

# Czynniki przepowiadające nawrót nowotworu narządów głowy i szyi po radioterapii

*Adrian C. Begg, PhD*

Semin Radiat Oncol 2012, 22: 108-118.

**Dr Begg.**

Division of Experimental Therapy,  
The Netherlands Cancer Institute,  
Amsterdam, Holandia.

**Adres do korespondencji:**

Adrian C. Begg, PhD,  
Division of Experimental Therapy,  
The Netherlands Cancer Institute,  
Plesmanlaan 121,  
1066 CX Amsterdam,  
The Netherlands;  
e-mail: a.begg@nki.nl

Rak płaskonabłonkowy głowy i szyi (head and neck squamous cell carcinoma, HNSCC) jest szóstym pod względem częstości występowania nowotworem na świecie. Główną metodą leczenia jest radioterapia, stosowana wyłącznie u chorych na nowotwory we wczesnym stadium zaawansowania lub w skojarzeniu z chemioterapią u chorych na nowotwory bardziej zaawansowane. Pięcioletnie przeżycie całkowite wynosi około 50%, co świadczy o tym, że leczenie często jest nieskuteczne. Możliwość przewidywania odpowiedzi na leczenie z jednej strony pozwoli uchronić chorych przed nieskutecznym i szkodliwym postępowaniem, z drugiej zaś ułatwi wybór skuteczniejszej metody. Opracowano testy czynnościowe i genetyczne umożliwiające przewidywanie wrażliwości nowotworu na radioterapię, niedotlenienie oraz na ocenę jego zdolności do repopulacji. W wielu badaniach wykazano jednak, że wyniki niewielu z nich korelują z wynikami leczenia. Pewne nadzieje w ocenie niedotlenienia wiąże się z oznaczaniem profilu mRNA i mikroRNA, podczas gdy ekspresja receptora naskórkowego czynnika wzrostu w połączeniu z metodami oceny stopnia zróżnicowania nowotworu są obiecującym narzędziem określania szybkości repopulacji. Dotychczasowe testy oceniające wrażliwość nowotworu na radioterapię są nieskuteczne. Zachęcające wyniki przyniosły badania przedkliniczne poświęcone testom oceny białek naprawy DNA. Pewne nadzieje wiąże się także z metodami oceny populacji nowotworowych komórek macierzystych w badaniach klinicznych. Wyjątkowo obiecującymi narzędziami pozwalającymi przewidzieć wyniki leczenia chorych na HNSCC są również analiza wykrywająca obecność wirusa brodawczaka ludzkiego oraz analiza ekspresji receptora naskórkowego czynnika wzrostu. Żadne z tych badań, podobnie jak analiza komórek macierzystych, nie wskazują alternatywnych i skuteczniejszych metod leczenia chorych obciążonych złym rokowaniem. Bardzo cenna byłaby możliwość posługiwania się testem pozwalającym przewidzieć korzyści wynikające z zastosowania u danego chorego postępowania kojarzącego nowe leki o działaniu ukierunkowanym molekularnie z radioterapią w celu uzyskania lepszej odpowiedzi. Szczególnie potrzebne są testy wykorzystujące mutacje nowotworu i ułatwiające wybór metody swoistej skutecznej wobec niego. Trwają prace nad testami przepowiadającymi oceniającymi zaburzenia w szlakach naprawy pęknięć pojedynczej i podwójnej nici DNA. Umożliwią one dobór leków, dla których działania punktami uchwytu będą odpowiednie zastępcze szlaki naprawy. Wykorzystuje się tu koncepcję tzw. syntetycznej letalności. Jest to jeden z najbardziej obiecujących obszarów badań nad przewidywaniem wyników leczenia, zarówno dziś, jak i w przyszłości.

**D**o płaskonabłonkowych nowotworów narządów głowy i szyi (HNSCC) należą raki jamy ustnej, gardła i krtani. Zajmują one szóste miejsce wśród nowotworów najczęściej występujących na świecie,<sup>1</sup> a zachorowalność na nie sięga rocznie 600 000 osób. Pięcioletnie odsetki przeżycia całkowitego wynoszą w tej grupie chorych najwyżej 50%, dlatego należy dążyć do opracowania skuteczniejszych metod ich leczenia. Wśród metod wykorzystywanych obecnie są radioterapia w połączeniu z chemioterapią lub bez niej, leczenie chirurgiczne stosowane wyłącznie lub wraz z radioterapią bądź chemioterapią, a ostatnio również radioterapia w połączeniu z lekami o działaniu ukierunkowanym molekularnie, takimi jak cetuksymab. Wybór leczenia zależy od czynników klinicznych, takich jak umiejscowienie nowotworu, stopień jego zaawansowania i wielkość. Wykorzystywany obecnie system określania stopnia zaawansowania HNSCC tłumaczy zblizoną do 30% zmienność w obserwowanych odsetkach przeżycia.<sup>2,3</sup> Poza tym systemem (klasyfikacją pierwotnego guza, stanu węzłów chłonnych i przerzutów odległych) ważnym czynnikiem klinicznym pozwalającym przewidzieć wynik leczenia jest objętość nowotworu.<sup>4-6</sup> Nawet jednak po uwzględnieniu stopnia zaawansowania i objętości nowotworu prawdopodobieństwo przeżycia poszczególnych chorych i nawrotu nowotworu jest bardzo zmienne. Biorąc pod uwagę typową dla nowotworów, w tym nowotworów narządów głowy i szyi, niestabilność genomu, można przypuszczać, że za pozostałe różnice odpowiadają czynniki biologiczne, znacznie zróżnicowane między poszczególnymi nowotworami.

Cenna byłaby zatem możliwość wcześniejszego przewidzenia, którzy z chorych odniosą korzyść dzięki radioterapii. Jeszcze lepiej byłoby móc zaoferować chorym na nowotwory odporne na radioterapię alternatywne lub dodatkowe metody leczenia. Znaczną korzyść przyniosłoby też przewidywanie odpowiedzi na leki cytotoksyczne, które można kojarzyć z radioterapią. Dzięki opracowywaniu modyfikatorów odpowiedzi biologicznej nasilających odpowiedź na napromienianie i przewidywaniu ich skuteczności w odniesieniu do danego nowotworu znacznie łatwiej byłoby dobrać właściwe leczenie. Najlepiej byłoby stworzyć metody oceniające prawdopodobieństwo nawrotu nowotworu po zastosowaniu każdej z opcji terapeutycznych.

Opierając się na wynikach wielu badań, zidentyfikowano trzy główne czynniki biologiczne decydujące o odpowiedzi HNSCC na radioterapię frakcjonowaną: wrażliwość komórek nowotworu na działanie promieniowania,<sup>7</sup> stopień niedotlenienia nowotworu<sup>8,9</sup> oraz zdolność jego komórek przetrwałych po napromienianiu do repopulacji podczas przerw w leczeniu.<sup>10,11</sup> Następnie wykazano, że występowanie w obrębie nowotworu wirusa brodawczaka ludzkiego (human papilloma virus,

HPV) jest znaczącym czynnikiem przepowiadającym przeżycie, zwłaszcza chorych na raka ustnej części gardła (Leemans CR i wsp.<sup>12</sup> wraz z piśmiennictwem). Na odpowiedź nowotworu mogą też wpływać czynniki zależne od organizmu gospodarza, takie jak unaczynienie nowotworu i naciekanie jego komórek przez komórki gospodarza. Niewykluczone, że zarówno HPV, jak i czynniki zależne od gospodarza wpływają na odpowiedź nowotworu na radioterapię przez modyfikowanie co najmniej jednego z trzech najważniejszych procesów biologicznych (wewnętrznej wrażliwości na napromienianie, niedotlenienie i zdolność do repopulacji).

W leczeniu chorych na zaawansowane nowotwory radioterapię często łączy się z chemioterapią, zwykle cisplatyną lub taksoidami.<sup>13</sup> Leki te wywołują na ogół działania niepożądane o różnym nasileniu, mogą zatem zwiększyć chorobowość powodowaną przez radioterapię. Dlatego dostępność rzetelnych czynników przepowiadających skuteczność ich działania powinna ułatwić podjęcie decyzji o ich zastosowaniu. Możliwość uchronienia chorych przed powikłaniami w następstwie stosowania mało skutecznego leku byłaby kolejnym krokiem w kierunku ulepszenia postępowania.

Obok klasycznych leków stosowanych w chemioterapii w ostatniej dekadzie opracowano wiele leków o działaniu ukierunkowanym molekularnie, projektowanych w celu uzyskania większej swoistości i mniejszej toksyczności. Przykładem takiego leku stosowanego u chorych na nowotwory narządów głowy i szyi jest cetuksymab, inhibitor receptora naskórkowego czynnika wzrostu (epidermal growth factor receptor, EGFR).<sup>14</sup> Opracowano też inne leki, dla których działania punktami uchwytu są geny lub szlaki przemian często ulegające zaburzeniom w komórkach nowotworowych. Przydatność wielu z nich jest obecnie oceniana w badaniach klinicznych. Przykładami szlaków przemian, będących punktami uchwytu działania takich leków, są szlak kinazy 3 fosfoinozytydu (phosphoinositide 3-kinase, PI3K), szlak wzmacniacza genu łańcucha lekkiego czynnika jądrowego kappa w komórkach B (nuclear factor kappa light polypeptide gene enhancer in B cells, NF-KB1), szlak kinazy białkowej aktywowanej mitogenem (mitogen-activated protein kinase, MAPK) oraz angiogeneza.<sup>15</sup> Skuteczność leków o ukierunkowanym działaniu jest odmienna u chorych na różne nowotwory, poza tym ich stosowanie niemal zawsze wywołuje działania niepożądane. Dlatego możliwość wykorzystania dobrych czynników przepowiadających ich skuteczność u poszczególnych chorych byłaby bardzo korzystna, pozwoliłaby bowiem poprawić wyniki leczenia i zmniejszyć jego toksyczność.

Najbardziej pożądane byłyby leki swoiste dla określonego nowotworu, a jednocześnie nieznacznie lub słabiej oddziałujące na tkanki prawidłowe. Opracowanie

takich leków jest od dziesięcioleci celem wielu badań uznawanych za Świętego Graala w badaniach nad nowotworami i ich leczeniem. W ostatnich latach opracowano koncepcję tzw. syntetycznej letalności, czyli mechanizmu polegającego na uszkodzeniu wyłącznie komórek nowotworowych. Zakłada ona, że spowodowanie śmierci komórki wymaga inaktywacji dwóch szlaków przemian, ponieważ inaktywacja jednego z nich nie wystarcza. Jeden ze szlaków może być szlakiem zastępczym dla drugiego i w razie jego uszkodzenia przejmuje jego funkcję, ratując komórkę przed śmiercią.

Nowotwory są z definicji niestabilne genetycznie i występują w nich tysiące mutacji.<sup>16,17</sup> W komórkach wielu nowotworów zaburzenia genetyczne wpływają na szlaki przemian odpowiedzi na leczenie. Swoiste dla danego nowotworu mutacje można wykorzystać, podając lek inaktywujący zastępcze szlaki naprawy. Takie postępowanie nie wpłynie wyraźnie na komórki prawidłowe, w których główny szlak działa sprawnie i wyłączenie szlaku zastępczego nie będzie miało znaczenia. Najbardziej obiecującym przykładem jest wykorzystanie inhibitorów polimerazy poli(ADP-rybozy) (poly ADP ribose polymerase, PARP) u chorych na raka piersi, w których komórkach nie doszło do uaktywnienia genu wczesnego raka piersi (breast cancer early onset, BRCA).<sup>18-20</sup> Nienaprawione pęknięcia pojedynczych nici DNA (single strand breaks, SSB) podczas prób replikacji ulegają konwersji do pęknięć podwójnych (double strand breaks, DSB), naprawianych w szlaku naprawy DSB w mechanizmie homologicznej rekombinacji (HR). Produkty genów *BRCA1* i *BRCA2*, odpowiedzialnych za podatność na zachorowanie na raka piersi, są częścią szlaku przemian HR. Inhibitory PARP utrudniają naprawę SSB, dlatego podczas naprawy uszkodzeń DNA komórki bardziej polegają na szlaku HR. Nowotwory, w których nastąpiło zaburzenie szlaku HR, czyli powstałe u nosicieli mutacji genów *BRCA*, są zatem bardzo wrażliwe na działanie leków tej grupy. Opisana sytuacja jest dobrym przykładem syntetycznej letalności, czyli hamowania przez lek jednego szlaku w połączeniu z mutacją inaktywującą inny. Nowym bardzo cennym czynnikiem przewidywanym byłoby zatem ustalenie, w których szlakach przemian danego nowotworu nastąpiły zaburzenia. Ułatwiłoby to dobór leczenia ukierunkowanego na szlak zastępczy.

