

## Obsah

1	SOUHRN.....	4
2	SUMMARY.....	5
3	CÍLE PRÁCE.....	6
4	TEORETICKÝ ÚVOD DO PROBLEMATIKY.....	7
4.1	Nádory hlavy a krku.....	7
4.1.1	Patogeneza, etiologie.....	7
4.1.2	Histologie nádorů HaN.....	7
4.1.3	Incidence a mortalita nádorů hlavy a krku.....	7
4.2	Modality léčby nádorů HaN.....	8
4.2.1	Strategie léčby.....	8
4.3	Cyklooxygenáza.....	9
4.3.1	Obecné poznámky.....	9
4.3.2	Inhibitory cyklooxygenázy-2 v onkologii.....	10
4.4	Studie fáze I.....	11
4.4.1	Design studií fáze I.....	11
4.4.2	Hodnocení studie fáze I.....	12
5	METODIKA PRÁCE.....	13
5.1	Náběr pacientů, vstupní a vylučovací kritéria.....	13
5.1.1	Vstupní kritéria pro zařazení do studie.....	13
5.1.2	Vylučovací kritéria.....	13
5.2	Parametry radioterapie.....	13
5.2.1	Parametry dávek a frakcionace ozařování.....	13
5.2.2	Definice cílových objemů.....	13
5.2.3	Technika.....	14
5.3	Celebrex.....	14
5.4	Hodnocení toxicity, hodnocení léčebné odpovědi.....	15
5.4.1	Metodika hodnocení časně a pozdní toxicity.....	15
5.4.2	Definice DLT (toxicita limitující dávku).....	15
5.4.3	Definice cílové dávky (phase II recommended dose).....	15
5.4.4	Metodika hodnocení léčebné odpovědi.....	15
5.5	Histochemické zpracování vzorků tkání.....	15
5.6	Zpracování sérových vzorků k detekci VEGF.....	16
5.7	Statistické zpracování.....	16
6	PRAKTICKÁ ČÁST, VÝSLEDKY PRÁCE.....	17
6.1	Pacientský soubor.....	17
6.1.1	Charakteristika pacientů.....	17
6.1.2	Anatomická distribuce nádorů.....	17
6.1.3	Stádium onemocnění.....	17
6.1.4	TNM.....	17
6.1.5	Histologie.....	18
6.2	Radioterapie.....	18
6.3	Celebrex.....	18
6.4	„Phase II dose“.....	19
6.5	Celkové zhodnocení toxicity radioterapie.....	19
6.5.1	Časná toxicita.....	19
6.5.2	Pozdní toxicita.....	20
6.6	Expresce cyklooxygenázy.....	21
6.7	Sérové hladiny VEGF.....	21
6.8	Korelace mezi COX2 a VEGF.....	22
6.9	Léčebná odpověď, follow-up.....	23
7	DISKUZE.....	25

8	ZÁVĚR.....	26
9	LITERATURA .....	27
10	PŘEHLED PUBLIKAČNÍ ČINNOSTI <b>Chyba! Záložka není definována.Chyba! Záložka není definována.</b>	

