

Radioterapia jest jedną z podstawowych metod leczenia nowotworów złośliwych. Niestety, przeżycia chorych oraz intensywność powikłań popromiennych są nadal dalekie od oczekiwań. Z tego względu prognozowanie odpowiedzi guza poddanego napromienieniu oraz intensywności powikłań stałyby się niezwykle użyteczne, dając możliwość indywidualizacji leczenia.

Obecnie w ocenie klinicznej pozostaje kilka testów. Jednym z nich jest test formowania kolonii komórkowych po dawce 2 Gy (SF2), który umożliwi określenie odpowiedzi dla guza oraz tkanki zdrowej. Jednak ze względu na długi czas oczekiwania na wyniki oraz zbyt małą specyficzność, nie znalazł zastosowania w rutynowej praktyce. Spośród innych metod diagnostycznych należy wymienić analizę uszkodzeń DNA i aberracji chromosomów dokonywaną za pomocą testu kometowego (ang. comet assay), mikrojądrowego (MN) oraz testu bleomycynowego.

Kolejnym kierunkiem badań, umożliwiających określenie efektu radioterapii jeszcze przed jej rozpoczęciem, jest analiza molekularna komórek. Badania te wzbudzają bardzo dużo nadziei, ale jak dotychczas znajdują się we wstępnej fazie oceny.

Praktyczne zastosowanie testów prognostycznych napotyka na trudności będące wynikiem złożoności i zmienności odpowiedzi komórki na napromienianie, którą determinują czynniki wewnętrzne (genetyczne) oraz czynniki zewnętrzne (sposób napromieniania, schorzenia internistyczne, leczenie operacyjne, cytostatykami, leczenie wspomagające).

W podsumowaniu można stwierdzić, że możliwość prognozowania odpowiedzi na napromienianie zarówno w tkance zdrowej, jak i w guzie nowotworowym stanowi niezwykle kuszącą perspektywę, jednak obecnie nie można wskazać żadnego z testów, który

Prognozowanie efektu napromieniania na podstawie oceny promieniowrażliwości tkanek zdrowych i guza nowotworowego

– ograniczenia i możliwości

Prediction of radiotherapy effect based on evaluation of radiosensitivity of normal and cancer tissue – limitations and possibilities

Piotr Milecki¹, Krzysztof Szyfter²

¹ Zakład Radioterapii, Wielkopolskie Centrum Onkologii w Poznaniu

² Instytut Genetyki Człowieka PAN w Poznaniu

WSTĘP

Nowoczesna radioterapia stanowi jedną z podstawowych metod leczenia nowotworów złośliwych. Pomimo niewątpliwych sukcesów przyczyniających się do przedłużenia czasu życia chorych, nadal istnieje duża różnica pomiędzy możliwościami terapii a oczekiwaniami pacjentów. W ostatnim okresie szczególną wagę zwraca się na jakość życia chorych (ang. *quality of life*) po zakończonym leczeniu. Przyjmuje się, że rozmiar istotnych powikłań popromiennych stanowi równie ważne kryterium oceny metody leczenia, jak czas przeżycia chorych, co znajduje swój wymiar w definicji zysku terapeutycznego (ang. *therapeutic gain*). Z tego względu prognozowanie odpowiedzi komórki normalnej tkanki, jak i nowotworowej na działanie promieniowania jonizującego stanowią jedno z najważniejszych wyzwania dla radioterapii w XXI w.

Promieniowrażliwość właściwa komórki (*intrinsic radiosensitivity*) stanowi względnie niezależną, a uwarunkowaną genetycznie cechę, charakteryzującą guz nowotworowy lub tkanki zdrowe [1]. Ocena promieniowrażliwości nowotworu oraz tkanki zdrowej przed rozpoczęciem kursu leczenia napromienianiem stanowi przedmiot badań, sięgających korzeniami praktycznie początku radioterapii, kiedy to w oparciu o cechy histopatologiczne wyróżniono guzy charakteryzujące się dużą (np. nasieniak), umiarkowaną promieniowrażliwością (np. rak płaskonabłonkowy) oraz guzy promieniooporne (np. mięsak). Jednak ten podział jest bardzo daleki od współczesnych oczekiwań z tego względu, że nawet w obrębie tego samego typu histologicznego obserwowuje się dużą różnorodność odpowiedzi guza nowotworowego na napromienianie [2, 3]. Kolejnym ważnym zagadnieniem przed rozpoczęciem kursu radioterapii jest

znajduje rutynowe zastosowanie. Wydaje się, że największe szanse zastosowania będzie miał ten test, który pozwoli w sposób wystarczający skorelować wyniki testu z efektami klinicznymi napromieniania, a ponadto będzie szybki i tani.