Różne aspekty przewidywania omówiono niżej, zwłaszcza w odniesieniu do leczenia chorych na HNSCC, polegającego m.in. na zastosowaniu radioterapii. Najpierw zostaną omówione metody oparte na hipotezach, w których poszukiwano czynników przewidywających odpowiedź na znane procesy biologiczne o potwierdzonym wpływie na przebieg choroby. Procesami tymi są wrażliwość na działanie promieniowania, niedotlenienie, wskaźnik repopulacji i inne. Następnie

zostaną omówione także strategie oparte na danych, w tym na prowadzonych na szeroką skalę badaniach przesiewowych całego genomu, podczas których poszukuje się genów pojedynczych lub grup genów najlepiej korelujących z przebiegiem choroby. Mogą one dostarczyć informacji o genach, których wcześniej nie brano pod uwagę, a które również mogą wpłynąć na wynik leczenia.

#### PROMIENIOWRAŻLIWOŚĆ

Początkowo opracowano testy czynnościowe dla zawiesiny komórek uzyskanych podczas biopsji poprzedzającej operację. Oceniano ich wrażliwość na działanie promieniowania *in vitro*. Pierwsze takie badania przeprowadzono na komórkach raka szyjki macicy,<sup>21</sup> a w następnych wykorzystano komórki nowotworów narządów głowy i szyi.<sup>7</sup> U wszystkich tych chorych wyniki radioterapii były gorsze, gdy nowotwór był oporny na napromienianie *in vitro* w porównaniu z wynikami chorych na nowotwory wrażliwe na napromienianie *in vitro*. Przyjęto zatem zasadę, że wrażliwość na działanie promieniowania jest ważnym czynnikiem pozwalającym przewidzieć wyniki leczenia chorych na HNSCC. Techniki tej nie można jednak wykorzystywać rutynowo, ponieważ jest zbyt czasochłonna i musi być stosowana w laboratoriach specjalistycznych przez wyszkolony personel, a takie warunki są w większości szpitali niedostępne.

Następnie oceniono przydatność kilku mniej czasochłonnych testów zastępczych badających wrażliwość na działanie promieniowania, w tym testy oceniające pęknięcia DNA, zaburzenia chromosomalne i apoptozę.<sup>22</sup> Ich przydatność w praktyce klinicznej w roli czynników przewidywających była zmienna i często trudno ją było potwierdzić. Stwierdzono też słabą korelację z wynikami testów bezpośrednio oceniających promieniowrażliwość w liniach komórkowych. W teście, który można uznać za rozszerzenie metod analizy chromosomalnej lub pęknięć DNA, oznaczano amplifikacje i delecje w całym genomie, stosując wydajną metodę porównawczej hybrydyzacji genomowej (comparative genomic hybridization, CGH).<sup>23</sup> Wykazano, że w liniach komórek HNSCC swoiste zaburzenia genomu korelują z promieniowrażliwością.<sup>24</sup> van den Broek i wsp.<sup>25</sup> wykorzystali CGH do badań wycinków HNSCC pobranych drogą biopsji. Wykazali znamiennej korelację występowania dodatkowych lub utraty określonych regionów chromosomalnych z wynikami radioterapii połączonej z podaniem cisplatyny. Podobnie jak dla wielu innych badań nad czynnikami predykcyjnymi, również wiarygodności wyników tego badania nie oceniono niezależnie, nie dostarczyło też ono informacji mechanistycznych. Nadal

nie wiadomo zatem, jak leczyć chorych opornych na napromienianie. Konieczne jest przeprowadzenie dalszych badań, które potwierdzą uzyskane dotychczas wyniki i pozwolą odnaleźć geny sprawcze w zmienionych fragmentach genomu.

Ostatnio badania molekularne poświęcone odpowiedzi na uszkodzenia DNA doprowadziły do opracowania kolejnego testu czynnościowego. Najbardziej śmiertelny dla komórki uszkodzeniem DNA indukowanym przez promieniowanie jonizujące jest DSB. W ciągu kilku minut od wystąpienia DSB podtyp histonu zwany H2AX (białko chromatyny) ulega miejscowej fosforylacji, zwykle przez kinazę ulegającą mutacji w ataksji-teleangiektazji (AMT, gen ulegający mutacji u chorych z tym zaburzeniem). Fosforylacja jest rozległa, sięga do megabazy z obu stron miejsca występowania DSB. Opracowano przeciwciała, które z dużą swoistością rozpoznają ufosforylowany H2AX (gamma-H2AX lub  $\gamma$ -H2AX). Przeciwciała te ujawniają występowanie dyskretnych skupisk  $\gamma$ -H2AX po napromienianiu. Każde takie ognisko (z kilkoma wyjątkami) odpowiada występowaniu DSB. To pozwala na cechujące się dużą czułością oznaczenie indukcji i naprawy DSB, jednego z najważniejszych czynników w określeniu promieniowrażliwości. W wielu badaniach wykazano dobrą korelację ognisk  $\gamma$ -H2AX wykrytych 24 godziny po napromienianiu a wrażliwością danego nowotworu na radioterapię.<sup>26</sup> Metoda jest obecnie oceniana w badaniach klinicznych i stanowi, obok innych metod wykrywania takich ognisk, obiecujące narzędzie przewidywania odpowiedzi na radioterapię. Do dziś przeprowadzono tylko jedno stosunkowo niewielkie badanie kliniczne, w którym nie wykazano znamiennej korelacji między występującymi ogniskami  $\gamma$ -H2AX a wynikami stosowania radioterapii u chorych na raka szyjki macicy.<sup>27</sup> Rezultaty przeprowadzonego niedawno badania przedklinicznego pozwalają natomiast przypuszczać, że ognisk  $\gamma$ -H2AX należy poszukiwać jedynie w regionach nowotworu cechujących się dobrym przepływem,<sup>28</sup> czego nie uwzględniono w omówionym badaniu klinicznym. Konieczne jest przeprowadzenie dalszych dużych badań klinicznych poświęconych temu zagadnieniu.

W ostatnich latach dokonano logicznego przejścia od badań funkcjonalnych do badań genetycznych o dużej sile statystycznej. Obejmujące cały genom testy ekspresji genów, prowadzone z zastosowaniem technologii mikromacierzy, wykorzystano do identyfikacji grup genów korelujących z promieniowrażliwością, a tym samym pozwalających na jej przewidzenie. Dwie przepowiadające sygnatury genowe wykryto, analizując cały lub część panelu obejmującego 60 linii komórek nowotworowych National Cancer Institute.<sup>29,30</sup> Niestety, panel ten nie zawiera komórek HNSCC. W laborato-

rium, w którym pracuje autor tego artykułu, podjęto zatem próbę identyfikacji związanej z promieniowrażliwością sygnatury genowej w panelu 33 linii komórkowych HNSCC. Zidentyfikowano zestawy genów o słabej i nieznamiennej korelacji (deJong M i Begg AC, dane niepublikowane). Sygnatura opisana przez Torres-Rocę i wsp.<sup>29</sup> nie korelowała z przebiegiem nowotworu w grupie chorych otrzymujących radioterapię z cisplatiną.<sup>31</sup> Wykryto też zmodyfikowaną sygnaturę o marginalnej znamienności.<sup>32</sup> Sygnatura opisana przez Amundsona i wsp.,<sup>30</sup> określona w analizie 60 linii komórek nowotworowych (pełny panel National Cancer Institute), nie wykazała wartości przepowiadającej w grupie chorych na raka krtani poddanych wyłącznie radioterapii.<sup>33</sup>

Przyczyn niewielkiej mocy przepowiadającej omawianych sygnatur może być kilka. Promieniowrażliwość danego nowotworu nie zawsze jest znamiennym czynnikiem pozwalającym przewidzieć wynik leczenia, choć jest to raczej nieprawdopodobne, biorąc pod uwagę znaczną zmienność wrażliwości różnych linii komórkowych HNSCC na działanie promieniowania oraz czas, w jakim przeprowadzano badania czynnościowe.<sup>7</sup> Bardziej prawdopodobną przyczyną są ograniczenia wynikające z modeli linii komórkowych *in vitro*, zwykle poddawanych wielokrotnemu pasażowaniu w sztucznych warunkach wzrostu, co sprawia, że mogą one nie odzwierciedlać dokładnie sytuacji *in vivo*. Niedawno wykryto ponad 2200 znamiennych różnic w metylacji promotorów między komórkami linii HNSCC a ich guzami pierwotnymi. Takich znamiennych różnic nie stwierdzono między przeszczepami guza do obcego gatunku a pierwotnymi nowotworami chorych,<sup>34</sup> co odzwierciedla nasilenie zmian, do których może dojść w warunkach hodowli komórkowej. Niezbędne są lepsze modele *in vitro* i obecnie trwają prace nad ich stworzeniem.

#### NIEDOTLENIE

Pierwsze badania typu proof-of-principle dowodzące ważnej roli niedotlenienia w napromienianych nowotworach również oparto na testach czynnościowych, zwłaszcza bezpośrednim pomiarze wysycenia tlenem, przeprowadzonym za pomocą elektrod wprowadzanych do ogniska nowotworu.<sup>35,36</sup> Wykazały one, że niedotlenienie jest niekorzystnym czynnikiem rokowniczym odpowiedzi nie tylko na radioterapię, lecz również na leczenie operacyjne i chemioterapię. Prawdopodobnym wyjaśnieniem odpowiedzi na radioterapię jest 2-3-krotnie większa oporność niedotlenionych komórek na napromienianie w porównaniu z opornością komórek o prawidłowej zawartości tlenu.

U chorych poddawanych chemioterapii komórki niedotlenione często tworzą skupiska oddalone od naczyń krwionośnych, a tym samym niedostępne dla leku. Cykl komórkowy w warunkach niedotlenienia jest ponadto wolniejszy lub zatrzymuje się, co pogłębia oporność na działanie leków. W związku z leczeniem chirurgicznym niedotlenienie może sprzyjać większej oporności komórek na apoptozę<sup>17</sup> i tworzeniu się fenotypu zwiększającego skłonność do powstawania przerzutów.<sup>38</sup> W kilku badaniach, podczas których wykorzystano elektrody tlenowe, stwierdzono silny związek między niedotlenieniem a gorszymi wynikami radioterapii uzyskiwanymi u chorych na HNSCC.<sup>8,39</sup> Przydatność tej metody jest jednak ograniczona do łatwo dostępnych ognisk nowotworu, poza tym badanie jest inwazyjne. Podejmowane obecnie wysiłki skupiają się na opracowaniu skutecznych alternatywnych metod oceny niedotlenienia guza.

Kilka genowych sygnatur niedotlenienia zidentyfikowano w hodowlach komórkowych, w których po ekspozycji komórek na warunki niedoboru tlenu o różnym natężeniu i czasie trwania monitorowano zmiany w ekspresji genów.<sup>40,41</sup> Opisana w badaniach *in vitro* sygnatura genuwa niedotlenienia okazała się czynnikiem przepowiadającym w raku piersi.<sup>40</sup> U chorych na raka krtani poddanych wyłącznie radioterapii analiza jednoczynnikowa również wykazała znamiennej korelację z miejscowym opanowaniem nowotworu, choć znamienność ta zanikała po przeprowadzeniu analizy wieloczynnikowej.<sup>33</sup> Winter i wsp.<sup>42</sup> posłużyli się inną metodą w celu określenia metagenu niedotlenienia złożonego z genów podlegających wspólnej regulacji z 10 genami podstawowymi, o których wiadomo, że są związane z odpowiedzią na niedotlenienie (ponieważ należą do szlaku czynnika indukowanego niedotlenieniem [hypoxia induced factor, HIF]). Badania prowadzili w serii nowotworów narządów głowy i szyi. Uzyskany zestaw 99 genów odpowiada sygnaturze niedotlenienia *in vivo*. Okazała się ona znamienym czynnikiem przepowiadającym wynik leczenia chirurgicznego chorych na HNSCC.<sup>42</sup> Nie pozwala jednak przewidzieć odpowiedzi na skojarzone leczenie takich chorych napromienianiem i cisplatiną,<sup>33</sup> choć wykazano nieznamiennej tendencję do przewidywania wyniku radioterapii u chorych na raka krtani we wczesnym stopniu zaawansowania.<sup>33</sup>

MikroRNA (miRNA) regulują ekspresję nawet do 50% ludzkich genów, w tym także genów związanych z promieniowrażliwością.<sup>43-45</sup> W przebiegu nowotworów często obserwuje się zachodzące w nich zmiany.<sup>46</sup> Ocena profilu ekspresji miRNA jest zatem cennym narzędziem w poszukiwaniu czynników pozwalających przewidzieć wynik leczenia, przynoszącym dodatkową informację, niezależną od określania profilu mRNA. Stwierdzono pobudzenie niektórych miRNA w warunkach niedotlenienia, dostrzeżono też znacze-

nie rokownicze jednego z nich u chorych na HNSCC poddawanych radioterapii po operacji.<sup>47</sup> Może być to przydatny i stosunkowo łatwy do oznaczenia wskaźnik niedotlenienia, dostępny w większości ośrodków, choć uzyskane wyniki wymagają potwierdzenia w niezależnych badaniach.