### Seznam použitých zkratk

3D CRT	Three-dimensional conformal radiation therapy, trojrozměrná konformní radioterapie
Akt (AKT)	Serine/treonin specifická proteinová kináza
ALT	Alanin aminotransferáza
AST	Aspartát aminotransferáza
<i>Bcl-2</i>	Gen B-cell lymphoma – 2, apoptotický regulační protein
CB5w	Concomitant boost radiotherapy in 5 weeks, radioterapie v režimu konkomitantní boost 5- týdenní
CB6w	Concomitant boost radiotherapy in 6 weeks, radioterapie v režimu konkomitantní boost 6- týdenní
COX	Cyclooxygenase, cyklooxygenáza, enzym zodpovědná za tvorbu biologických mediátorů prostanoidů
COX 1	Cyclooxygenase 1, cyklooxygenáza 1, isoenzym COX
COX 2	Cyclooxygenase 2, cyklooxygenáza 2, isoenzym COX
CT	Computed tomography, počítačová tomografie
CTC AE	Common Terminology Criteria for Adverse Events, standardizovaná klasifikace hodnocení nežádoucích účinků při onkologické léčbě
CTV	Clinical target volume, klinický cílový objem
ČR	Česká republika
Dg.	Diagnóza
DICOM	Digital Imaging and Communications in Medicine, Digitální zobrazení a komunikace v medicíně – standardy ke zpracování obrazové dokumentace v medicíně
DLT	Dose limiting toxicity, toxicita limitující dávku léku
DNA	Deoxyribonucleic acid, kyselina deoxyribonukleová
DVH	Dose-volume histogram, dávkově objemový histogram, koncept shrnutí 3D distribuce dávky do 2D formátu
ECOG	Eastern Cooperative Oncology Group, východní kooperativní skupina pro onkologii, kooperativní skupina založena 1955 k provádění multicentrických studií
EGF	Epidermal Growth Factor, epidermální růstový faktor
EGFR	Epidermal Growth Factor Receptor, receptor pro epidermální růstový faktor
ELISA	Enzyme-Linked Immunosorbent Assay, imunologická metoda sloužící k detekci protilátek
FGF	Fibroblast growth factor, fibroblastový růstový faktor
FN	Fakultní nemocnice
g	Gram, gram, jednotka hmotnosti metrického systému (1/1000 základní SI jednotky kilogram)
GTV	Gross target volume, objem nádoru (překlad dle Šampa P., Petera J. a kolektiv, reference č. 10)
Gy	Gray, gray, odvozená jednotka absorbované dávky záření v soustavě SI odpovídající absorpci jednoho joule energie ve formě ionizujícího záření na jeden kilogram hmoty
HaN	Head and neck, nádory oblastí hlavy a krku
HARD ROCK	Head and neck cancer: assesment of risk factors, stage, distribution, radiotherapy optimization, causes of relapse – keypoints, registr pacientů s nádory hlavy a krku ve FN Ostrava založený k hodnocení rizikových faktorů, stádií, optimalizace radioterapie a identifikace příčin relapsu.
HER2	Human epidermal growth factor receptor type 2, receptor pro epidermální růstový faktor ze skupiny EGFR, typ 2
HF	Hyperfractionation, hyperfrakcionace, ozařovací režim
HPV	Human Papiloma Virus, lidský papilomavirus, jeden z více než 100 různých typů papilomaviru, který napadá lidské buňky
ICRU	International Commission on Radiation Units, organizace založena r. 1925 vytvářející doporučení ohledně dávek, jednotek radiace a radioaktivity a použití v radioterapii a radiobiologii

IMRT	Intensity modulated radiotherapy, léčba zářením s modulovanou intenzitou
kg	Kilogram, kilogram, základní jednotka hmotnosti soustavy SI
KI	Karnofsky index, škála hodnocení celkového stavu pacienta vytvořená roku 1949 k posuzování kvality života
l (L)	Litr, metrická jednotka objemu odpovídající 0,001 metru krychlového
LOH	Loss of heterozygosity, molekulární mechanismus genetické mutace, kdy dochází ke ztrátě funkce jedné normální alely genu, když ta druhá již dříve byla neaktivní
LQ	Linear quadratic model, lineárně kvadratický model, radiobiologický model buněčného přežití po ozáření
MAD	Maximum administered dose, maximální podaná dávka ve studii fáze I
mg	Miligram, odvozená jednotka hmotnosti soustavy SI
ml	Mililitr, odvozená metrická jednotka objemu
mRNA	Messenger ribonucleic acid, messenger ribonukleová kyselina
MTD	Maximum tolerated dose, maximální tolerovaná dávka ve studii fáze I
µg	Mikrogram, odvozená jednotka hmotnosti soustavy SI
µkat	Mikrokatal, odvozená jednotka soustavy SI vyjadřující aktivitu enzymu
µm	Mikrometr, odvozená jednotka vzdálenosti soustavy SI
µmol	Mikromol, odvozená jednotka soustavy SI pro látkové množství
NCI	National Cancer Institute, Národní onkologický institut, vládní organizace vlády Spojených států amerických zajišťující koordinaci onkologických programů
NF	Normofractionation, normofrakcionace, ozařovací režim
Ng	Nanogram, odvozená jednotka hmotnosti soustavy SI
ORL	Oto-rhino-laryngologie, obor: nosní-krční-ušní
PGH2	Prostaglandin H2, hormonům podobná látka odvozená z kyseliny arachidonové
PS	Performance Status, škála vytvořená ECOG užívána lékaři a vědci k hodnocení progresu onemocnění pacienta a stupně ovlivnění denních aktivit pacienta nemocí
PTV	Planned target volume, plánovací cílový objem
RECIST	Response Evaluation Criteria In Solid Tumors, kritéria pro hodnocení léčebné odpovědi
RT	Radiotherapy, léčba zářením
RTOG	Radiation Therapy Oncology Group, pracovní kooperativní skupina pro léčbu zářením založena National Cancer Institute r. 1968
s	Sekunda, jednotka času soustavy SI
SI	Le Système International d'Unités, mezinárodně domluvená soustava jednotek fyzikálních veličin
TNFα	Tumor necrosis factor alpha, faktor nádorové nekrozy alfa
TNM	Tumor, Lymph Node, Metastasis – klasifikace onemocnění dle pokročilosti nádoru, rozsahu postižení lymfatických uzlin a metastatického postižení
VEGF	Vascular endothelial growth factor, vaskulární endoteliální růstový faktor
vs.	Versus, oproti
v-src	Viral sarcoma gene, onkogen
WHO	World Health Organization, Světová zdravotnická organizace, mezinárodní kordinační organizace Organizace spojených národů
Wnt	Nitrobuněčná signalizační dráha