Słowa kluczowe: radioterapia, testy prognostyczne, promieniowrażliwość, powikłania popromienne.

identyfikacja chorych, u których można oczekiwać nasilonej reakcji popromiennej w tkankach zdrowych [4, 5]. Powszechnie znany jest fakt występowania u napromienianych chorych nadmiernie nasilonych reakcji popromiennych (odczynów), niemających swego uzasadnienia w parametrach fizycznych napromieniania, takich jak dawka całkowita i frakcyjna [6]. Najczęściej nasuwającym się wytłumaczeniem takiej nadmiernej reakcji tkanek zdrowych jest obecność *nieznanego* czynnika wewnętrznego, który jest utożsamiany z podatnością osobniczą [7]. Właśnie to spostrzeżenie legło u podstaw poszukiwania testów identyfikujących chorych obciążonych znacznym ryzykiem wystąpienia powikłania popromiennego. Również odpowiedź guza nowotworowego na napromienianie może zależeć w niewielkim stopniu od promieniowrażliwości tkanki zdrowej [8]. Przekonanie takie wynika z faktu, że komórka nowotworowa jest zbliżona genotypowo i fenotypowo do komórki zdrowej [9]. Oceniając realistycznie dotychczasowy stan wiedzy, nie należy spodziewać się jednak, że na podstawie analizy intensywności ostrego odczynu popromiennego możliwym będzie prognozowanie odpowiedzi guza na radioterapię [10].

W praktyce szacowanie odpowiedzi guza nowotworowego na leczenie napromienianiem jest oparte głównie na takich kryteriach jak stopień zaawansowania klinicznego (T1 vs T4), objętość guza (3 cm³ vs 20 cm³), lokalizacja anatomiczna (piętro środkowe krtani vs piętro górne krtani), typ histologiczny nowotworu oraz obecność przerzutów w układzie chłonnym (pN1 vs pN3). Niestety, nie zawsze spotyka się tak ostro zdefiniowane różnice, jak zaproponowano powyżej, które umożliwiają dokładniejsze prognozowanie wyników leczenia [11–13]. Określenie wyniku terapii w przypadku guza nowotworowego zlokalizowanego w piętrze środkowym krtani u dwóch chorych z tym sa-

mym zaawansowaniem klinicznym choroby, np. T2N0M0 w sposób kategoriowy (0 lub 1) jest niemożliwe, a jedynie można określić przedział prawdopodobieństwa zajścia zdarzenia. Zawężenie ryzyka błędnej interpretacji w odniesieniu do guza oraz tkanek zdrowych jest głównym celem testów prognostycznych w radioterapii [9]. Idealny test prognostyczny winien zatem charakteryzować się dużą wiarygodnością (duża korelacja jego wyniku z wynikami radioterapii), ale i również winien być tani, możliwy do powszechnego stosowania w praktyce, a nadto nieuciążliwy dla chorego.

Niestety, jak dotychczas nie udało się skorelować rezultatów radioterapii z wynikami jakiegokolwiek badanego testu prognostycznego na tyle silnie, aby na tej podstawie dokonać indywidualizacji leczenia radioterapią. Aby odpowiedzieć na to pytanie, dlaczego jak dotychczas nie udało się tego dokonać, należy zastanowić się nad całą złożonością zagadnienia. Na taki stan rzeczy mają wpływ w głównej mierze zewnętrzne czynniki determinujące odpowiedź komórki na promieniowanie jonizujące, do których w pierwszej kolejności zaliczy się zaaplikowaną dawkę całkowitą, dawkę frakcyjną, czas leczenia napromienianiem, napromienianą objętość zdrowych tkanek, organizację narządu krytycznego, a w dalszej kolejności schorzenia towarzyszące (np. cukrzyca), czy leczenie operacyjne [14, 15]. Nasuwa się spostrzeżenie, że dotychczas przeprowadzone analizy, oceniające przydatność testów prognostycznych niejednokrotnie były oparte na materiale klinicznym, charakteryzującym się dużą różnorodnością czynników wpływających na ostateczny kształt odpowiedzi popromiennej, co zapewne utrudniało wyciągnięcie wiążących wniosków. Paradoksalnie, ocenę przydatności danego testu prognozującego powikłanie popromienne w tkankach zdrowych może nawet utrudniać leczenie wspomagające, prowadzone w celu zniwelowania objawów ostre-

Radiotherapy plays an important role in the treatment of many cancers. Unfortunately, the patient's survival and the intensity of radiation complications are still far from the expected results. For this reason predicting the response of irradiated tumours and intensity of side effects would be very useful in the process of qualifying patients for radiotherapy. Adequately sensitive and specific tests of radiosensitivity would allow for the individualization of treatment. A variety of DNA damage assays have been applied in an effort to predict the sensitivity of cells to ionizing radiation. Currently, a few predictive tests are still under clinical evaluation. The colony-forming test after applied test dose of 2Gy (SF2) is one of them. However, mainly due to relatively long waiting time needed for results, the test is not applied in the routine practice. Analysis of chromosome damage can be a useful method in the evaluation of radiotherapy effects. Among tests from this group, comet assay and micronuclei tests (MN) should be mentioned above all.