Odpowiedź na niedotlenienie na poziomie transkrypcji, translacji i obróbki potranslacyjnej skupiła na sobie uwagę wielu badaczy, co zaowocowało m.in. dokładnym poznaniem szlaku przemian HIF. W uproszczeniu w warunkach niedotlenienia HIF-1 $\alpha$  ulega nasilonej ekspresji przez zahamowanie degradacji. Wiąże się ze swoim niezależnym od niedotlenienia partnerem, HIF-1 $\beta$ . Obie cząsteczki działają wspólnie jako czynnik transkrypcji uruchamiający ekspresję kilku genów zawierających w swoich regionach promotorowych sekwencje odpowiedzi na niedotlenienie.<sup>48</sup> Wśród genów odpowiadających na HIF znajdują się m.in. gen anhidrazy węglanowej (carbonic anhydrase, CA9), geny transporterów glukozy, takie jak GLUT1, a także gen czynnika wzrostu śródbłonka naczyń. Następnie oceniano ekspresję wyłącznie HIF-1 $\alpha$  oraz aktywowanych przez niego genów jako możliwych markerów niedotlenienia. Wykorzystano w tym celu standardowe metody immunohistochemiczne. Korelacja z wynikiem leczenia była zmienna,<sup>49</sup> a jednym z czynników utrudniających interpretację jest to, że niemal wszystkie te geny są także regulowane przez czynniki inne niż niedotlenienie. Są one odmienne w różnych nowotworach, co wynika z niestabilności genetycznej nowotworów. Na przykład wszystkie komórki nowotworu mogą zawierać HIF-1 $\alpha$  mimo jedynie niewielkiej frakcji komórek niedotlenionych, albo odwrotnie, mimo niedotlenienia brakuje komórek z HIF-1 $\alpha$ .<sup>50</sup> Ponieważ jednak w wielu badaniach wykazano związek między HIF-1 $\alpha$  i ekspresją spokrewnionego z nim HIF-2 $\alpha$  a wynikiem leczenia, rodzina tych genów może wpływać na odpowiedź niezależnie od niedotlenienia. CA9 jest jednym z genów najsilniej aktywowanych w warunkach niedotlenienia, ale w dużym randomizowanym badaniu z udziałem chorych napromienianych z powodu HNSCC nie potwierdzono jego roli jako czynnika przepowiadającego.<sup>51</sup> Jest to prawdopodobnie związane z brakiem jego swoistości jako wskaźnika niedotlenienia, ponieważ w podobnej kohorcie chorych wykazano, że niedotlenienie jest czynnikiem ograniczającym (nimorazol, czynnik uwrażliwiający komórki niedotlenione na działanie promieniowania, znamiennej zwiększa odpowiedź na radioterapię<sup>52</sup>). Możliwe, że połączenie więcej niż jednego wskaźnika zależnego od HIF zwiększy ich swoistość w określaniu stopnia niedotlenienia, co już wykazano w badaniu oceniającym CA9 i GLUT1.<sup>53</sup> Wyniki te także wymagają potwierdzenia w niezależnych badaniach.

Czynnikiem wpływającym na stopień niedotlenienia nowotworu jest również jego unaczynienie, często chaotyczne i niewystarczające, by zapewnić właściwy przepływ we wszystkich regionach guza. Poszczególne nowotwory różnią się także pod tym względem. W kilku badaniach podjęto próbę wykorzystania parametrów sieci naczyń nowotworu jako czynników przepowiadających, ich skuteczność okazała się jednak zmienna. W jednym z największych randomizowanych badań, przeprowadzonym z udziałem ponad 400 chorych na HNSCC, stwierdzono, że gęstość sieci mikronaczyń nie koreluje znamienne z wynikiem leczenia.<sup>54</sup> Mało prawdopodobne zatem, by parametry te były przydatnymi mocnymi czynnikami przepowiadającymi przebieg HNSCC.

#### SZYBKOŚĆ REPOPULACJI

Na podstawie doświadczenia pochodzącego z wielu badań poświęconych radioterapii chorych na HNSCC, podczas których czas napromieniania był różny, dobrze wiadomo, że krótsze leczenie (z przyspieszonym frakcjonowaniem dawki) pozwala na uzyskanie lepszej kontroli miejscowej.<sup>55</sup> Wynika to prawdopodobnie ze zdolności komórek HNSCC do szybkiej repopulacji w przerwach w leczeniu. Skrócenie czasu całkowitego zmniejsza szansę na taką repopulację, co sprawia, że pod wpływem działania określonej dawki promieniowania ginie więcej komórek. Chociaż późna odpowiedź ze strony komórek prawidłowych (z definicji proliferujących wolniej) pozostaje stała mimo zmiany całkowitego czasu napromieniania, prawidłowe komórki szybko dzielące się, takie jak komórki błony śluzowej policzków lub jelita, ulegną jednak dodatkowym uszkodzeniom, ponieważ ich zdolność do naprawy będzie ograniczona przez skrócenie odstępów między podaniem kolejnych frakcji promieniowania. Oznaczenie czynnika pozwalającego przewidzieć szybkość repopulacji komórek nowotworowych byłoby zatem przydatne, ponieważ pozwoliłoby chorym na nowotwory o wolniejszej repopulacji komórek na uniknięcie dodatkowych działań niepożądanych powstałych w następstwie stosowania przyspieszonego frakcjonowania dawki lub leków antyproliferacyjnych.

Podczas wczesnych badań czynnościowych podawano śladowe dawki analogów tymidyny, które po wbudowaniu do proliferujących komórek były wykrywane metodami immunohistochemicznymi lub za pomocą cytometrii przepływową. Umożliwiało to bezpośredni pomiar proliferacji nowotworu. W takich badaniach przeprowadzonych dla HNSCC wykazano, że odsetek znakowanych komórek (indeks znakowania, labelling index, LI) miał jedynie marginalne znaczenie jako czynnik pozwalający przewidzieć miejscowe opa-

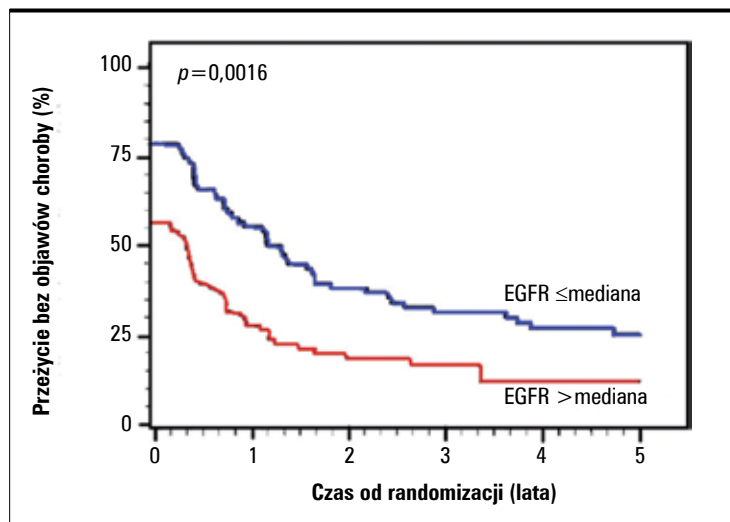
nowanie choroby, natomiast potencjalny czas podwojenia objętości nowotworu nie odgrywał żadnej roli.<sup>56</sup>

Ponieważ pomiary te wymagają podania znacznika i nie są przydatnymi czynnikami przepowiadającymi, podjęto poszukiwania alternatywnych wskaźników stopnia repopulacji. Należą do nich ekspresja genów zależnych od proliferacji, takich jak geny różnych cyklin (A, D, E), Ki-67 (MKI67), a także antygen jądrowy komórek proliferujących. W jednym z kilku badań przeprowadzonych z udziałem stosunkowo wielu chorych na HNSCC poddanych wyłącznej radioterapii Couture i wsp.<sup>57</sup> stwierdzili, że niewielka ekspresja Ki-67, oceniona metodami immunohistochemicznymi, jest złym czynnikiem rokowniczym. Podobne wnioski przedstawili autorzy dwóch innych badań.<sup>58,59</sup> Spostrzeżenie to podważa słuszność poglądu o gorszych wynikach leczenia nowotworów szybko proliferujących (duża ekspresja Ki-67). Wskaźnik proliferacji przed rozpoczęciem leczenia nie musi odzwierciedlać szybkości repopulacji w trakcie leczenia, która może być przyspieszona w odpowiedzi na uszkodzenie, co częściowo tłumaczy zaistniałą sytuację.<sup>10</sup> Nowotwory wolno proliferujące przed leczeniem bywają zdolne do gwałtownej repopulacji w jego trakcie.

Słuszność tej hipotezy potwierdzają wyniki dwóch badań poświęconych napromienianiu z przyspieszonym frakcjonowaniem.<sup>60,61</sup> W obu wykazano, że chorzy na nowotwór z silną ekspresją EGFR odnoszą korzyść dzięki zastosowaniu takiego schematu radioterapii. Stwierdzono też silną korelację między ekspresją EGFR a stopniem zróżnicowania nowotworu (im silniejsza ekspresja, tym lepsze zróżnicowanie). Można zatem przypuszczać, że nowotwory dobrze zróżnicowane reagują na uszkodzenie przyspieszoną repopulacją komórek, podobnie jak prawidłowa tkanka nabłonkowa. Wyniki te potwierdzono również w badaniu, w którym nowotwory pozbawione ekspresji TP53 i BCL2 oraz cechujące się słabym znakowaniem przeciwciałami przeciw Ki-67 wykazują nasiloną repopulację komórek po zastosowaniu schematów przyspieszonego frakcjonowania dawki i jest to zgodne ze stopniem ich zróżnicowania.<sup>62</sup> Wydaje się zatem, że ważnym czynnikiem przepowiadającym zdolność do repopulacji komórek jest raczej zdolność do odpowiedzi na uszkodzenie niż niezaburzona proliferacja.

Opisano kilka sygnatur genowych swoistych dla komórek ulegających proliferacji. Oceniono przydatność predykcyjną niektórych spośród nich w praktyce klinicznej. Wysoka wartość wskaźnika proliferacji jest w wielu rodzajach nowotworów niekorzystnym czynnikiem rokowniczym.<sup>63</sup> U chorych na HNSCC leczonych napromienianiem skojarzonym z cisplatiną<sup>31</sup> lub wyłącznym napromienianiem<sup>33</sup> sygnatury proliferacji nie wykazały natomiast wartości przepowiadającej.

RYCINA 1



Wartość przepowiadająca ekspresji receptora naskórkowego czynnika wzrostu u chorych na nowotwory narządów głowy i szyi poddanych tradycyjnie frakcjonowanej radioterapii. Duża ekspresja receptora naskórkowego czynnika wzrostu pozwala przewidzieć gorszy wynik leczenia. (Przedrukowano z: Ang i wsp.<sup>68</sup>).

Niektóre sygnatury proliferacyjne korelują z LI analogu tymidyny w obcogatunkowych przeszczepach nowotworów ludzkich.<sup>64</sup> Udowodniono jednak, że LI nie jest przydatnym czynnikiem rokowniczym u chorych na HNSCC,<sup>56</sup> co jest zgodne z nieskutecznością sygnatur genowych. Wy tłumaczeniem może być fakt, że szybkość proliferacji komórek nowotworu przed rozpoczęciem leczenia nie odzwierciedla ich zdolności do repopulacji.

#### PRZEKAZYWANIE SYGNAŁU

Na promieniowrażliwość wpływają różne szlaki przekazywania sygnału, w tym PI3K/AKT (homolog 1 onkogenu wirusa grasiczaka mysiego), NKKB1, MAPK i szlaki transformującego czynnika wzrostu.<sup>15</sup> Szczególnie zainteresowanie wzbudza szlak PI3K/AKT. Jego aktywacja powoduje oporność na napromienianie, natomiast zahamowanie może uwrażliwić komórki na działanie promieniowania.<sup>65</sup> Aktywacja AKT w HNSCC, potwierdzona wykryciem ufosforylowanego AKT metodami immunohistochemicznymi, wiąże się ponadto z gorszą odpowiedzią na radioterapię.<sup>66</sup> Fosforylowany AKT był też niekorzystnym czynnikiem rokowniczym w grupie chorych na HNSCC, których operowano, po czym u części z nich zastosowano radio- lub chemioterapię.<sup>67</sup> Oba te badania były stosunkowo nieduże

i uzyskane w nich wyniki wymagają potwierdzenia, są jednak zgodne z danymi pochodzącymi z wielu badań przedklinicznych.