# 1 SOUHRN

## Kombinace radioterapie a inhibitorů cyklooxygenázy-2 v léčbě pokročilých nádorů hlavy a krku (studie fáze I)

Tato práce popisuje průběh a prezentuje výsledky studie fáze I kombinující standardní ozařovací techniku pokročilých nádorů ORL a stomatologické oblasti s inhibitorem COX2 (Celebrexem) jakožto potenciačním „chemoterapeutikem“. Cílem bylo stanovení maximální dávky Celebrexu pro účely dalšího klinického testování.

V úvodu práce prezentuji přehledy incidence a mortality nádorů HaN ve světě a v ČR, dále preklinické předpoklady k zařazení Celebrexu do kombinované léčby s radioterapií. Zvláštní důraz v teoretickém úvodu práce byl kladen i na prezentaci lokální dat z Kliniky onkologické v Ostravě, kde tato studie byla prováděna, a to nejen stran incidence či mortality, ale i stran přehledu používaných léčebných modalit a jejich nežádoucích účinků. Studie fáze I sama o sobě nezahrnuje komparaci s kontrolním souborem, je tedy nutné při její přípravě podrobně znát obecné i lokální standardy, aby bylo možno vhodně nastavit kritéria náboru pacientů a hodnocení toxicity a maximální tolerovatelné dávky testované léčby.

Dodatečně v této studii byly zkoumány exprese COX2 v nádorech a hladiny VEGF jakožto biomarkeru nádorové vaskulogenezy, resp. jejího předpokládaného poklesu při regresi tumoru.

Práce zahrnovala přípravu studie, zajištění financování paraklinických vyšetření, schválení etickou komisí, náběr pacientů, provedení radioterapie, distribuci studijní medicíny, zpracování histologických vzorků, zpracování sérových vzorků, sledování pacientů a sběr a statistické zpracování dat.

Pacienti byli zařazováni do studie dle vstupních kritérií, která primárně zahrnovala lokálně pokročilá stadia dlaždicobuněčných karcinomů. Celkem bylo dle kritérií zařazeno do studie 32 pacientů. Všichni byli ozařováni v režimu šestitýdenního konkomitantního boostu (72Gy) a všichni radioterapii dokončili. Dále pacienti užívali Celebrex po celou dobu ozařování od prvního do posledního dne ozařování. Dávka Celebrexu byla eskalována v několika kohortách, nejnižší dávka byla 400mg Celebrexu na den, nejvyšší pak 1600mg/den. Jako nejvyšší dávka s tolerovatelnou toxicitou byla stanovena dávka 1200mg/den. Tato dávka je vyšší než dříve publikované výsledky v dostupné literatuře, kde nejvyšší doporučenou dávkou bylo 800mg/den.