Molecular analysis of genes involved in response to radiotherapy is another type of research field enabling the prediction of radiotherapy effects. This research is very promising but currently it is at the initial phase of evaluation.

In summary, an attempt to do research on possibility of the prediction of tumour response to radiotherapy effects is very tempting. However, currently none of tests can be routinely applied. It seems that the greatest chance for application will have a test which is fast and cheap and above all which strongly correlates with the results of radiotherapy.

Key words: radiotherapy, predictive tests, radiosensitivity, side effects.

go odczynu popromiennego. Nie bez znaczenia są zapewne niedokładności związane z oceną rzeczywistego stopnia nasilenia odczynu popromiennego. Wynika to m.in. z faktu stosowania wielu klasyfikacji odczynów popromiennych (WHO, RTOG/EORTC, SOMA/LENT, CTC, DISHEGO), które opierają się bardzo często na subiektywnej ocenie intensywności powikłania, raportowanej zarówno przez chorego i lekarza. W takim przypadku, np. wystąpienie powikłania popromiennego, które nie zmienia samopoczucia chorego może nie zostać zauważone (brak raportu klinicznego) w przypadku niewykonania dodatkowych badań (np. subkliniczna niedoczynność tarczycy bez wykonania badań hormonalnych). Z tego względu ścisła współpraca klinicystów z przedstawicielami nauk podstawowych umożliwi dokładniejsze odzwierciedlenie stanu rzeczywistego w napromienianym obszarze.

Również wiele pułapek może być związanych z niedokładnością podawanej dawki oraz błędami geometrycznymi, występującymi podczas napromieniania. Uwzględniając znaczne konsekwencje biologiczne błędów fizycznego (ang. *double trouble*) szczególną uwagę zwraca się na ten aspekt kliniczny w analizie oceny przydatności testu prognostycznego.

Przyjmuje się, że podstawowym mechanizmem odpowiedzialnym za popromienną śmierć komórki jest uszkodzenie DNA [16]. Promieniowanie jonizujące powoduje przede wszystkim powstanie pęknięć w obrębie DNA. Naprawa uszkodzeń popromiennych w obrębie DNA jest skomplikowanym procesem biologicznym, w który [17] zaangażowanych jest ponad 130 genów. Z tego względu efekt biologiczny w napromienianej komórce stanowi genetyczną reprezentację. Kliniczny obraz powikłania popromiennego jest wypadkową stopnia uszkodzenia komórki, jej zdolnością do naprawy uszkodzenia oraz sposobu organizacji podjednostek funk-

cjonalnych narządu lub tkanki. W przypadku organizacji liniowej podjednostek funkcjonalnych, jaką obserwuje się, np. w rdzeniu kręgowym, uszkodzenie zaledwie jednej z nich wywołuje przerwanie funkcji całego łańcucha pozostałych, nawet tych nieuszkodzonych przez promieniowanie jonizujące. Prowadzi to do *wyłączenia* z funkcjonowania znacznie większej liczby komórek aniżeli zostało bezpośrednio uszkodzonych [18]. Dodatkowo na ostateczny kształt odczynu popromiennego mogą wpływać również czynniki modyfikujące, związane ze schorzeniami internistycznymi (np. zaburzenia w mikrokrojeniu spowodowane cukrzycą, chorobami naczyń krwionośnych). Powoduje to progresję objawów uszkodzenia popromiennego, będącą wynikiem nałożenia się obu wymienionych patologii. Wreszcie nie bez znaczenia jest czas obserwacji chorych po zakończonym napromienianiu, ponieważ powikłania późne ujawniają się wraz z upływem czasu. Z tego względu zbyt krótka obserwacja chorych lub paradoksalnie bardzo złe wyniki leczenia (np. paliatywna brachyterapia) prowadzą do *ukrycia* rzeczywistej liczby powikłań popromiennych.

Jednym z istotnych problemów w prognozowaniu odpowiedzi na napromienianie jest brak wiedzy o potencjale regeneracyjnym tkanki zdrowej, na który składa się m.in. tempo proliferacji komórek rozrodczych oraz ukrwienie tkanki. Z tego względu ocena stopnia uszkodzenia jedynie komórek docelowych tkanki czy narządu może nie stanowić wystarczającej siły predykcyjnej do określenia stopnia intensywności odczynu popromiennego. Kolejnym problemem, utrudniającym dokonanie wiarygodnej i jednocześnie kompleksowej analizy dla ostrego i późnego odczynu jest brak ścisłej korelacji pomiędzy ich intensywnością. Testy, które w wystarczający sposób prognozo-

wałyby intensywność ostrego odczynu (wczesnego), niekoniecznie muszą odzwierciedlać skalę nasilenia późnych powikłań. Również sporo kontrowersji dotyczy wyboru do badań predykcyjnych reprezentatywnej komórki zdrowej tkanki. Najczęściej testy opierają się na analizie fibroblastów skóry, limfocytów krwi obwodowej czy keratocytów. Należy jednak nadmienić, że niektóre komórki są związane z określonym typem powikłania popromiennego, np. fibroblast jest typową komórką tarczową dla późnych zwłóknień popromiennych, ale mało charakterystyczną dla ostrego odczynu popromiennego błony śluzowej. Jeszcze więcej kontrowersji budzą limfocyty krwi obwodowej, które nie są bezpośrednią tarczą dla odczynów popromiennych, a przyjmuje się, że reprezentują ogólny stan promieniowrażliwości pacjenta.