Jednym z najważniejszych receptorów błonowych szlaku PI3K/AKT jest EGFR, którego nadmierną ekspresję stwierdzono w wielu HNSCC i korelowała ona ze złą odpowiedzią<sup>68,69</sup> (ryc. 1). Oznaczenie ekspresji EGFR może dostarczyć informacji rokowniczych w odpowiedzi na radioterapię. Poznanie ważnej roli EGFR w rozwoju nowotworu i powstawaniu oporności na leczenie przyczyniło się do opracowania inhibitorów EGFR. Są to zarówno przeciwciała przeciw receptorowi, jak i leki hamujące aktywność kinazy tyrozynowej aktywowanej formy receptora. To z kolei zaowocowało badaniami, w których wykazano, że dodanie cetuksymabu do radioterapii poprawiało odpowiedź na leczenie.<sup>14</sup> Cenna byłaby możliwość wskazania chorych, którym leczenie cetuksymabem lub innymi lekami ukierunkowanymi przeciw EGFR przyniosłoby korzyść. Nie określono jednak wyraźnie czynników determinujących odpowiedź na podanie cetuksymabu i innych leków stosowanych u chorych na HNSCC,<sup>70</sup> nadal jest zatem konieczne wskazanie rzetelnych czynników pozwalających przewidzieć odpowiedź na leczenie ukierunkowane molekularnie.

W wielu badaniach wykazano związek szlaków NF-KB, MAPK i transformującego czynnika wzrostu κ z opornością na napromienianie. Były wśród nich badania, w których stwierdzono większą wrażliwość na działanie promieniowania po zahamowaniu tych szlaków przemian.<sup>15</sup> Dotychczas nie przeprowadzono jednak badania z udziałem wystarczająco wielu chorych na HNSCC, wykazującego korelację aktywacji tych szlaków z wynikiem radioterapii. Obecnie nie można zatem przyjąć, że aktywacja tych szlaków przemian może być czynnikiem pozwalającym przewidzieć odpowiedź chorych na HNSCC na leczenie.

#### ZAKAŻENIE HPV

W ostatnich latach coraz wyraźniej widać, że zakażenie HPV jest przydatnym markerem rokowniczym u chorych na HNSCC, zwłaszcza na raka ustnej części gardła.<sup>12,71</sup> Dotyczy to również chorych leczonych napromienianiem (ryc. 2).<sup>72,73</sup> Zakażenie HPV można rozpoznać za pomocą kilku testów, w tym metodami wykrywania integracji genomu wirusa do genomu gospodarza za pomocą reakcji łańcuchowej polimerazy lub fluorescencyjnej hybrydyzacji *in situ*, wykrywania ekspresji genomu wirusa, zwłaszcza E6 i E7, a także dzięki oznaczaniu ekspresji TP16 (inhibitora 2A kinazy zależnej od cyklin). Znakowanie za pomocą przeciwciał w poszukiwaniu ekspresji TP16 okazało się wiarygod-

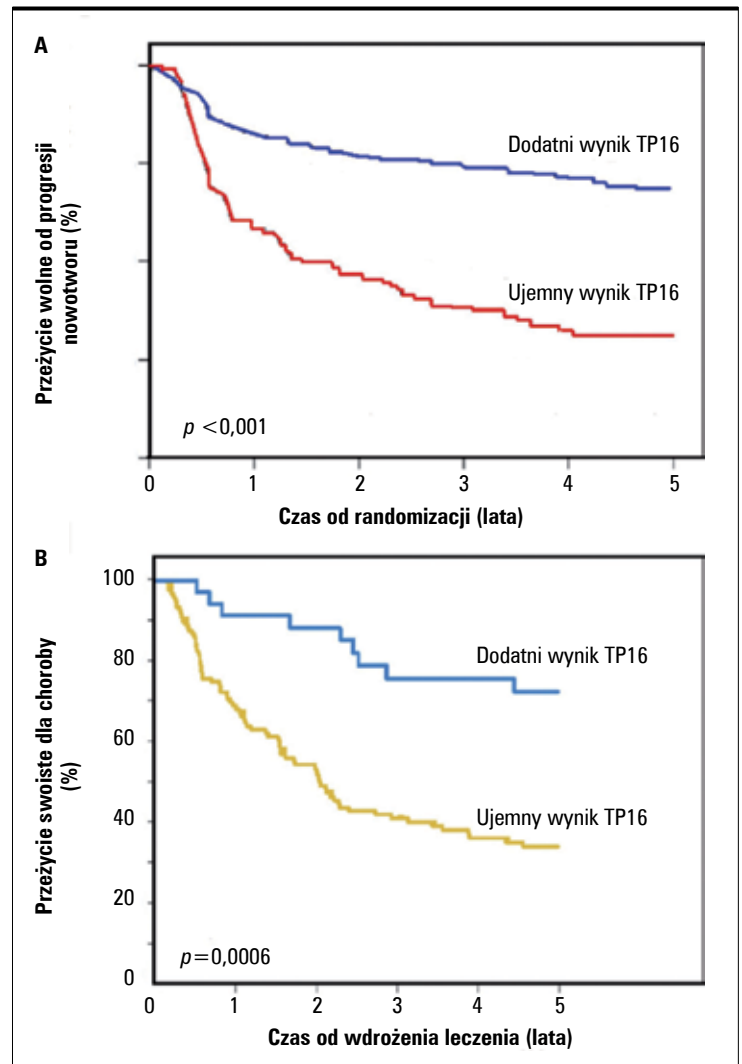
nym czynnikiem przepowiadającym zakażenie HPV, którego wartość zwiększa się dodatkowo w połączeniu z oceną integracji wirusa za pomocą reakcji łańcuchowej polimerazy.<sup>74</sup> Obie techniki wykorzystuje się rutynowo w większości ośrodków. Opracowano także sygnatury ekspresji genów służące odróżnieniu nowotworów zakażonych HPV od niezakażonych HPV.<sup>75,76</sup> Potwierdzono ich wartość przepowiadającą u chorych na HNSCC, ponieważ nowotwory z silną ekspresją genów towarzyszących zakażeniu HPV lepiej odpowiadają na leczenie.<sup>77</sup>

Nie ustalono, dlaczego wyniki leczenia chorych z zakażeniem HPV są lepsze. Wyniki dwóch badań nasuwają przypuszczenie, że przyczyną tego może być niedotlenienie. Lassen i wsp.<sup>78</sup> wykazali, że jedynie chorzy na nowotwory bez cech zakażenia HPV odnieśli korzyść dzięki podaniu nimorazolu, leku uwrażliwiającego na działanie promieniowania. W przebiegu zakażenia HPV niedotlenienie jest zatem mniejsze, dlatego lepsza jest też odpowiedź na radioterapię. Brockton i wsp.<sup>79</sup> stwierdzili w podścielisku nowotworów bez współistniejącego zakażenia HPV silną ekspresję wskaźnika niedotlenienia, CA9, co potwierdza wyniki uzyskane przez Lassena i wsp. Na ogół można się spodziewać dobrego natlenienia podścieliska z uwagi na jego dobre unaczynienie. Jeśli jednak przepływ w niektórych naczyniach jest zmniejszony lub ustaje, obserwuje się silne wybarwienie CA9. Następuje wówczas okresowe lub nagłe niedokrwienie. Można przypuszczać, że w nowotworach bez cech zakażenia HPV nagłe niedotlenienie przyczynia się do zwiększenia ich agresywności (komórki są bardziej żywotne) w większym stopniu niż niedotlenienie przewlekłe.<sup>9</sup>

#### KOMÓRKI MACIERZYSTE ZAPOCZĄTKOWUJĄCE ROZWÓJ NOWOTWORU

Wiadomo już, że zaledwie niewielka frakcja komórek jest w stanie doprowadzić do odtworzenia ogniska wielu nowotworów. Spostrzeżenie to dało początek koncepcji macierzystych komórek nowotworu lub komórek zapoczątkowujących rozwój nowotworu.<sup>80</sup> Wpłynęła ona na zrozumienie działania radioterapii i możliwość przewidywania jej wyników.<sup>81,82</sup> Nowotwory zawierające dużo komórek macierzystych trudniej poddają się radioterapii. Nie zależy to od ich naturalnie większej oporności na napromienianie, ale od objętości nowotworu, im większa bowiem frakcja komórek macierzystych, tym więcej komórek trzeba zniszczyć. Zgromadzone dotychczas dowody nie wystarczają, by odpowiedzieć na pytanie, czy komórki macierzyste są bardziej odporne na napromienianie niż pozostałe komórki nowotworowe, choć opisywano ich występowanie na obszarach niedotlenienia, co może świadczyć o ich oporności na

RYCINA 2



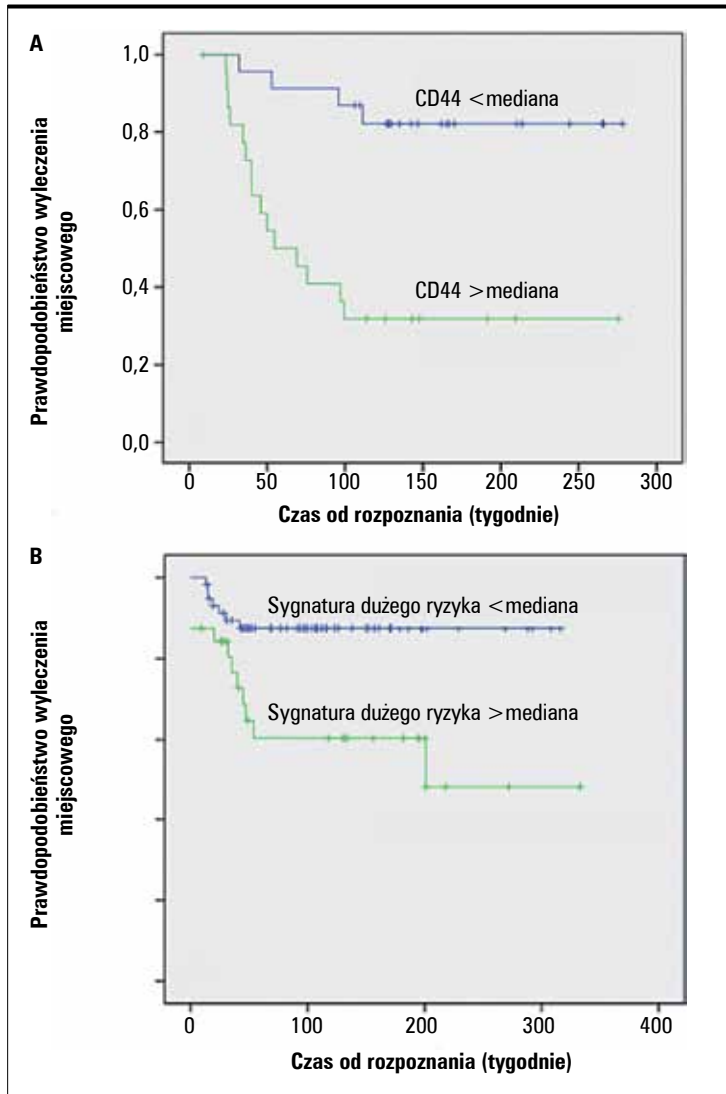
Wyniki dwóch niezależnych badań wykazujących, że ekspresja TP16 związana z zakażeniem wirusem brodawczaka ludzkiego jest silnym czynnikiem przepowiadającym wynik leczenia raka płaskonabłonkowego narządów głowy i szyi. (A) Ogółem 316 chorych poddanych konwencjonalnej radioterapii frakcjonowanej lub przyspieszonej połączonej z leczeniem cisplatyną (Przedrukowano z: Ang i wsp.<sup>73</sup>) (B) Ogółem 156 chorych poddanych wyłącznie radioterapii w ramach randomizowanego badania (Przedrukowano z: Lassen i wsp.<sup>72</sup>).

działanie promieniowania.<sup>82</sup> Tak czy inaczej, zgodnie z koncepcją komórek macierzystych, monitorowanie liczby tych komórek może ułatwić przewidywanie wyniku radioterapii.