Hladiny VEGF v séru byly testovány metodou ELISA. Odběry byly prováděny před ozařováním, v polovině ozařovacího cyklu, po ukončení iradiace a 6 týdnů po ukončení radioterapie. Pokles sérového VEGF na statisticky signifikantní úrovni byl prokázán mezi hladinami před zahájením iradiace a 6 týdnů po ukončení léčby. Tento pokles byl korelován s expresí COX2 v nádorové tkáni. Ta byla vyšetřována semikvantitativně imunohistochemickými metodami. Exprese byla označována jako vysoká, pokud byla nad 50% nádorových buněk, v opačném případě byla označena jako nízká. Při podrobnější analýze bylo zjištěno, že pokles sérové VEGF po léčbě byl zaznamenán pouze u pacientů s nádory s vysokou expresí COX2. Toto testování probíhalo na klinické úrovni a nedovoluje tedy vysvětlení molekulárního mechanismu toho jevu, nicméně naznačuje propojení drah COX2 a VEGF.

Tato práce přinesla několik nových zjištění a to, že maximální tolerovatelná dávka Celebrexu při kurativní radioterapii nádorů HaN je 1200 mg/den a dále že u tumorů s nadpoloviční populací buněk exprimujících COX2 dochází ke statisticky významnému poklesu VEGF v poléčebném sledování.

## 2 SUMMARY

### **Combined treatment of advanced head and neck cancer with radiotherapy and cyclooxygenase-2 inhibitors (phase I study)**

This paper describes the course and presents the outcomes of a original phase I study of combined treatment of advanced head and neck cancer using standard radiotherapeutic technique and COX2 inhibitor (Celebrex) as a potentiating agent. The primary goal of the study was identifying of the maximum tolerated dose of Celebrex for the purpose of further clinical investigation.

In the theoretical introduction I present data on the incidence and mortality of HaN cancer worldwide and in the Czech republic, further preclinical data justifying use of Celebrex in combined treatment with radiotherapy. Special emphasis was put on presentation of local data systematically gained in Clinic of Oncology in Ostrava where this study has been conducted. These data include an overview of incidence, mortality, therapeutic methods and treatment toxicity profiles. Since the phase I study as such does not include comparison with control patient group, it is necessary to be aware of local standards. This is the background to establish inclusion criteria for patient recruitment, toxicity evaluation and setting maximum tolerance dose criteria.

This study furthermore investigates expression of COX2 in tumor tissue and serum VEGF level as a potential marker of vasculogenesis or its drop corresponding to tumor regression respectively.

This project included preparation of study, securing financial support, obtaining ethical committee approval, further the recruitment of patients, conducting radiotherapy, distribution of study medication, processing of biopsy tumor tissue, processing of serum specimens, follow-up of patients, collecting and statistical analysis of data.

Patient recruitment followed predefined inclusion criteria. The main criterion was a presence of locally advanced not operated squamous cell carcinoma. All together 32 subject were included. All patients were irradiated up to 72Gy with concomitant boost technique and all patients completed prescribed therapy. Patients were administered Celebrex during the whole course of radiotherapy, including weekend days. The dose of Celebrex was escalated by doubling among study cohorts. The starting dose was 400 mg per day, the highest administered dose was 1600 mg per day. The maximum tolerated dose of Celebrex that did not generate any extra toxicity was established at 1200mg per day. This dose was higher than any other presented in literature since the published MTD was 800 mg per day.

Serum VEGF levels were tested with ELISA. Samples were obtained before treatment start, in the middle of treatment course, at the end of treatment and 6 weeks after completion of treatment. Statistically significant drop of VEGF level was demonstrated between the levels on treatment start and in 6-week follow-up. The outcome was further correlated with initial COX2 expression in tumor tissue. The COX2 expression was evaluated with semiquantitative immunohistochemistry methods. Expression of COX2 over 50% was considered high, below or equal 50% reckoned as low. The analysis has shown that VEGF level drop was present only in patient with high COX2 expression in their tumors. This assessment was conducted in clinical setting, therefore it does not explain cellular or molecular basis of this phenomenon, nonetheless it proves the interconnection of COX2 and VEGF pathways.