W ocenie laboratoryjnej oraz klinicznej znajduje się obecnie wiele testów diagnostycznych, oceniających następujące parametry związane z promieniowrażliwością komórki:

- zdolności klonogenne po napromienieniu,
- intensywność aberracji chromosomowych,
- efektywność naprawy DNA,
- ekspresję genów zaangażowanych w odpowiedź popromienną.

Spośród testów oceniających zdolności klonogenne wymieniany jest przede wszystkim test formowania kolonii komórkowych (*colony formation test*) – SF2 (*survival fraction*), który jest uważany jak dotychczas za tzw. *złoty standard*. Test ten został zaproponowany przez Fertila i Malaise [19], którzy wykazali związek pomiędzy prawdopodobieństwem zniszczenia guza nowotworowego (TCP – *tumour control probability*) a wielkością frakcji komórek przeżywających po testowej dawce 2 Gy (SF2). Określenie wartości SF2 służące do estymacji TCP u indywidualnego pacjenta wymaga przeprowadzenia czasochłonnej i pracochłonnej hodowli komórkowej.

Czas oczekiwania na wyniki testu wynoszący ok. 4 tyg. w przypadku użycia fibroblastów, a leukocytów ok. 2 tyg., jest jedną z przyczyn ograniczających jego praktyczne zastosowanie [20]. Pobrane od pacjenta komórki tkanki zdrowej (np. fibroblasty lub limfocyty) lub nowotworowe zostają poddane napromienianiu najczęściej stosowaną dawką w praktyce klinicznej, tj. 2 Gy. Podstawowym założeniem, na którym opiera się test jest przekonanie, że miarą promieniowrażliwości komórek poddanych napromienianiu dawką testową jest zdolność do tworzenia nowych kolonii komórkowych. Warunkiem niezbędnym do uznania tego faktu jest zachowanie zdolności do rozplemu, którego reprezentacją jest powstanie kolonii komórkowej, czyli zajęcia przynajmniej od 4 do 5 podziałów komórkowych. Test może znaleźć potencjalne zastosowanie w prognozowaniu odpowiedzi guza nowotworowego oraz tkanek zdrowych na napromienianie (zwłóknienie popromienne) [21, 22]. Najczęściej stosowanymi komórkami w ocenie promieniowrażliwości tkanek zdrowych są fibroblasty, ze względu na ich obecność zarówno w tkance podskórnej, jak i w naczyniach krwionośnych. Ten ostatni fakt może mieć znaczenie również dla oceny intensywności teleangiektazji, będących wynikiem popromiennego uszkodzenia drobnych naczyń w obrębie skóry. Dotychczasowe badania promieniowrażliwości w oparciu o ten test wskazują na dobrą korelację wyników testu ze zwłóknieniem popromiennym tkanki podskórnej [23, 24]. Należy jednak zauważyć, że brak jest wystarczająco przekonujących dowodów dających podstawę do korekty sposobu napromieniania (np. obniżenie, zwiększenie dawki lub też alternatywne leczenie w przypadku zwiększonej promieniowrażliwości tkanek normalnych) w oparciu o jego wyniki, co stanowiłoby podstawę do jego uznania jako wiary-

godnego testu promieniowrażliwości. Podsumowując, 2 podstawowe elementy wykluczają obecnie jego praktyczne zastosowanie. Pierwszy to długi czas wymagany do wykonania testu. Natomiast drugi jest związany z małą precyzją metody. Podkreślenia wymaga fakt, że wystąpienie niewielkiego błędu w ocenie wartości SF2 prowadzi do jego znacznego wzrostu w odniesieniu do wartości TCP lub NTCP (ang. *normal tissue complication probability*).

Uszkodzenie chromosomów i chromatyd, wyrażające się nieprawidłowościami w zakresie ich liczby lub struktury może być wynikiem oddziaływania nawet już niewielkich dawek promieniowania jonizującego. Z tego też względu analiza obecności aberracji chromosomalnych w zdrowych komórkach, dokonywana najczęściej w limfocytach krwi obwodowej, po ekspozycji danego czynnika testowego (określona dawka promieniowania jonizującego) może stanowić użyteczne źródło informacji o podatności komórki na uszkodzenie popromienne. Najczęściej analizę wykonuje się w oparciu o limfocyty, które są wyjątkowo wygodne w praktyce ze względu na łatwość ich pozyskania.

