology Group. *Cancer* 1991;67:2776-2785
29. Fyles AW, Pintilie M, Kirkbride P, Levin W i wsp. Prognostic factors in patients with cervix cancer treated by radiation: results of a multiple regression analysis. *Radiother Oncol* 1995;35:107
30. Tinga DJ, Timmer PR, Bouma J Aalders JG. Prognostic significance of single versus multiple lymph node metastases in cervical carcinoma stage IB. *Gynecol Oncol* 1990;39:175
31. Delgado G, Bundy B, Zaino R Sevin BU i wsp. Prospective surgical-pathological study of disease-free interval in patients with stage IB squamous cell carcinoma of the cervix: a Gynecologic Oncology Group study. *Gynecol Oncol* 1990;38:352-357

32. Perez CA, Grigsby PW, Nene SM, Camel HM i wsp. Effect of tumor size on the prognosis of carcinoma of the uterine cervix treated with irradiation alone. *Cancer* 1992;69:2796-806
33. Patison G, Fyles A, Milosevic M, Wylie M, i wsp. Tumor size and oxygenation are independent predictors of nodal diseases in patients with cervix cancer. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 2001;51:699-703
34. Klimek M, Kruczak A, Lackowska B, Rychlik U i wsp. Ocena prognostycznego i predykcyjnego znaczenia wybranych czynników molekularnych u chorych na raka szyjki macicy leczonych napromienianiem i cisplatyną. *Diagn Lab* 2014;50(4):317-324
35. Urbański K, Kornafel J, Bidziński M i wsp. Ginekologia onkologiczna. W: Krzakowski M, Herman K, Jassem J i wsp. (red.). Zalecenia postępowania diagnostyczno-terapeutycznego w nowotworach złośliwych – 2009 r. Część I. *Via Medica*, Gdańsk 2009:231-272
36. ICRU Report 50. Prescribing, recording and reporting photon beam therapy. Maryland: Bethesda: 1993
37. ICRU Report 62. Prescribing, recording and reporting photon beam therapy (Supplement to ICRU Report 50). Maryland: Bethesda: 1999
38. ICRU Report 38. Dose and volume specification for reporting intracavitary therapy in gynecology. Maryland: Bethesda 1985
39. Mosteller RD. Simplified calculation of body-surface area. *N Engl J Med* 1987;317:1098
40. Therasse P, Arbuck SG, Eisenhauer EA, Wanders J i wsp. New guidelines to evaluate the response to treatment in solid tumours. European Organization for Research and Treatment of Cancer, National Cancer Institute of the United States, National Cancer Institute of Canada. *J Nat Cancer Ins* 2000;92:205-216
41. Eisenhauer EA, Therasse P, Bogaers J, Schwartz LH i wsp. New response evaluation criteria in solid tumours: Revised RECIST guideline (version 1.1). *Eur J Cancer* 2009;45:228-247

42. McCart KS Jr, Szabo E, Flowers JL, Cox EB i wsp. Use of monoclonal anti-estrogen receptor antibody in the immunohistochemical evaluation of human tumors. *Cancer Res* 1986; 46(8 Suppl): 4244s-4248s
43. Perez CA, Grigsby PW, Chao KS, Mutch DG i wsp. Tumor size, irradiation dose and long-term outcome of carcinoma of uterine cervix. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 1998;41(2):307-17
44. Höckel M, Schlenger K, Aral B, Mitze M i wsp. Association between tumor hypoxia and malignant progression in advanced cancer of the uterine cervix. *Cancer Res* 1996;56(19):4509-15
45. Nordsmark M, Bentzen SM, Rudat V, Brizel B i wsp. Prognostic Value of tumor oxygenation in 397 head and neck tumors after primary radiation therapy. An international multi-center study. *Radiother Oncol* 2005;77(1):18-24
46. Gasińska A, Urbański K, Adamczyk A, Pudelek J i wsp. Prognostic significance of intratumour microvessels density and haemoglobin level in carcinoma of the uterine cervix. *Acta Oncol* 2002;41(5):437-43
47. Burri P, Djonov V, Aebersold DM, Lindel K i wsp. Significant correlation hypoxia-inducible factor 1alpha with treatment outcome in cervical cancer treated with radical radiotherapy. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 2003;56(2):494-501
48. Hutchison GJ, Valentine HR, Loncaster JA, Davidson SE i wsp. Hypoxia-inducible factor 1alpha expression as an intrinsic marker of hypoxia: correlation with tumor oxygen, pimonidazole measurements, and outcome in locally advanced carcinoma of the cervix. *Clin Cancer Res* 2004;10(24):8405-12
49. Mayer A, Wree A, Höckel M, Leo C i wsp. Lack of correlation between expression of HIF-1alpha protein and oxygenation status in identical tissue areas of squamous cell carcinomas of the uterine cervix. *Cancer Res* 2004;64(16):5876-81
50. Wykoff CC, Beasley NJP, Watson PH, Turner KJ i wsp. Hypoxia-inducible expression of tumor-associated carbonic anhydrases. *Cancer Res* 2000;158(3):7075-7083
51. Loncaster JA, Harris AL, Davidson SE, Logue JP i wsp. Carbonic anhydrase (CA IX) expression, a potential new intrinsic marker of hypoxia: correlations with tumor