U chorych na raka krtani w wczesnym stadium zaawansowania leczonych wyłącznie napromienianiem ekspresja wskaźnika komórek macierzystych CD44 jest czynnikiem przepowiadającym miejscowe opanowanie



RYCINA 3



Dwa badania przedstawiające ekspresję genów, pozwalającą przewidzieć odpowiedź na leczenie chorych na nowotwór narządów głowy i szyi. (A) Ogółem 52 chorych na raka krtani we wczesnym stadium zaawansowania poddano wyłącznie radioterapii. Silnej ekspresji domniemanego wskaźnika komórek macierzystych CD44 towarzyszyło złe rokowanie (Na podstawie deJong i wsp.<sup>33</sup>). (B) Ogółem 96 chorych na zaawansowany nowotwór narządów głowy i szyi poddano radioterapii skojarzonej z cisplatyną. Silnej ekspresji sygnatury genowej Chunga<sup>87</sup> towarzyszyło złe rokowanie (Przedrukowano z: Pramana i wsp.<sup>31</sup>). W obu badaniach ekspresję genów na poziomie mRNA oznaczano metodą mikromacierzy w wycinkach pobranych drogą biopsji przed rozpoczęciem leczenia.

nowotworu. Monitorowaniu ekspresji mRNA służy technologia analizy mikromacierzy, zaś monitorowaniu ekspresji białek metody immunohistochemiczne (ryc. 3A).<sup>33</sup> Pramana i wsp.<sup>31</sup> również donieśli, że sygnatury zarówno CD44, jak i innych komórek macierzystych<sup>83</sup> wykazały silną, choć nieznamioną tendencję do korelacji z wynikiem stosowania radioterapii skojarzonej z cisplatyną u chorych na HNSCC. Wu i wsp.<sup>84</sup> wykazali, że jednoczesna ekspresja dwóch markerów komórek macierzystych GRP70 (białko 5 szoku cieplnego o masie 70kDa) i NANOG korelowała z gorszym rokowaniem uzyskanym u chorych na HNSCC leczonych chirurgicznie w połączeniu z radioterapią lub chemioterapią albo bez nich. Duża liczba komórek macierzystych wydaje się zatem pełnić rolę czynnika pozwalającego przewidzieć wynik zastosowania radioterapii u chorych na HNSCC. Wyniki te wskazują na przydatność monitorowania liczby tych komórek.

#### PRZEJŚCIE NABŁONEK-MEZENCHYMA

Komórki nowotworu przechodzą zmianę morfologiczną z fenotypu nabłonkowego do fenotypu mezenchymalnego (epithelial mesenchymal transition, EMT). Zmiana ta wpływa na inwazyjność komórek i skłonność do tworzenia przerzutów.<sup>85,86</sup> Niedawno wykryto związek między EMT a odpowiedzią na napromienianie. Chung i wsp.<sup>87</sup> określili sygnaturę genową zwiększonego ryzyka, pozwalającą przewidzieć odpowiedź chorych na HNSCC na leczenie chirurgiczne zastosowane wyłącznie lub w skojarzeniu z radio- albo chemioterapią. Sygnatura zawierała kilka genów związanych z EMT. Pramana i wsp.<sup>31</sup> wykazali następnie, że sygnatura ta jest czynnikiem przepowiadającym u chorych na HNSCC otrzymujących radioterapię z cisplatyną (ryc. 3B). W laboratorium, w którym pracuje autor tego artykułu, stwierdzono, że wymuszenie EMT w komórkach HNSCC przez ekspresję odpowiednich czynników transkrypcji zwiększało oporność na działanie promieniowania (de Jong M i Begg AC, dane niepublikowane). Theys i wsp.<sup>88</sup> wykazali niedawno, że związana z EMT utrata E-kadheryny sprzyja powstawaniu oporności ludzkich komórek nowotworowych na napromienianie. Natomiast w badaniu przeprowadzonym z udziałem 340 chorych na HNSCC Marsit i wsp.<sup>89</sup> stwierdzili, że hipermetylacja promotora E-kadheryny, a zatem wyhamowanie ekspresji E-kadheryny, jest niezależnym czynnikiem przepowiadającym poprawę przeżycia tych chorych. Tymczasem można byłoby się spodziewać, że utrata E-kadheryny, a zatem EMT, sprzyja powstawaniu oporności na napromienianie *in vivo*. Nie wyjaśniono dotąd wpływu EMT na uzyskiwane wyniki leczenia ani jego roli jako czynnika przepowiadającego.

## SYNTECZNA LETALNOŚĆ

Jak już wspomniano, jednym z zagadnień związanych z leczeniem chorych na nowotwory, wzbudzającym coraz większe zainteresowanie w ostatnim dziesięcioleciu, jest syntetyczna letalność. Główną zaletą tej metody jest wybiórcze niszczenie swoistych komórek nowotworowych. Przykładem jest wyraźne zwiększenie skuteczności inhibitorów PARP u chorych na raka piersi bez mutacji genu *BRCA*. Obserwacje z laboratorium<sup>18,19</sup> z powodzeniem przeniesiono do praktyki klinicznej i uzyskano zachęcające wstępne wyniki leczenia chorych na raka piersi.<sup>90</sup> Dwa szlaki przemian uczestniczące w tym procesie to naprawa przez wycinanie zasad (base excision repair, BER) w celu usunięcia SSB oraz szlak naprawy DSB przez HR, który jest szlakiem zastępczym dla wycinania zasad. Przewidywanie niedoboru HR może być zatem przydatnym czynnikiem przepowiadającym skuteczność inhibitorów PARP.

Występowanie lub brak mutacji genu *BRCA* jest oczywistym czynnikiem przepowiadającym. Można go ocenić za pomocą sekwencjonowania DNA w poszukiwaniu mutacji. Ponadto metylacja promotora *BRCA1*, hamująca ekspresję tego genu, pozwala przewidzieć wrażliwość na hamowanie PARP.<sup>91</sup> Kolejną możliwością jest wykorzystanie CGH. Wykryte tą metodą swoiste powielenia i delecje mogą zdefiniować status genu *BRCA1* oraz związanych z nim niedoborów.<sup>92</sup> Pozwala to dokładniej określić niedobory niż wyłączna analiza *BRCA1*.

W HR uczestniczą również inne geny niż *BRCA1* i *BRCA2*. Ich niedobory będą wpływać na skuteczność PARP. Willers i wsp.<sup>93</sup> wykorzystali testy czynnościowe indukowanego napromienianiem *RAD51*, białka D2 z grupy białek niedokrwistości Fanconiego i analizę ognisk *BRCA2* w wycinkach pobranych drogą biopsji ogniska nowotworu. Okazało się, że odsetek nowotworów z niedoborami HR jest większy niż odsetek spodziewany wyłącznie na podstawie analizy *BRCA*. Geny niedokrwistości Fanconiego także uczestniczą w szlaku HR. W dwóch badaniach w niektórych HNSCC wykazano metylację promotora i ograniczenie ekspresji genów niedokrwistości Fanconiego.<sup>94,95</sup> Zjawiska te mogą być w przyszłości kolejnymi czynnikami przepowiadającymi. Mendes-Pereira i wsp.<sup>96</sup> wykazali ponadto, że mutacje w homologu fosfatazy i tensyny (*PTEN*) korelują ze zmniejszoną wydajnością HR, co sprawia, że komórki o ograniczonej aktywności *PTEN* będą wrażliwsze na działanie inhibitorów PARP. Zatem monitorowanie stanu mutacji *PTEN* może być dodatkowym czynnikiem przepowiadającym syntetyczną letalność z inhibitorami PARP.

W niektórych nowotworach występują ubytki szlaku przemian BER, zatem hamowanie PARP powinno przy-

nieść tylko nieznaczną korzyść.<sup>97</sup> U chorych na takie nowotwory skuteczne może być zahamowanie zastępczego szlaku HR. Zachodzi tu syntetyczna letalność odwrotna niż w przykładzie podanym wcześniej, czyli mutacja w BER połączona z chemicznym zahamowaniem HR zamiast mutacji w HR wraz z chemicznym zahamowaniem BER.<sup>97-99</sup> Przewidywanie, który z nowotworów odpowie na zahamowanie HR, będzie zatem wymagało potwierdzenia niedoborów BER takimi metodami jak sekwencjonowanie DNA, analiza ekspresji genów lub ocena metylacji promotorów.

Opisano kilka innych przykładów syntetycznej letalności w leczeniu chorych na nowotwory, zwłaszcza farmakologicznym,<sup>100</sup> ale tylko w kilku z nich uwzględniono radioterapię.

## STRATEGIE OPARTE NA DANYCH

Większość z omawianych wcześniej zagadnień dotyczyła opartych na hipotezie metod poszukiwania czynników pozwalających przewidzieć procesy biologiczne o znanym lub domniemanym wpływie na odpowiedź nowotworu na frakcjonowaną radioterapię. Kilka innych potencjalnych czynników przepowiadających wykryto dzięki działaniom opartym na danych zgromadzonych we wcześniejszych badaniach, podczas których w celu wykrycia genów lub zmian w genach korelujących z przebiegiem choroby analizowano przesiewowo cały genom. Posługujący się CGH Wreesmann i wsp.<sup>101</sup> wykryli 5 swoistych amplifikacji i delecji korelujących z wynikami leczenia chorych na HNSCC, których poddano operacji, po czym u części z nich zastosowano radioterapię lub skojarzenie radioterapii z chemioterapią. W badaniu obserwacyjnym van den Broek i wsp.<sup>25</sup> wykorzystali CGH w ocenie chorych na HNSCC poddanych radioterapii w połączeniu z chemioterapią cisplatiną. Stwierdzili kilka powtarzających się powieżeń i delecji korelujących z przebiegiem choroby. Uzyskane przez nich wyniki tylko nieznacznie pokrywały się ze spostrzeżeniami zespołu Wreesmanna. Na razie nie można uznać tych zmian za wiarygodne czynniki przepowiadające. Okazują się one przydatne dopiero po potwierdzeniu ich wiarygodności i ustaleniu, które geny w jakich regionach chromosomalnych odpowiadają za niepowodzenie.

W niektórych HNSCC zidentyfikowano geny związane z powtarzającymi się zaburzeniami genomowymi. Okazały się one potencjalnymi czynnikiem przepowiadającymi. Przykładem są cyklina D1 i kortaktyna,<sup>102,103</sup> dwa geny występujące w często powielanym obszarze 11q3. Kortaktyna wydaje się silniejszym czynnikiem przepowiadającym niż cyklina D1. Nie ustalono, dla czego ekspresji tego genu towarzyszy złe rokowanie.

Być może jest ono związane ze stymulacją szlaku EGFR i sygnałami przekazywanymi za jego pośrednictwem.<sup>104</sup> Inna zmiana w genomie, utrata heterozygotyczności 18q21, pozwoliła dostrzec, że słaby sygnał odpowiadający SERPINB13 w tym locus koreluje ze złym rokowaniem chorych na HNSCC leczonych przede wszystkim napromienianiem.<sup>105</sup> SERPINB13 uczestniczy w hamowaniu angiogenezy,<sup>106</sup> a będąc jednym z czynników wywołujących niedotlenienie, może wpływać na wynik leczenia.

#### OMÓWIENIE I PODSUMOWANIE

Wykazano korelację wielu genów i genomów z odpowiedzią chorych na HNSCC na leczenie oparte na napromienianiu. Pozwala to mieć nadzieję, że niektóre z nich staną się wiarygodnymi czynnikami przepowiadającymi odpowiedź na takie postępowanie. W badaniach klinicznych stwierdzono przydatność zaledwie kilku spośród tych czynników. Należą do nich ekspresja EGFR i zakażenie HPV. Jak już jednak wspomniano, ważniejsze od czynników przepowiadających skuteczność odpowiedzi na radioterapię są czynniki, pozwalające przewidzieć odpowiedź na zastosowanie leków nasilających działanie promieniowania na nowotwory odporne. Ich wykorzystanie pozwoliłoby na indywidualny dobór postępowania i poprawienie jego wyników. Nawet jednak oznaczanie EGFR i HPV nie zapewnia wystarczających informacji, jak leczyć chorych obciążonych złym rokowaniem. Konieczne są dodatkowe dane i czynniki przepowiadające. Dotyczy to również niektórych czynników przepowiadających ekspresję genów, takich jak genowa sygnatura ryzyka Chunga<sup>31,87</sup> i ekspresja CD44.<sup>33</sup> Przydatność obu potwierdzono co najmniej raz w dodatkowym badaniu klinicznym, żaden jednak nie wskazuje najlepszej metody leczenia chorych źle rokujących.