Jednym z testów z tej grupy jest test bleomycynowy, który został zaproponowany przez Hsu [25], a jego istotą jest indukcja uszkodzeń chromosomów w warunkach hodowli *in vitro*. Wynik testu opiera się na pomiarze liczby pęknięć chromatyd, która jest pośrednim miernikiem zdolności naprawy przez komórkę uszkodzonego DNA po zadziałaniu na nią testowego związku, jakim jest bleomycyna. Bleomycyna została wybrana z powodu jej szczególnych właściwości radiomimetycznych, indukujących zarówno pojedyncze, jak i podwójne pęknięcia DNA. Istnieje również możliwość zastąpienia bleomycyny innymi czynnikiem radiomimetycznymi. W teście określana jest liczba pęknięć chromatyd na komórkę (*b/c* – *breaks per cell*) oraz odsetek komórek z uszkodzeniami

[26]. Wartość testu bleomycynowego dobrze koreluje ze stopniem niestabilności chromosomowej, definiowanej jako obecność zwiększonej częstości złamań oraz innych uszkodzeń chromosomów w badanej populacji w porównaniu z populacją kontrolną.

Test ma obecnie ustaloną pozycję w rozpoznawaniu zwiększonej predyspozycji do zachorowania na pewne nowotwory złośliwe [26]. Natomiast mało jest informacji na temat potencjalnych możliwości jego wykorzystania dla identyfikacji chorych nadwrażliwych na uszkadzające działanie promieniowania jonizującego [27].

Kolejnym testem z tej grupy jest test kometowy (*comet assay*) – elektroforeza żelowa pojedynczych komórek – bazujący na analizie swobodnego ogona tzw. komety, której długość koreluje ze stopniem nienaprawionego uszkodzenia DNA w komórce, stanowiącego swoistą reprezentację promieniowrażliwości komórki [28–30]. Najczęściej stosowanymi do analizy komórkami są limfocyty, które po napromienieniu zostają umieszczone w polu elektrycznym. Z uwagi na szybkość uzyskania wyników, niewysoki koszt testu, wymaganą niewielką liczbę komórek poddawanych analizie oraz dużą korelację jego wyników z efektem biologicznym napromieniania można przyjąć, że jest to jeden z testów, mogących znaleźć w przyszłości miejsce w praktyce klinicznej. Problemem technicznym jest relatywnie duża pracochłonność podczas analizy mikroskopowej ocenianego materiału. Obecnie trwają zaawansowane prace nad wprowadzeniem automatycznego odczytu wyników na drodze zastosowania analizy komputerowej (informacja ustna: dr Odilia Popanda, Niemiecki Instytut Rakowy w Hilderbergu, Niemcy).

Test mikrojądrowy (*micronucleus* – MN) jest testem, którego nazwa pochodzi od charakterystycznych mikrojąder, przypominających klasyczne jądra komórkowe, a spoty-

kanych w komórce po jej ekspozycji na promieniowanie jonizujące. Mikrojądra utworzone są przez uszkodzone chromosomy (w fazie G0) lub chromatydy (w fazie G2) powstałe w zależności od fazy cyklu życiowego komórki. Test polega na pomiarze liczby powstałych mikrojąder w komórce w mikroskopie świetlnym, będącego reprezentacją uszkadzającego efektu promieniowania jonizującego. Mikrojądra mogą również powstać w wyniku działania innych czynników uszkadzających nić DNA, takich jak bleomycyna, kolchicyna, vinkrytyna. Oprócz indukowanych mikrojąder w trakcie testu, spotyka się ponadto mikrojądra spontaniczne, będące przede wszystkim reprezentacją skumulowanych uszkodzeń, powstałych w trakcie życia pacjenta. W wielu nowotworach spotyka się również zwiększoną obecność mikrojąder spontanicznych, które są wówczas miernikiem niestabilności genetycznej. Istotną cechą testu mikrojądrowego jest to, że w sposób wiarygodny odzwierciedla ilość nienaprawionych struktur DNA, co koreluje z wydolnością mechanizmów naprawczych w komórce. Jest testem szybkim, czyli możliwym do zaakceptowania w rutynowej praktyce i może służyć do oceny promieniowrażliwości guza oraz tkanek zdrowych (fibroblasty lub limfocyty) [32]. Wymaga jednak przeprowadzenia hodowli komórkowej. Obecnie test nie jest jednak aprobowany do zastosowania w rutynowej praktyce klinicznej jako narzędzie służące do oceny promieniowrażliwości guza lub tkanki zdrowej.