- oxygen measurements and prognosis in locally advanced carcinoma of the cervix. *Cancer Res* 2001;61(17):6394-9
52. Hedley D, Pintilie M, Woo J, Morrison A i wsp. Carbonic anhydrase IX expression, hypoxia, and prognosis in patients with uterine cervical carcinomas. *Clin Cancer Res* 2003;9(15):5666-74
53. Dehdashti F, Grigsby PW, Lewis JS, Laforest R i wsp. Assessing tumor hypoxia in cervical cancer by PET with <sup>60</sup>Cu-labeled diacetyl-bis(N4-methylthiosemicarbazone). *J Nucl Med* 2008;29(2):201-5
54. Enzlin JH, Scharer OD. The active site of the DNA repair endonuclease XPF-ERCC1 forms a highly conserved nuclease motif. *EMBO J* 2002;21(8):2045–53
55. Gossage L, Madhusudan S. Current status of excision repair cross complementing-group 1 (ERCC1) in cancer. *Cancer Treat Rev* 2007;33(6):565–77
56. Olaussen KA, Dunant A, Fouret P, Brambilla E i wsp. DNA repair by ERCC1 in non-small-cell lung cancer and cisplatin-based adjuvant chemotherapy. *N Engl J Med* 2006;355:983–991
57. Darcy KM, Tian C, Reed E. A Gynecologic Oncology Group study of platinum-DNA adducts and excision repair cross-complementation group 1 expression in optimal, stage III epithelial ovarian cancer treated with platinum-taxane chemotherapy. *Cancer Res* 2007;67(9):4474–4481
58. Kwon HC , Roh MS, Oh SY, Kim SH i wsp. Prognostic value of expression of ERCC1, thymidylate synthase, and glutathione S-transferase P1 for 5-fluorouracil/oxaliplatin chemotherapy in advanced gastric cancer. *Ann Oncol* 2007;18(3):504–509
59. Stoehlmacher J, Park DJ, Zhang W, Yang D i wsp. A multivariate analysis of genomic polymorphisms: Prediction of clinical outcome to 5-FU/oxaliplatin combination chemotherapy in refractory colorectal cancer. *Br J Cancer* 2004;91(2):344–354
60. Kim MK, Cho KJ, Kwon GY, Park SI i wsp. ERCC1 predicting chemoradiation resistance and poor outcome in oesophageal cancer. *Eur J Cancer* 2008;44(1):54–60
61. Carles J, Monzo M, Amat M, Jansa S i wsp. Single nucleotide polymorphisms in base excision repair, nucleotide excision repair, and double strand break genes as markers