Trzy klasyczne czynniki determinujące skuteczność radioterapii to promieniowrażliwość, stopień niedotlenienia i szybkość repopulacji. Sygnatury genowe nie okazały się dotąd rzetelnymi czynnikami pozwalającymi przewidzieć wrażliwość na napromienianie, prawdopodobnie ze względu na niedoskonałość wykorzystanych do ich identyfikacji modeli *in vitro*. Testy czynnościowe, takie jak oznaczanie ognisk białek naprawy DNA w wycinkach tkankowych hodowanych *ex vivo*, przyniosły interesujące i zachęcające wyniki, których wiarygodność wymaga jednak dalszego potwierdzenia. Wartość rokowniczą sygnatury genowej niedotlenienia potwierdzono w kilku badaniach klinicznych, choć dla chorych głównie napromienianych nie była ona wiarygodnym czynnikiem przepowiadającym. W badaniach

oceniających stężenia białek metodami immunohistochemicznymi żaden z pojedynczych genów, którego ekspresja nasilała się w warunkach niedotlenienia, nie wykazał powtarzalnej zdolności rokowniczej u chorych na HNSCC poddanych radioterapii. Zachęcające są wyniki analizy mikroRNA, którego ekspresja nasilała się w warunkach niedotlenienia, ich przydatność wymaga jednak dalszego potwierdzenia. Wydaje się, że poprzedzające leczenie oznaczanie proliferacji klasycznych genów cyklu komórkowego za pomocą przeciwciał lub określanie profilu ekspresji genów nie wystarcza, by przewidzieć odpowiedź proliferacyjną na leczenie. Więcej informacji dostarcza analiza ekspresji EGFR lub czynników związanych z różnicowaniem. Trzeba dodać, że miejscowe opanowanie choroby dzięki zmianie schematu frakcjonowania przynosi zaledwie umiarkowaną korzyść,<sup>55</sup> a zatem dokładne wskazanie chorych, którym należałoby poddać przyspieszonemu frakcjonowaniu, może przynieść tylko nieznaczny zysk.

Pojawia się wiele nowych leków o działaniu ukierunkowanym molekularnie, które wkraczają w erę badań klinicznych. Coraz więcej z nich ocenia się w skojarzeniu z radioterapią. Oczywiście postępowaniem jest uwzględnienie analiz genetycznych, zwłaszcza w badaniach randomizowanych, w których zastosowano nowy lek lub nie zastosowano go. Pozwala to na opracowanie swoistych dla danego leku wskaźników, pozwalających przewidzieć następstwa jego stosowania. Podczas takich badań można wykorzystać wiele dostępnych obecnie technik, w tym sekwencjonowanie drugiej generacji (tzw. sekwencjonowanie głębokie) DNA lub mRNA, analizę ekspresji mRNA, oznaczanie metylacji promotorów, ekspresji miRNA i CGH. Wszystkie te metody można zastosować w całym lub niemal całym genomie. Włączenie ich do nowych badań klinicznych pozwoli potwierdzić przydatność dotychczasowych czynników przepowiadających i wskazać następne.

Przewidywanie odpowiedzi na leczenie określoną metodą ma ograniczone znaczenie, jeśli brakuje metod alternatywnych. Postępom w tej dziedzinie musi zatem nieodłącznie towarzyszyć opracowywanie nowych leków. Powinny one się cechować swoistością wobec danego typu nowotworu, której osiągnięciu sprzyja wykorzystanie syntetycznej letalności. W dalszych badaniach najważniejszą rolę powinno odegrać ustalenie, które metody oparte na syntetycznej letalności należy zastosować u chorego na określony nowotwór.

© Published by Elsevier Inc. All rights reserved. This Article from *Seminars in Radiation Oncology* 2012,22:108-118 Predicting Recurrence After Radiotherapy in Head and Neck Cancer by Adrian C. Begg is translated and reprinted with permission of Elsevier.

## PIŚMIENNICTWO

1. Kamangar F, Dores GM, Anderson WF: Patterns of cancer incidence, mortality, and prevalence across five continents: Defining priorities to reduce cancer disparities in different geographic regions of the world. *J Clin Oncol* 24:2137-2150, 2006.
2. Groome PA, Schulze K, Boysen M, et al: A comparison of published head and neck stage groupings in carcinomas of the oral cavity. *Head Neck* 23:613-624, 2001.
3. Groome PA, Schulze K, Boysen M, et al: A comparison of published head and neck stage groupings in laryngeal cancer using data from two countries. *J Clin Epidemiol* 55:533-544, 2002.
4. Dubben HH, Thames HD, Beck-Bornholdt HP: Tumor volume: A basic and specific response predictor in radiotherapy. *Radiother Oncol* 47:167-174, 1998.
5. Nathu RM, Mancuso AA, Zhu TC, et al: The impact of primary tumor volume on local control for oropharyngeal squamous cell carcinoma treated with radiotherapy. *Head Neck* 22:1-5, 2000.
6. van den Broek GB, Rasch CR, Pameijer FA, et al: Pretreatment probability model for predicting outcome after intraarterial chemoradiation for advanced head and neck carcinoma. *Cancer* 101:1809-1817, 2004.
7. Björk-Eriksson T, West C, Karlsson E, et al: Tumor radiosensitivity (SF2) is a prognostic factor for local control in head and neck cancers. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 46:13-19, 2000.
8. Nordmark M, Overgaard J: A confirmatory prognostic study on oxygenation status and loco-regional control in advanced head and neck squamous cell carcinoma treated by radiation therapy. *Radiother Oncol* 57:39-43, 2000.
9. Janssen HL, Haustermans KM, Balm AJ, et al: Hypoxia in head and neck cancer: How much, how important? *Head Neck* 27:622-638, 2005.
10. Withers HR, Taylor JM, Maciejewski B: The hazard of accelerated tumor clonogen repopulation during radiotherapy. *Acta Oncol* 27:131-146, 1988.
11. Kim JJ, Tannock IF: Repopulation of cancer cells during therapy: An important cause of treatment failure. *Nat Rev Cancer* 5:516-525, 2005.
12. Leemans CR, Braakhuis BJ, Brakenhoff RH: The molecular biology of head and neck cancer. *Nat Rev Cancer* 11:9-22, 2011.
13. Mazon R, Tao Y, Lusinchi A, et al: Current concepts of management in radiotherapy for head and neck squamous-cell cancer. *Oral Oncol* 45:402-408, 2009.
14. Bonner JA, Harari PM, Giralt J, et al: Radiotherapy plus cetuximab for squamous-cell carcinoma of the head and neck. *N Engl J Med* 354:567-578, 2006.
15. Begg AC, Stewart FA, Vens C: Strategies to improve radiotherapy with targeted drugs. *Nat Rev Cancer* 11:239-253, 2011.
16. Wood LD, Parsons DW, Jones S, et al: The genomic landscapes of human breast and colorectal cancers. *Science* 318:1108-1113, 2007.
17. Totoki Y, Tatsuno K, Yamamoto S, et al: High-resolution characterization of a hepatocellular carcinoma genome. *Nat Genet* 43:464-469, 2011.
18. Farmer H, McCabe N, Lord CJ, et al: Targeting the DNA repair defect in BRCA mutant cells as a therapeutic strategy. *Nature* 434:917-921, 2005.
19. Bryant HE, Schultz N, Thomas HD, et al: Specific killing of BRCA2-deficient tumours with inhibitors of poly(ADP-ribose) polymerase. *Nature* 434:913-917, 2005.
20. Fong PC, Boss DS, Yap TA, et al: Inhibition of poly(ADP-ribose) polymerase in tumors from BRCA mutation carriers. *N Engl J Med* 361:123-134, 2009.
21. West CM, Davidson SE, Roberts SA, et al: Intrinsic radiosensitivity and prediction of patient response to radiotherapy for carcinoma of the cervix. *Br J Cancer* 68:819-823, 1993.
22. Begg AC: Predicting response to radiotherapy: Evolutions and revolutions. *Int J Radiat Biol* 85:825-836, 2009.
23. Kallioniemi A: CGH microarrays and cancer. *Curr Opin Biotechnol* 19:36-40, 2008.
24. Singh B, Kim SH, Carew JF, et al: Genome-wide screening for radiation response factors in head and neck cancer. *Laryngoscope* 110:1251-1256, 2000.
25. van den Broek GB, Wreesmann VB, Van den Brekel MW, et al: Genetic abnormalities associated with chemoradiation resistance of head and neck squamous cell carcinoma. *Clin Cancer Res* 13:4386-4391, 2007.
26. Olive PL: Retention of gammaH2AX foci as an indication of lethal DNA damage. *Radiother Oncol* 101:18-23, 2011.
27. Olive PL, Banuelos CA, Durand RE, et al: Endogenous and radiation-induced expression of gammaH2AX in biopsies from patients treated for carcinoma of the uterine cervix. *Radiother Oncol* 94:82-89, 2010.
28. Menegakis A, Eicheler W, Yaromina A, et al: Residual DNA double strand breaks in perfused but not in unperfused areas determine different radiosensitivity of tumours. *Radiother Oncol* 100:137-144, 2011.
29. Torres-Roca JF, Eschrich S, Zhao H, et al: Prediction of radiation sensitivity using a gene expression classifier. *Cancer Res* 65:7169-7176, 2005.
30. Amundson SA, Do KT, Vinikoor LC, et al: Integrating global gene expression and radiation survival parameters across the 60 cell lines of the National Cancer Institute Anticancer Drug Screen. *Cancer Res* 68:415-424, 2008.
31. Pramana J, Van den Brekel MW, van Velthuisen ML, et al: Gene expression profiling to predict outcome after chemoradiation in head and neck cancer. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 69:1544-1552, 2007.
32. Eschrich SA, Pramana J, Zhang H, et al: A gene expression model of intrinsic tumor radiosensitivity: Prediction of response and prognosis after chemoradiation. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 75:489-496, 2009.
33. de Jong MC, Pramana J, van der Wal JE, et al: CD44 expression predicts local recurrence after radiotherapy in larynx cancer. *Clin Cancer Res* 16:5329-5338, 2010.
34. Hennessey PT, Ochs MF, Mydlarz W, et al: Promoter methylation in head and neck squamous cell carcinoma cell lines is significantly different than methylation in primary tumors and xenografts. *PLoS ONE* 6:e20584, 2011.
35. Höckel M, Knoop C, Schlenger K, et al: Intratumoral pO2 predicts survival in advanced cancer of the uterine cervix. *Radiother Oncol* 26:45-50, 1993.
36. Vaupel P, Kelleher DK, Hockel M: Oxygen status of malignant tumors: Pathogenesis of hypoxia and significance for tumor therapy. *Semin Oncol* 28:29-35, 2001.
37. Graeber TG, Osmanian B, Jacks T, et al: Hypoxia-mediated selection of cells with diminished apoptotic potential in solid tumours. *Nature* 379:88-91, 1996.
38. Cairns RA, Hill RP: Acute hypoxia enhances spontaneous lymph node metastasis in an orthotopic murine model of human cervical carcinoma. *Cancer Res* 64:2054-2061, 2004.
39. Brizel DM, Sibley GS, Prosnitz LR, et al: Tumor hypoxia adversely affects the prognosis of carcinoma of the head and neck. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 38:285-289, 1997.
40. Chi JT, Wang Z, Nuyten DS, et al: Gene expression programs in response to hypoxia: Cell type specificity and prognostic significance in human cancers. *PLoS Med* 3:e47, 2006.
41. Fardin P, Cornero A, Barla A, et al: Identification of multiple hypoxia signatures in neuroblastoma cell lines by I1-L2 regularization and data reduction. *J Biomed Biotechnol* 2010:878709, 2010.
42. Winter SC, Buffa FM, Silva P, et al: Relation of a hypoxia metagene derived from head and neck cancer to prognosis of multiple cancers. *Cancer Res* 67:3441-3449, 2007.
43. Jeong SH, Wu HG, Park WY: LIN28B confers radio-resistance through the posttranscriptional control of KRAS. *Exp Mol Med* 41:912-918, 2009.
44. Oh JS, Kim JJ, Byun JY, et al: Lin28-let7 modulates radiosensitivity of human cancer cells with activation of K-Ras. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 76:5-8, 2010.
45. Chun-Zhi Z, Lei H, An-Ling Z, et al: MicroRNA-221 and microRNA-222 regulate gastric carcinoma cell proliferation and radioresistance by targeting PTEN. *BMC Cancer* 10:367, 2010.
46. Farazi TA, Spitzer JL, Morozov P, et al: miRNAs in human cancer. *J Pathol* 223:102-115, 2011.
47. Gee HE, Camps C, Buffa FM, et al: hsa-mir-210 is a marker of tumor hypoxia and a prognostic factor in head and neck cancer. *Cancer* 116:2148-2158, 2010.
48. Semenza GL: Defining the role of hypoxia-inducible factor 1 in cancer biology and therapeutics. *Oncogene* 29:625-634, 2010.
49. Bussink J, Kaanders JH, van der Kogel AJ: Tumor hypoxia at the micro-regional level: Clinical relevance and predictive value of exogenous and endogenous hypoxic cell markers. *Radiother Oncol* 67:3-15, 2003.
50. Janssen HL, Haustermans KM, Sprong D, et al: HIF-1A, pimonidazole, and iododoxymurine to estimate hypoxia and perfusion in human head-and-neck tumors. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 54:1537-1549, 2002.
51. Eriksen JG, Overgaard J; Danish Head and Neck Cancer Study Group (DAHANCA): Lack of prognostic and predictive value of CA IX in radiotherapy of squamous cell carcinoma of the head and neck with known modifiable hypoxia: An evaluation of the DAHANCA 5 study. *Radiother Oncol* 83:383-388, 2007.
52. Overgaard J, Hansen HS, Overgaard M, et al: A randomized double-blind phase III study of nimorazole as a hypoxic radiosensitizer of primary radiotherapy in supraglottic larynx and pharynx carcinoma. Results of the Danish Head and Neck Cancer Study (DAHANCA) protocols 5-85. *Radiother Oncol* 46:135-146, 1998.
53. De SH, Landuyt W, Verbeken E, et al: The prognostic value of the hypoxia markers CA IX and GLUT 1 and the cytokines VEGF and IL 6 in head and neck squamous cell carcinoma treated by radiotherapy ± chemotherapy. *BMC Cancer* 5:42, 2005.
54. Calvin DR, Hammond ME, Pajak TF, et al: Microvessel density  $\geq 60$  does not predict for outcome after radiation treatment for locally advanced head and neck squamous cell carcinoma: Results of a correlative study from the Radiation Therapy Oncology Group (RTOG) 90-03 Trial. *Am J Clin Oncol* 30:406-419, 2007.
55. Baujat B, Bourhis J, Blanchard P, et al: Hyperfractionated or accelerated radiotherapy for head and neck cancer. *Cochrane Database Syst Rev* CD002026, 2010.