ANALIZA GENETYCZNA

Obecnie uwaga wielu badaczy skupia się na genetycznych uwarunkowaniach odpowiedzi komórki na napromienianie. Podstawę do powyższego kierunku badań dały m.in. obserwacje chorych, u których stwierdza się takie uwarunkowane genetycznie zespoły, jak *ataxia teleangiectasia* (AT), zespół Nij-

megen (*Nijmegen Breakage Syndrome* – NBS), anemia Fanconiego, czy zespół Blooma. U chorych tych współistnieje nadwrażliwość normalnych komórek na uszkadzające działanie promieniowania jonizującego [33]. Nadwrażliwość jest wynikiem nieprawidłowego funkcjonowania genów, biorących udział w popromiennej naprawie uszkodzonego DNA. Wiele badań poświęcono genowi *ATM*, kodującemu białko nadzorujące detekcję popromiennego uszkodzenia DNA, zatrzymanie cyklu komórkowego, naprawę DNA, czy wreszcie apoptozę, a którego mutacja prowadzi do ataksji teleangiektazji (AT) [34, 35]. W zdrowej populacji obecność heterozygot tego genu wynosi od 0,5 do 1 proc., jednak w populacji chorych na chorobę nowotworową ten odsetek jest zwykle wyższy. Wyniki przeprowadzonych dotychczas badań oceniających związek pomiędzy obecnością genotypu heterozygoty AT a intensywnością odczynu popromiennego mogą wskazywać na to, że gen *ATM* jest jednym z wielu ważnych czynników, determinujących odpowiedź komórki na napromienianie. W kolejnym zespole należącym do grupy tzw. zespołów niestabilności chromosomowych znajduje się zespół Nijmegen, który charakteryzuje się występowaniem samoistnych pęknięć oraz strukturalnych rearanżacji chromosomów, co znacznie zwiększa wrażliwość na promieniowanie jonizujące. Z najnowszych badań wynika, że tzw. słowiańska mutacja genu *NBS1* występuje w populacji Polski z częstością przekraczającą 0,5 proc., a ryzyko zachorowania jej heterozygotycznych nosicieli na nowotwór złośliwy jest ponadczterokrotnie zwiększone [36].

Poznanie sekwencji genów w genomie człowieka otwiera duże możliwości badawcze, aczkolwiek najistotniejszym jest poznanie funkcji tych genów oraz występujących interakcji pomiędzy nimi. Wprowadzanie nowych technik do analizy

genomu, m.in. techniki mikromacierzy, pozwala na ocenę tysięcy indywidualnych mRNA w bardzo krótkim czasie. Zwłaszcza ocena aktywności genów zaangażowanych w popromienną naprawę DNA może być niezwykle użyteczna w prognozowaniu odpowiedzi komórki na działanie promieniowania jonizującego.

Badania nad molekularnymi mechanizmami odpowiedzi komórki na napromienianie są w początkowej fazie, aczkolwiek budzą wiele nadziei na lepsze ich poznanie i co za tym idzie – ewentualne możliwości modyfikacji terapii. Pewną przeszkodą może być fakt braku jednoznacznie skorelowanej zwiększonej wrażliwości jednego typu zdrowych komórek z identyczną promieniowrażliwością innego typu komórek u tego samego pacjenta. Można, co najwyżej rozpoznać zwiększoną promieniowrażliwość, z tym jednak zastrzeżeniem, że stopień jej ekspresji może być znacząco różny dla poszczególnych narządów [37].

Inną ważną przesłanką wynikającą z badań nad genetycznie uwarunkowaną promieniowrażliwością, jest jej zależność od ekspresji dotychczas nieujawnionych jeszcze genów, a ponadto jest ona wypadkową współdziałania wielu genów, dodatkowo modyfikowaną przez czynniki zewnętrzne. Z tego też względu, istotnego przełomu w badaniach nad genetyczną oceną promieniowrażliwości będzie można oczekiwać w wyniku wdrożenia nowych technik, wspomnianych wcześniej, tj. oceny mikromacierzy (*microarray assay*) z wykorzystaniem komputerowej analizy otrzymanych wyników (biostatystyka) i lepszego poznania funkcji genów zaangażowanych w odpowiedzi komórki na napromienianie [38].

PODSUMOWANIE

Perspektywa prognozowania reakcji na napromienianie zdrowych komórek pacjenta oraz komórek no-

wotworowych jest niezwykle kusząca. Klinicysta, posiadając narzędzie w postaci wiarygodnego testu promieniowrażliwości mógłby precyzyjnie planować leczenie (indywidualizacja postępowania), uwzględniając ryzyko wystąpienia powikłania u chorego oraz prognozując odpowiedź na zastosowany rodzaj terapii (radioterapia, chemioterapia). Pozwoliłoby to zapewne na lepsze wykorzystanie posiadanych metod leczenia, a nadto zaoszczędziłoby wielu chorym cierpienia, będącego następstwem wystąpienia powikłań popromiennych.

Dowodem dużego zainteresowania opisaną tematyką było zorganizowane w ostatnim okresie (maj 2003 r.) przez Niemieckie Centrum Badań nad Rakiem w Heidelbergu sympozjum na temat biologicznych podstaw wrażliwości na promieniowanie jonizujące. Żałować można tylko, że sympozjum było zdominowane przez biologiczny punkt widzenia, z nikłym odniesieniem do praktyki radioterapeutycznej. Należy jednak nadmienić, że organizatorzy przewidują kontynuowanie kolejnych spotkań, z zakładanym większym udziałem klinicystów.