This project brought few new findings; maximum tolerance dose of Celecoxib in patients with locally advanced head and neck cancer treated with radiotherapy with curative intent is 1200 mg per day. Further, in patients with tumors expressing COX2 in more than 50% of tumor cell a statistically significant drop of VEGF serum level can be observed in follow-up.

### 3 CÍLE PRÁCE

Zhoubné nádory hlavy a krku (HaN) je termín popisující malignity otorhinolaryngologické a stomatologické oblasti. Onkologická léčba těchto nádorů i přesto, že je multimodální, často selhává, je tedy nutností neustále hledat metody, jak tyto nádory léčit s větší úspěšností.

Cílem práce prezentované níže je klinické hodnocení fáze I u primárně kurativní radioterapie (RT) těchto nádorů s konkomitantním podáním inhibitoru cyklooxygenázy 2 (COX2), jakožto lékem s možným radiosensitizujícím potenciálem.

**Primárním cílem** klinického hodnocení byla identifikace doporučené dávky pro provedení studie fáze II (phase II recommended dose) a zhodnocení toxicity této kombinované terapie.

**Sekundárním cílem** práce bylo stanovení klinické odpovědi na tuto kombinovanou terapii. Dále tato práce si stanovila za cíl vyšetření plasmatických hladin vaskulárního endoteliálního růstového faktoru (VEGF) jakožto korelátu vaskulogeneze v tumoru a zhodnocení relace mezi expresí COX2 v nádorové tkáni a vývojem hladin sérové VEGF

## 4 TEORETICKÝ ÚVOD DO PROBLEMATIKY

### 4.1 Nádory hlavy a krku

Zhoubné nádory otorhinolaryngologické a stomatologické oblasti zahrnují malignity dutiny nosní, nasopharyngu, rtů, dutiny ústní, slinných žláz, nádory hltanu a hrtanu.

Tato práce řeší problematiku nádorů dutiny ústní, baze ústní, hltanu a hrtanu [104]. Do této práce nebyly zahrnuty nádory nosu, nosohltanu, paranazálních dutin a nádory slinných žláz, které zde sice patří anatomicky, jedná se však o nádory s jinou histopatologií a odlišným klinickým chováním a prognózou.

#### 4.1.1 Patogeneza, etiologie

Vznik dlaždicobuněčných nádorů HaN je tzv. multifaktoriální. V Evropě a Severní Americe je často nacházena souvislost s chronickým drážděním sliznic při abúzu alkoholu a kouření tabákových výrobků. Patogeneticky se jedná o chemickou kancerogenezi a chronické dráždění [1, 10]. Asi u 25-50% tumorů HaN se při vyšetření bioptických vzorků nachází onkogenní varianty HPV (human papiloma virus). Jedná se o papilomaviry HPV 2, HPV 11, a nejdůležitější HPV 16 [5, 10, 96, 97].

#### 4.1.2 Histologie nádorů HaN

Léze v dutině ústní ne vždy jsou primárně maligní a invazivní. Část zhoubných nádorů vychází z neinvazivních patologií postupným vývojem [1]. U většiny malignit se jedná o dlaždicobuněčné/spinocelulární karcinomy (95% vyšetřených histologií) vycházející z dlaždicobuněčného epitelu sliznic dutiny ústní a horních dýchacích či polykacích cest. Chování dlaždicobuněčných karcinomů v ORL oblasti je klinicky i prognosticky velmi podobné, proto se k jejich terapii přistupuje jako k homogenní skupině diagnóz [1, 2, 10]. Mezi dalších 5% malignit HaN jsou melanomy, adenokarcinomy vycházející ze slinných žláz, lymfoepiteliomy nasopharyngu a další raritní tumory [10].

#### 4.1.3 Incidence a mortalita nádorů hlavy a krku

##### 4.1.3.1 Incidence novotvarů ORL

Spinocelulární karcinomy HaN jsou celosvětově v pořadí incidence šestou nejčastější malignitou. Roční výskyt celosvětově je více než 650 000 případů [2, 3]. V České republice nádory hlavy a krku představují 2-3% diagnostikovaných zhoubných nádorů [8, 10]. Incidence nádorů HaN v celkovém měřítku všech nádorů není vysoká, nicméně jedná se o onemocnění s problematickou a náročnou léčbou a velmi závažnou prognózou.