56. Begg AC, Haustermans K, Hart AA, et al: The value of pretreatment cell kinetic parameters as predictors for radiotherapy outcome in head and neck cancer: A multicenter analysis. *Radiother Oncol* 50:13-23, 1999.
57. Couture C, Raybaud-Diogenè H, Têtu B, et al: p53 and Ki-67 as markers of radioresistance in head and neck carcinoma. *Cancer* 94:713-722, 2002.
58. Kropveld A, Slootweg PJ, Blankenstein MA, et al: Ki-67 and p53 in T2 laryngeal cancer. *Laryngoscope* 108:1548-1552, 1998.
59. Raybaud H, Fortin A, Bairati I, et al: Nuclear DNA content, an adjunct to p53 and Ki-67 as a marker of resistance to radiation therapy in oral cavity and pharyngeal squamous cell carcinoma. *Int J Oral Maxillofac Surg* 29:36-41, 2000.
60. Eriksen JG, Steiniche T, Overgaard J, et al: The role of epidermal growth factor receptor and E-cadherin for the outcome of reduction in the overall treatment time of radiotherapy of supraglottic larynx squamous cell carcinoma. *Acta Oncol* 44:50-58, 2005.
61. Bentzen SM, Atasoy BM, Daley FM, et al: Epidermal growth factor receptor expression in pretreatment biopsies from head and neck squamous cell carcinoma as a predictive factor for a benefit from accelerated radiation therapy in a randomized controlled trial. *J Clin Oncol* 23:5560-5567, 2005.
62. Buffa FM, Bentzen SM, Daley FM, et al: Molecular marker profiles predict locoregional control of head and neck squamous cell carcinoma in a randomized trial of continuous hyperfractionated accelerated radiotherapy. *Clin Cancer Res* 10:3745-3754, 2004.
63. Starmans MH, Krishnapuram B, Steck H, et al: Robust prognostic value of a knowledge-based proliferation signature across large patient microarray studies spanning different cancer types. *Br J Cancer* 99:1884-1890, 2008.
64. Starmans MH, Zips D, Wouters BG, et al: The use of a comprehensive tumour xenograft dataset to validate gene signatures relevant for radiation response. *Radiother Oncol* 92:417-422, 2009.
65. Kim IA, Bae SS, Fernandes A, et al: Selective inhibition of Ras, phosphoinositide 3 kinase, and Akt isoforms increases the radiosensitivity of human carcinoma cell lines. *Cancer Res* 65:7902-7910, 2005.
66. Gupta AK, McKenna WG, Weber CN, et al: Local recurrence in head and neck cancer: Relationship to radiation resistance and signal transduction. *Clin Cancer Res* 8:885-892, 2002.
67. Massarelli E, Liu DD, Lee JJ, et al: Akt activation correlates with adverse outcome in tongue cancer. *Cancer* 104:2430-2436, 2005.
68. Ang KK, Berkey BA, Tu X, et al: Impact of epidermal growth factor receptor expression on survival and pattern of relapse in patients with advanced head and neck carcinoma. *Cancer Res* 62:7350-7356, 2002.
69. Chung CH, Ely K, McGavran L, et al: Increased epidermal growth factor receptor gene copy number is associated with poor prognosis in head and neck squamous cell carcinomas. *J Clin Oncol* 24:4170-4176, 2006.
70. Harari PM, Wheeler DL, Grandis JR: Molecular target approaches in head and neck cancer: Epidermal growth factor receptor and beyond. *Semin Radiat Oncol* 19:63-68, 2009.
71. Ragin CC, Taioli E: Survival of squamous cell carcinoma of the head and neck in relation to human papillomavirus infection: Review and meta-analysis. *Int J Cancer* 121:1813-1820, 2007.
72. Lassen P, Eriksen JG, Hamilton-Dutoit S, et al: Effect of HPV-associated p16INK4A expression on response to radiotherapy and survival in squamous cell carcinoma of the head and neck. *J Clin Oncol* 27:1992-1998, 2009.
73. Ang KK, Harris J, Wheeler R, et al: Human papillomavirus and survival of patients with oropharyngeal cancer. *N Engl J Med* 363:24-35, 2010.
74. Robinson M, Sloan P, Shaw R: Refining the diagnosis of oropharyngeal squamous cell carcinoma using human papillomavirus testing. *Oral Oncol* 46:492-496, 2010.
75. Slebos RJ, Yi Y, Ely K, et al: Gene expression differences associated with human papillomavirus status in head and neck squamous cell carcinoma. *Clin Cancer Res* 12:701-709, 2006.
76. Lohavanichbutr P, Houck J, Fan W, et al: Genome-wide gene expression profiles of HPV-positive and HPV-negative oropharyngeal cancer: Potential implications for treatment choices. *Arch Otolaryngol Head Neck Surg* 135:180-188, 2009.
77. de Jong MC, Pramana J, Kneijens JL, et al: HPV and high-risk gene expression profiles predict response to chemoradiotherapy in head and neck cancer, independent of clinical factors. *Radiother Oncol* 95:365-370, 2010.
78. Lassen P, Eriksen JG, Hamilton-Dutoit S, et al: HPV-associated p16-expression and response to hypoxic modification of radiotherapy in head and neck cancer. *Radiother Oncol* 94:30-35, 2010.
79. Brockton N, Dort J, Lau H, et al: High stromal carbonic anhydrase IX expression is associated with decreased survival in P16-negative head-and-neck tumors. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 80:249-257, 2011.
80. Clarke MF, Dick JE, Dirks PB, et al: Cancer stem cells—Perspectives on current status and future directions: AACR workshop on cancer stem cells. *Cancer Res* 66:9339-9344, 2006.
81. Baumann M, Krause M, Thames H, et al: Cancer stem cells and radiotherapy. *Int J Radiat Biol* 85:391-402, 2009.
82. Hill RP, Marie-Egyptienne DT, Hedley DW: Cancer stem cells, hypoxia and metastasis. *Semin Radiat Oncol* 19:106-111, 2009.
83. Glinisky GV, Berezovska O, Gliniskii AB: Microarray analysis identifies a death-from-cancer signature predicting therapy failure in patients with multiple types of cancer. *J Clin Invest* 115:1503-1521, 2005.
84. Wu MJ, Jan CI, Tsay YG, et al: Elimination of head and neck cancer initiating cells through targeting glucose regulated protein78 signaling. *Mol Cancer* 9:283, 283, 2010.
85. Guarino M, Rubino B, Ballabio G: The role of epithelial-mesenchymal transition in cancer pathology. *Pathology* 39:305-318, 2007.
86. Sabbah M, Emami S, Redeuilh G, et al: Molecular signature and therapeutic perspective of the epithelial-to-mesenchymal transitions in epithelial cancers. *Drug Resist Update* 11:123-151, 2008.
87. Chung CH, Parker JS, Ely K, et al: Gene expression profiles identify epithelial-to-mesenchymal transition and activation of nuclear factor-kappaB signaling as characteristics of a high-risk head and neck squamous cell carcinoma. *Cancer Res* 66:8210-8218, 2006.
88. Theys J, Jutten B, Habets R, et al: E-Cadherin loss associated with EMT promotes radioresistance in human tumor cells. *Radiother Oncol* 99:392-397, 2011.
89. Marsit CJ, Posner MR, McClean MD, et al: Hypermethylation of E-cadherin is an independent predictor of improved survival in head and neck squamous cell carcinoma. *Cancer* 113:1566-1571, 2008.
90. Fong PC, Yap TA, Boss DS, et al: Poly(ADP)-ribose polymerase inhibition: Frequent durable responses in BRCA carrier ovarian cancer correlating with platinum-free interval. *J Clin Oncol* 28:2512-2519, 2010.
91. Veeck J, Roper S, Setien F, et al: BRCA1 CpG island hypermethylation predicts sensitivity to poly(adenosine diphosphate)-ribose polymerase inhibitors. *J Clin Oncol* 28:e563-e564, 2010.
92. Joosse SA, van Beers EH, Tielen IH, et al: Prediction of BRCA1-association in hereditary non-BRCA1/2 breast carcinomas with array-CGH. *Breast Cancer Res Treat* 116:479-489, 2009.
93. Willers H, Taghian AG, Luo CM, et al: Utility of DNA repair protein foci for the detection of putative BRCA1 pathway defects in breast cancer biopsies. *Mol Cancer Res* 7:1304-1309, 2009.
94. Smith IM, Mithani SK, Mydlarz WK, et al: Inactivation of the tumor suppressor genes causing the hereditary syndromes predisposing to head and neck cancer via promoter hypermethylation in sporadic head and neck cancers. *ORL J Otorhinolaryngol Relat Spec* 72:44-50, 2010.
95. Szaumkessel M, Richter J, Giefing M, et al: Pyrosequencing-based DNA methylation profiling of Fanconi anemia/BRCA pathway genes in laryngeal squamous cell carcinoma. *Int J Oncol* 39:505-514, 2011.
96. Mendes-Pereira AM, Martin SA, Brough R, et al: Synthetic lethal targeting of PTEN mutant cells with PARP inhibitors. *EMBO Mol Med* 1:315-322, 2009.
97. Vens C, Begg AC: Targeting base excision repair as a sensitization strategy in radiotherapy. *Semin Radiat Oncol* 20:241-249, 2010.
98. Neijenhuis S, Verwijs-Janssen M, van den Broek LJ, et al: Targeted radiosensitization of cells expressing truncated DNA polymerase {beta}. *Cancer Res* 70:8706-8714, 2010.
99. Verheij M, Vens C, van Triest B: Novel therapeutics in combination with radiotherapy to improve cancer treatment: Rationale, mechanisms of action and clinical perspective. *Drug Resist Updat* 13:29-43, 2010.
100. Chan DA, Giaccia AJ: Harnessing synthetic lethal interactions in anticancer drug discovery. *Nat Rev Drug Discov* 10:351-364, 2011.
101. Wreesmann VB, Shi W, Thaler HT, et al: Identification of novel prognosticators of outcome in squamous cell carcinoma of the head and neck. *J Clin Oncol* 22:3965-3972, 2004.
102. Gibcus JH, Mastik MF, Menkema L, et al: Cortactin expression predicts poor survival in laryngeal carcinoma. *Br J Cancer* 98:950-955, 2008.
103. Rodrigo JB, García-Carracedo D, García LA, et al: Distinctive clinicopathological associations of amplification of the cortactin gene at 11q13 in head and neck squamous cell carcinomas. *J Pathol* 217:516-523, 2009.
104. Timpson P, Lynch DK, Schramek D, et al: Cortactin overexpression inhibits ligand-induced down-regulation of the epidermal growth factor receptor. *Cancer Res* 65:3273-3280, 2005.
105. de Koning PJ, Bovenschen N, Leusink FK, et al: Downregulation of SERPINB13 expression in head and neck squamous cell carcinomas associates with poor clinical outcome. *Int J Cancer* 125:1542-1550, 2009.
106. Shellenberger TD, Mazumdar A, Henderson Y, et al: Headpin: A serpin with endogenous and exogenous suppression of angiogenesis. *Cancer Res* 65:11501-11509, 2005.