PIŚMIENNICTWO

1. Szumiel I. *Intrinsic radiosensitivity of proliferating mammalian cells*. *Advances in Radiation Biology* 1981; 9: 281-321.
2. Tucker SL, Thames HD. *The effect of patient-to patient variability on the accuracy of predictive assays of tumor response to radiotherapy – a theoretical evaluation*. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 1989; 17: 145-57.
3. Tucker SL, Geara FB, Peters LJ, Brock WA. *How much could the radiotherapy dose be altered for individual patients based on predictive assay of normal-tissue radiosensitivity?* *Radiother Oncol* 1996; 38: 103-13.
4. Burnet NG, Johansen J, Turesson I, Nyman J, Peacock JH. *Describing patients' normal tissue reactions: concerning the possibility of individualising radiotherapy dose prescriptions based on potential predictive assays of normal tissue radiosensitivity*. *Int J Cancer* 1998; 79: 606-13.

5. Burnet NG, Nyman J, Turesson I, et al. *Potential for improving radiotherapy cure rates by predicting normal tissue tolerance from in vitro cellular radiation sensitivity*. *Lancet* 1992; 339: 1570-1.
6. Russell NS, Knaken H, Bruinvis IA, et al. *Qualification of patients to patient variation of skin erythema developing as a response to radiotherapy*. *Radiother Oncol* 1994; 30: 213-21.
7. Bush D. *Genetic susceptibility to radiation and chemotherapy injury: diagnosis and management*. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 1994; 30: 997-1002.
8. Andreassen CN, Alsner J, Ovegaard J. *Does variability in normal tissue reactions after radiotherapy have a genetic basis – where and how to look for it?* *Radiother Oncol* 2002; 64: 131-40.
9. Bartelink H, Begg A, Martin JC, van Dijk M, van't Veer M, van der Vaart P, Verheij M. *Towards prediction and modulation of treatment response*. *Radiother Oncol* 1999; 50: 1-11.
10. Budach W. *Genetic predisposition and radiation sensitivity of tumors*. *Strahlenther Onkol* 1997; 173: 469-79.
11. Overgaard J, Hansen HS, Jorgensen K, et al. *Primary radiotherapy of larynx and pharynx carcinoma – an analysis of some factors influencing local control and survival*. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 1986; 12: 515.
12. Lundahl RE, Foote RL, Bonner JA, Suman VJ, Lewis JE, Kaperbauer JL, McCaffrey TV, Olsen KD. *Combined neck dissection and postoperative radiation therapy in the management of high-risk neck: a matched-pair analysis*. *Int Radiat Oncol Biol Phys* 1998; 40: 529-34.
13. Dubben HH, Thames HD, Beck-Bornholdt HP. *Tumor volume: a basic and specific response predictor in radiotherapy*. *Radiother Oncol* 1998; 47: 167-74.
14. Parsons JT, Mendenhall WM, Stringer SP, Cassisi NJ, Million RR. *An analysis of factors influencing the outcome of postoperative irradiation for squamous cell carcinoma of the oral cavity*. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 1997; 39: 137-48.
15. Zatterstrom UK, Wennerberg J, Ewers SB, Willen R, Attewell R. *Prognostic factors in head and neck cancer: histologic grading, DNA ploidy, and nodal status*. *Head Neck* 1991; 13: 477-87.
16. Radford IR. *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 Oncol Biol Phys* 1986; 49: 611-20.