- for response to radiotherapy in patients with Stage I to II head-and-neck cancer. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 2006;66(4):1022–1030
62. Jun HJ, Ahn MJ, Kim HS, Yi SY i wsp. ERCC1 expression as a predictive marker of squamous cell carcinoma of the head and neck treated with cisplatin-based concurrent chemoradiation. *Br J Cancer* 2008;99(1):167-72
63. Britten RA, Liu D, Tessier A, Hutchinson MJ i wsp. ERCC1 expression as a molecular marker of cisplatin resistance in human cervical tumor cells. *Int J Cancer* 2000;89(5):453-7
64. Bai ZL, Wang YY, Zhe H, He JL i wsp. ERCC1 mRNA levels can predict the response to cisplatin-based concurrent chemoradiotherapy of locally advanced cervical squamous cell carcinoma. *Radiat Oncol* 2012;7:221
65. Doll CM, Prystajek M, Eliasziw M, Klimowicz AC i wsp. Low ERCC1 mRNA and protein expression are associated with worse survival in cervical cancer patients treated with radiation alone. *Radiother Oncol* 2010;97(2):352-9
66. Doll CM, Aquino-Parsons C, Pintille M, Klimowicz AC i wsp. The significance of tumoral ERCC1 status in patients with locally advanced cervical cancer treated with chemoradiation therapy: a multicenter clinicopathologic analysis. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 2013;85(3):721-7
67. Otto H, Reche PA, Bazan F, Dittmar K i wsp. In silico characterization of the family of PARP-like poly(ADP-ribosyl)transferases (pARTs). *BMC Genomics* 2005;6:139
68. Amé JC, Spenlehauer C, de Murcia G. The PARP superfamily. *Bioessays* 2004;26:882–893
69. Amé JC, Rolli V, Schreiber V, Niedergang C i wsp. PARP-2, a novel mammalian DNA damage-dependent poly(ADP-ribose) polymerase. *J Biol Chem* 1999;274:17860–17868
70. Dantzer F, de La Rubia G, Ménissier-De Murcia J, Hostomsky Z i wsp. Base excision repair is impaired in mammalian cells lacking Poly(ADP-ribose) polymerase-1. *Biochemistry* 2000;39:7559–7569
71. Bryant HE, Schultz N, Thomas HD, Parker KM i wsp. Specific killing of BRCA2-deficient tumours with inhibitors of poly(ADP-ribose) polymerase. *Nature* 2005;434:913–917

72. McCabe N, Turner NC, Lord CJ, Kluzek K i wsp. Deficiency in the repair of DNA damage by homologous recombination and sensitivity to poly(ADP-ribose) polymerase inhibition. *Cancer Res* 2006;66:8109–8115
73. Kaelin WG Jr. The concept of synthetic lethality in the context of anticancer therapy. *Nat Rev Cancer* 2005;5:689–698
74. Moeller BJ, Yordy JS, Williams MD, Giri U i wsp. DNA repair biomarker profiling of head and neck cancer: Ku80 expression predicts locoregional failure and death following radiotherapy. *Clin Cancer Res* 2011;17:2035–2043
75. Gonzalez R, Silva JM, Dominguez G, Garcia JM i wsp. Detection of loss of heterozygosity at RAD51, RAD52, RAD54 and BRCA1 and BRCA2 *loci* in breast cancer: pathological correlations. *Br J Cancer* 1999;81:503–509
76. Cancer Genome Atlas Research Network: Integrated genomic analyses of ovarian carcinoma. *Nature* 2011;474:609–615
77. Narayan G, Arias-Pulido H, Nandula SV, Basso K i wsp. Promoter hypermethylation of FANCF: disruption of Fanconi Anemia-BRCA pathway in cervical cancer. *Cancer Res* 2004;64:2994–2997
78. Yap TA, Sandhu SK, Carden CP, de Bono JS. Poly(ADP-ribose) polymerase (PARP) inhibitors: Exploiting a synthetic lethal strategy in the clinic. *CA Cancer J Clin* 2011;61:31–49
79. Domagala P, Huzarski T, Lubinski J, Gugala K i wsp. PARP-1 expression in breast cancer including BRCA1-associated, triple negative and basal-like tumors: possible implications for PARP-1 inhibitor therapy. *Breast Cancer Res. Treat.*, 2011; 127: 861–869
80. Rojo F, Garcí'a-Parra J, Zazo S , Tusquets I i wsp. Nuclear PARP-1 protein overexpression is associated with poor overall survival in early breast cancer. *Ann Oncol* 2012;23:1156-64
81. Guy JB, Falk AT, Auberdiac P, Cartier L i wsp. Dosimetric study of volumetric arc modulation with RapidArc and intensity-modulated radiotherapy in patients with cervical cancer and comparison with 3-dimensional conformal technique for definitive radiotherapy in patients with cervical cancer. *Med Dosim* 2016;41(1):9-14