## KOMENTARZ



*Dr hab. n. med. Romuald Krajewski,  
prof. nadzw. COI  
Katedra i Klinika  
Nowotworów Głowy i Szyi,  
Centrum Onkologii – Instytut  
im. Marii Skłodowskiej-Curie,  
Warszawa*

Wyniki leczenia chorych na nowotwory głowy i szyi, czyli w ponad 90% przypadków raka płaskonabłonkowego tej okolicy, poprawiają się bardzo powoli i w sumie należy je ocenić jako niezadowolające. Nawet dla raka krtani, w którym rokowanie jest najlepsze i udaje się wyleczyć ponad 70% chorych, wyniki prawie nie zmieniły się od 20-30 lat, co można interpretować jako ograniczenie obecnie stosowanych metod. Wprowadzenie radiochemioterapii nieco poprawiło wyniki leczenia, ale zwiększyło także częstość występowania działań niepożądanych i powikłań, ciągle zatem musimy poszukiwać możliwości udoskonalenia obecnie stosowanych metod leczenia.

Te problemy leżą u podstaw intensywnych poszukiwań sposobów identyfikacji chorych, u których wystarczające mogłoby być zastosowanie tylko jednej metody leczenia – albo standardowego leczenia skojarzonego, albo innych niestandardowych obecnie metod, na przykład terapii celowanej. Prawdopodobnie można by dzięki temu poprawić wyniki i zaoszczędzić chorym problemów związanych z działaniami niepożądanymi nieskutecznego leczenia.

Próby identyfikacji takich chorych na podstawie cech klinicznych lub histopatologicznych okazały się niewystar-

czająco skuteczne. Wydawało się, że te cechy są zbyt ogólne, by przewidzieć odpowiedź na leczenie i poza bardzo ogólnymi stwierdzeniami (np. że mniej zróżnicowane nowotwory są wrażliwsze na napromienianie i chemioterapię) nie są przydatne podczas podejmowania decyzji terapeutycznych. Od czasu pojawienia się możliwości sekwencjonowania DNA i innych metod identyfikacji znanych genów lub ich mutacji mamy nadzieję, że uda się znaleźć czynniki z dużą pewnością wskazujące, jakie leczenie należy zastosować. Zdrowy rozsądek i myślenie patofizjologiczne sugerują, że różnice w odpowiedzi na leczenie muszą być spowodowane konkretnymi różnicami w budowie i funkcjonowaniu komórek nowotworu, te zaś muszą wynikać z różnic w kodzie genetycznym. Skoro możemy sekwencjonować cały genom i użyć wielkich mocy obliczeniowych do analizy tych danych, wcześniej czy później znajdziemy te różnice.

Obecnie nie ma powodów, by sądzić, że zasada przedstawionego rozumowania jest niewłaściwa, wygląda jednak na to, że przydatne dla potrzeb klinicznych różnice znajdziemy znacznie później, niż oczekiwaliśmy. Praca Begg'a jest bardzo dobrym przeglądem aktualnego stanu wiedzy i badań poświęconych czynnikom przepowiadającym odpowiedź nowotworów głowy i szyi na promieniowanie. Podsumowując przedstawione w niej informacje, można stwierdzić, że nadal nie udało się znaleźć markerów ani genów dobrej (albo złej) odpowiedzi na radioterapię, które miałyby dużą wartość przepowiadającą. Poza nielicznymi wyjątkami, jak np. rozpoznanie zakażenia HPV lub ekspresja EGFR, wyniki badań wskazują na zaledwie nieco lepszą lub gorszą odpowiedź i umiarkowane korelacje, ale nie dają podstaw do zmiany standardowego postępowania, a o to nam przecież chodzi.

## Sprawdź swoją wiedzę

ONKOLOGIA  
po Dyplomie

TOM 9/NR 3 CZERWIEC 2012

- |                                |                             |                             |                             |                             |                                 |                             |                             |                             |                             |
|--------------------------------|-----------------------------|-----------------------------|-----------------------------|-----------------------------|---------------------------------|-----------------------------|-----------------------------|-----------------------------|-----------------------------|
| 1. A. <input type="checkbox"/> | B. <input type="checkbox"/> | C. <input type="checkbox"/> | D. <input type="checkbox"/> | E. <input type="checkbox"/> | 9. A. <input type="checkbox"/>  | B. <input type="checkbox"/> | C. <input type="checkbox"/> | D. <input type="checkbox"/> | E. <input type="checkbox"/> |
| 2. A. <input type="checkbox"/> | B. <input type="checkbox"/> | C. <input type="checkbox"/> | D. <input type="checkbox"/> | E. <input type="checkbox"/> | 10. A. <input type="checkbox"/> | B. <input type="checkbox"/> | C. <input type="checkbox"/> | D. <input type="checkbox"/> | E. <input type="checkbox"/> |
| 3. A. <input type="checkbox"/> | B. <input type="checkbox"/> | C. <input type="checkbox"/> | D. <input type="checkbox"/> | E. <input type="checkbox"/> | 11. A. <input type="checkbox"/> | B. <input type="checkbox"/> | C. <input type="checkbox"/> | D. <input type="checkbox"/> | E. <input type="checkbox"/> |
| 4. A. <input type="checkbox"/> | B. <input type="checkbox"/> | C. <input type="checkbox"/> | D. <input type="checkbox"/> | E. <input type="checkbox"/> | 12. A. <input type="checkbox"/> | B. <input type="checkbox"/> | C. <input type="checkbox"/> | D. <input type="checkbox"/> | E. <input type="checkbox"/> |
| 5. A. <input type="checkbox"/> | B. <input type="checkbox"/> | C. <input type="checkbox"/> | D. <input type="checkbox"/> | E. <input type="checkbox"/> | 13. A. <input type="checkbox"/> | B. <input type="checkbox"/> | C. <input type="checkbox"/> | D. <input type="checkbox"/> | E. <input type="checkbox"/> |
| 6. A. <input type="checkbox"/> | B. <input type="checkbox"/> | C. <input type="checkbox"/> | D. <input type="checkbox"/> | E. <input type="checkbox"/> | 14. A. <input type="checkbox"/> | B. <input type="checkbox"/> | C. <input type="checkbox"/> | D. <input type="checkbox"/> | E. <input type="checkbox"/> |
| 7. A. <input type="checkbox"/> | B. <input type="checkbox"/> | C. <input type="checkbox"/> | D. <input type="checkbox"/> | E. <input type="checkbox"/> | 15. A. <input type="checkbox"/> | B. <input type="checkbox"/> | C. <input type="checkbox"/> | D. <input type="checkbox"/> | E. <input type="checkbox"/> |
| 8. A. <input type="checkbox"/> | B. <input type="checkbox"/> | C. <input type="checkbox"/> | D. <input type="checkbox"/> | E. <input type="checkbox"/> | 16. A. <input type="checkbox"/> | B. <input type="checkbox"/> | C. <input type="checkbox"/> | D. <input type="checkbox"/> | E. <input type="checkbox"/> |

## Proszę wpisać dane albo przybić pieczętkę z adresem

Imię i nazwisko .....

Adres .....

Telefon .....

I specjalność ..... stopień .....

e-mail .....

II specjalność ..... stopień .....

Wyrażam zgodę na przetwarzanie moich danych osobowych przez Medical Tribune Polska Sp. z o.o. z siedzibą w Warszawie ul. 29 Listopada 10 dla celów marketingowych, w tym dla marketingu produktów i usług innych podmiotów. Zgadzam się na otrzymywanie informacji handlowych przesyłanych środkami komunikacji elektronicznej. Podane dane nie będą udostępniane innym podmiotom (odbiorcom). Dane zostały podane dobrowolnie. Każdej osobie, której dane dotyczą przysługuje prawo dostępu do treści swoich danych i ich poprawiania.

Odpowiedzi prosimy nadsyłać na adres redakcji do dnia 1 sierpnia 2012 r. (decyduje data stempla pocztowego).

Jest parę ciekawych aspektów poznawczych tej sytuacji, która zresztą dotyczy wykorzystania badań genomu także do innych celów, na przykład oceny ryzyka występowania przerzutów. W okolicy głowy i szyi ocena cechy N jest dość trudna, przydatność oznaczeń węzła wartowniczego jest ograniczona i postępowanie z chorymi bez przerzutów w węzłach chłonnych jest ciągle przedmiotem dyskusji. Wiarygodne komórkowe wskaźniki skłonności do tworzenia przerzutów bardzo ułatwiłyby decyzję, ale podobnie jak poszukiwania czynników warunkujących odpowiedź na radioterapię, badania nie przyniosły na razie jednoznacznych wyników. Charakterystyczne jest tu wspomniane również przez Begga proponowanie czynników dobrze lub nawet bardzo dobrze korelujących z wynikami leczenia, których przydatność następnie nie znajduje potwierdzenia w pracach innych autorów ani w praktyce klinicznej. Znany z krytycznego podejścia do mechanizmów badań i publikacji Ioannidis wskazuje na wiele elementów składających się na skłonność badaczy do znajdowania korelacji i zależności tam, gdzie ich nie ma, a także na skłonność wydawców do szybkiego publikowania pozytywnych wyników.<sup>1</sup> Spore znaczenie może w tym procesie mieć wskazana w artykule Begga metoda opierania się na hipotezach związanych ze znanymi procesami biologicznymi, takimi jak promieniowrażliwość, niedotlenienie i repopulacja. Poszukiwanie potwierdzenia tych hipotez może powodować skłonność do uzyskiwania pozytywnych wyników. Jednak odmienne podejście, oparte na badaniach przesiewowych niezakładających żadnego konkretnego mechanizmu wywołującego obserwowane różnice w odpowiedzi na leczenie, też dotychczas nie umożliwiło znalezienia wiarygodnych czynników przepowiadających. Tu z kolei występuje problem analizy *ex post*, która w badaniach klinicznych jest niedopuszczalna. Jeśli przeanalizujemy dostatecznie dużą liczbę danych bez wstępnych założeń, na pewno znajdziemy jakieś korelacje, ale bez zrozumienia mechanizmów leżących u podstaw stwier-

dzonych różnic trudno uznać je za istotne w praktyce, nawet jeżeli analiza statystyczna takie różnice wykaże.

Opisane przez Begga wyniki badań sugerują większą, niż sądzimy złożoność procesów decydujących o odpowiedzi na leczenie i przebiegu choroby. Autor wspomina o tym przy omawianiu zjawiska repopulacji. Zależy ona od wielu czynników i dostępne metody badawcze, określające szybkość proliferacji w określonym etapie rozwoju nowotworu i leczenia, nie pozwalają na przewidywanie repopulacji w zmienionych przez leczenie warunkach.

Mamy zatem do czynienia z dość typową sytuacją. Wiele badań przeprowadzonych w laboratorium i wstępnych prób klinicznych wskazuje liczne czynniki przepowiadające odpowiedź na leczenie napromienianiem, ale w praktyce klinicznej przydatne okazują się bardzo nieliczne. Nieco ubocznym korzystnym produktem tych badań mogą się okazać pozyskane informacje o nowych celach terapeutycznych. Najbardziej znany przykład to ekspresja EGFR i leczenie cetuksymabem. Możliwość wykorzystania syntetycznej letalności stwarza nadzieję na skuteczne leczenie o małej toksyczności.

Wydaje się jednak, że znalezienie Świętego Graala, czyli genu, białka, receptora lub ich kombinacji, które wskazywałyby, jakie leczenie należy zastosować u chorych na nowotwory głowy i szyi, jest jeszcze dość odległe. Szkoda, że mimo fantastycznego rozwoju metod badawczych i nagromadzenia ogromnej liczby danych poznanie mechanizmów oporności nowotworów na leczenie ciągle jest przed nami, bo w leczeniu chorych na nowotwory głowy i szyi potrzebny jest jakiś przełom, którego na razie nie widać.

#### PIŚMIENNICTWO

1. Ioannidis JPA. Why Most Published Research Findings Are False. *PLoS Med* 2005;2(8):e124.