17. Venkitaraman AR. *A growing network of cancer-susceptibility genes*. N Engl J Med 2003; 8: 1917-9.
18. Maciejewski B. *Tolerancja zdrowych zdrowych tkanek w radioterapii nowotworów. Odczyny popromienne*. Wydawca – Centrum Onkologii, Gliwice 1991.
19. Fertil B, Malaise EP. *Intrinsic radiosensitivity of human cell lines is correlated with radioresponsiveness of human tumours. Analysis of 101 published survival curves*. Int Radiat Oncol Biol Phys 1985; 11: 1699-707.
20. Opptiz U, Baier K, Wulf J, Schakowski R, Flentje M. *The in vitro colony assay: a predictive of clinical outcome*. Int J Radiat Biol 2001; 77: 105-10.
21. Bjork-Eriksson T, West C, Karlsson E, Mercke C. *Tumor radiosensitivity (SF2) is a prognostic factor for local control in head and neck cancers*. Int J Radiat Oncol Biol Phys 2000; 46: 13-9.
22. Hsu TC. *Bleomycin test for evaluation DNA damage*. In Vitro Cell Dev Biol 1987; 23: 591-603.
23. Geara FB, Peters LJ, Ang KK, et al. *Prospective comparison of in vitro normal cell radiosensitivity and normal tissue reactions in radiotherapy patients*. Strahlenther Oncol 1992; 27: 1173-9.
24. Burnet NG, Nyman J, Turesson I, et al. *The relationship between cellular radiation sensitivity and tissue response may provide the basis for individualising radiotherapy schedules*. Radiother Oncol 1994; 33: 228-38.
25. Jarmuż M, Szyfter K. *Zastosowanie testu bleomycynowego do określenia predyspozycji genetycznej do zachorowania na nowotwory*. Współczesna Onkol 1999; 5: 188-90.
26. Szyfter K. *Rola czynnika genetycznego w powstaniu i przebiegu płaskonabłonkowego raka krtani*. Postępy w chirurgii głowy i szyi 2002; 1: 5-19.
27. Cloos J, Steen J, Timmerman AJ, et al. *DNA – damage processing in blood lymphocytes of head – and – neck squamous cell carcinoma patients in dependent on tumour site*. Int J Cancer 1996; 27: 26-9.
28. Wada S, Kurahayashi H, Kobayashi Y, Funayama T, et al. *The relationship between cellular radiosensitivity and radiation-induced DNA damage measured by the comet assay*. J Vet Med Sci 2003; 65: 471-7.
29. Le QT, Kovacs MS, Dorie MJ, Koong A, et al. *Comparison of the comet assay and the oxygen microelectrode for measuring tumour oxygenation in head and neck cancer patients*. Int J Radiat Oncol Biol Phys 2003; 56: 375-83.
30. Palyvoda O, Polanska J, Wygoda A, Rzeszowska-Wolny J. *DNA damage and repair in lymphocytes of normal individuals and cancer patients: studies by the comet assay and micronucleus tests*. Acta Biochem Pol 2003; 50: 181-90.
31. Sarkaria JN, Bush C, Eady JJ, Peacock JH, Steel GG, Yarnold JR. *Comparison between pulsed-field gel electrophoresis and the comet assay as predictive for radiosensitivity in fibroblasts*. Radiat Res 1998; 150: 17-22.
32. Shibamoto Y, Sterffer C, Fuhrmann C, Budach V. *Tumour radiosensitivity prediction by the cytokinesis-block micronuclei assay*. Radiat Res 1991; 128: 29.
33. Coleman CN. *Clinical applications of molecular biology in radiation oncology*. Semin Radiat Oncol 1996; 6: 245-9.
34. Elkind MM. *DNA repair and cell repair, are they related?* Int J Radiat Oncol Biol Phys 1979; 5: 1089-94.
35. Coleman CN. *Of what use is molecular biology to the practicing radiation oncologist?* Radiother Oncol 1998; 46: 117-25.
36. Steffen J, Siwicki JK. *Molekularna patogeneza zespołu Nijmegen. Implikacje dla postępu wiedzy o mechanizmach rozwoju nowotworów na podłożu defektów łączenia dwuniciowego pęknięcia DNA*. Nowotwory 2000; 5: 507-14.
37. Arrand JE, Kysela B. *Molecular analysis of radiation damage and repair in normal and mutant cells*. Br J Radiol 1992; 24: 43-7.
38. Hartman AK, Modlich D, Prisack BH, Gerlach B, Bajor H. *Gene expression profiling of advanced head and squamous cell carcinoma and two squamous cell carcinoma cell lines under radio/chemotherapy using cDNA arrays*. Radiother Oncol 2002; 63: 309-20.
39. Brock WA, Tucher SL. *In vitro radiosensitivity and normal tissue damage*. Radiother Oncol 2000; 55: 93-4.
40. Brown JM, Evans J, Kovacs MS. *The prediction of human tumour radiosensitivity in situ: an approach using chromosome aberrations detected by fluorescence in situ hybridization*. Int J Radiat Oncol Biol Phys 1992; 24: 279-86.
41. Coco JM, Mooren E, Ottenheim C, et al. *Potential of radiation-induced chromosome aberrations to predict radiosensitivity in human tumour cells*. Int J Radiat Biol 1999; 75: 1161-8.
42. Alsner J, Sorensen BS, Overgaard J. *TP 53 mutation is related to poor prognosis after radiotherapy, but not surgery in squamous cell carcinoma of the head and neck*. Radiother Oncol 2001; 59: 179-85.
43. Rudat V, Dietz A, Nollert J, Condradt C, Weber JK, Flentje M, Wannemacher M. *Acute and late toxicity, tumour control and intrinsic radiosensitivity of primary fibroblasts in vitro of patients with advanced head and neck cancer after concomitant boost radiochemotherapy*. Radiother Oncol 1999; 53: 233-45.

ADRES DO KORESPONDENCJI

dr med. **Plotr Milecki**
Zakład Radioterapii
Wielkopolskie Centrum Onkologii
ul. Garbary 15
61-866 Poznań
e-mail: pmilecki@wco.pl