82. Yin G, Wang P, Lang J, Tian Y i wsp. Dosimetric study for cervix carcinoma treatment using intensity modulated radiation therapy (IMRT) compensation based on 3D intracavitary brachytherapy technique. J Contemp Brachytherapy 2016;8(3):221-32

## 11 Załącznik nr 1 - Zgoda Komisji Bioetycznej



UNIwersytet Medyczny im. Karola Marcinkowskiego w Poznaniu

KOMISJA BIOETYCZNA PRZY UNIwersytecie Medycznym  
im. Karola Marcinkowskiego w Poznaniu

Collegium Maius  
ul. Fredry 10  
61-701Poznań

tel. (+48 61) 854 62 51, 854 60 60  
fax. (+48 61) 854 61 07  
www.bioetyka.ump.edu.pl

### Uchwała nr 477/09

Na podstawie przepisów Ustawy z dnia 5 grudnia 1996 r. o zawodach lekarzy i lekarzy dentysty (Dz. U. 1997, Nr 28, poz. 152); Rozporządzenia Ministra Zdrowia i Opieki Społecznej z dnia 11 maja 1999r. w sprawie szczegółowych zasad powoływania i finansowania oraz trybu działania komisji bioetycznych (Dz. U. Nr 47, poz. 480); Rozporządzenia Ministra Zdrowia z dnia 11 marca 2005 r. w sprawie szczegółowych wymagań Dobrej Praktyki Klinicznej (Dz. U. 2005, Nr 57, poz. 590); Ustawy z dnia 6 września 2001r. Prawo farmaceutyczne (Dz. U. z 2004r. Nr 53, poz. 533 ze zm.); Rozporządzenia Ministra Finansów z dnia 30 kwietnia 2004r. w sprawie obowiązkowego ubezpieczenia odpowiedzialności cywilnej badacza i sponsora (Dz. U. 2004 nr 101, poz. 1034 z późn. zm.); Rozporządzenia Ministra Finansów z dnia 18 maja 2005r. zmieniające rozporządzenie w sprawie obowiązkowego ubezpieczenia odpowiedzialności cywilnej badacza i sponsora (Dz. U. Nr 101, poz. 845); Rozporządzenia Ministra Zdrowia z dnia 30 kwietnia 2004r. w sprawie sposobu prowadzenia badań klinicznych z udziałem małoletnich (Dz. U. 2004 Nr 104, poz. 1108); Rozporządzenia Ministra Zdrowia z dnia 30 kwietnia 2004r. w sprawie zgłaszania niespodziewanego ciężkiego niepożądanego działania produktu leczniczego (Dz. U. Nr 104, poz. 1107); Rozporządzenia Ministra Zdrowia z dnia 4 listopada 2008r. w sprawie wzorów dokumentów przedkładanych w związku z badaniem klinicznym produktu leczniczego oraz w sprawie wysokości i sposobu uiszczania opłat za rozpoczęcie badania klinicznego (Dz. U. Nr 201, poz. 1247), kierując się Zasadami Prawidłowego Prowadzenia Badań Klinicznych – GCP – opracowanymi w oparciu o Deklarację Helsińską.

**Komisja, na posiedzeniu w dniu: 06 maja 2009 r.**

**rozpatrzyła wniosek, który przedstawił Pan:**

**dr hab. n. med. Piotr Wysocki**

**w sprawie prowadzenia badań na**

**Oddziale Radioterapii i Onkologii Ginekologicznej w Wielkopolskim  
Centrum Onkologii w Poznaniu**

**Główny badacz: lek. med. Tomasz Bajon**

**Członkowie zespołu**

**badawczego: dr hab. n. med. Piotr Wysocki  
dr hab. n. med. Andrzej Roszak**

**Temat**

**badania: "Ocena nasilenia hipoksji i ekspresji genów warunkujących chemiooporność w odpowiedzi zaawansowanego raka szyjki macicy na skojarzoną radiochemioterapię".**

**Komisja wyraża zgodę na prowadzenie badań**

Przewodniczący Komisji

Prof. zw. dr hab. med. Zygmunt Przybylski