Většina nádorů HaN se vyskytuje v oblasti laryngu, orofaryngu a dutiny ústní [10].

I přes pokroky v léčbě těchto tumorů se dlouhodobé přežití (5- leté sledování) v posledních 50 letech pohybuje u časných stádií na úrovni 80%, u pozdních stádií 20% [3].

##### 4.1.3.2 Situace na Klinice onkologické Fakultní nemocnice Ostrava (FN Ostrava)

Studie fáze I, která je prezentována v praktické části této práce, byla prováděna na Klinice onkologické FN Ostrava. Na této klinice byl pro účely sledování a srovnávání léčebných úspěchů založen registr pacientů s nádory hlavy a krku pod názvem HARDROCK (Head and neck cancer: assesment of risk factors, stage, distribution, radiotherapy optimalization, causes of relapse – keypoints). Projekt byl koncipován jako retrospektivní sběr klinických dat. Cílovými parametry sledovanými v registru jsou krátkodobé i dlouhodobé výsledky léčby pacientů s nádory hlavy a krku [59]. Právě z dat získaných z tohoto registru vyplynula potřeba realizace této studie a nastavení kritérií zařazování a hodnocení nežádoucích účinků.

## 4.2 Modality léčby nádorů HaN

Léčba nádorů hlavy a krku se odvíjí od stádia pokročilosti onemocnění v době stanovení diagnózy.

### 4.2.1 Strategie léčby

Často se jedná o multimodální terapii, s individuálním načasováním jednotlivých léčebných modalit. Každého pacienta je nutno posuzovat individuálně v rámci mezioborové spolupráce a doporučit individuální postup, který vychází nejen z určení stadia onemocnění dle TNM (Tumour, Node, Metastasis) klasifikace [9], z celkového stavu pacienta (KI, WHO PS), z národních či mezinárodních doporučených postupů ale i v neposlední řadě z preference pacienta.

Onemocnění ve stádiu I a II jsou lokalizovaná a ohraničená na daný orgán či anatomickou oblast. Terapií 1. volby v těchto případech bývá léčba chirurgická, která u těchto stádií onemocnění je řešením radikálním. Lze volit i radioterapii jakožto léčbu 1. volby a v těchto stádiích onemocnění mohou obě tyto modalities terapie zajistit rovnocenné výsledky léčby [10, 102].

U pokročilých stádií onemocnění, stádia III nebo IV, je situace složitější. Zde chirurgové musí rozhodnout, zda a za jakých okolností je u daného pacienta možná resekce tumoru, spádových lymfatických uzlin a bezpečnostních lemů okolních tkání. Kritéria resekability nejsou arbitrárně stanovena a jsou závislá nejen na rozsahu onemocnění u daného pacienta, perioperativních zdravotních rizicích pacienta ale také zkušeností daného centra, schopností operátorů a technickém zázemí pracoviště [102]. V různých anatomických lokalizacích je zkoumán přínos toho či onoho přístupu a jsou identifikovány rizikové a prognostické faktory, které by mohly posloužit jako vodítko při rozhodování o strategii léčby [10].

Tam, kde onemocnění je primárně hodnoceno jako neresekabilní, je základem léčby radioterapie. Ke zlepšení výsledků terapie je při kurativním záměru léčby zařazována potenciační chemoterapie, recentně na základě studia nitrobenzimidazolových drah také tzv. biologická terapie [98, 99] nebo alternativní (optimalizovaná) schémata radioterapie – akcelerace, hyperfrakcionace [83, 84].

#### 4.2.1.1 Radiobiologické předpoklady použití hyperfrakcionační terapie

Vzhledem tomu, že v praktické části této práce bylo využito ozařovací schéma v režimu 6-týdenního konkomitantního boostu, dovoluji si zde tuto otázku více rozvést.

Využití hyperfrakcionované radioterapie při ozařování nádorů HaN je založeno na radiobiologických propočtech dle lineárně kvadratického modelu (LQ). Hyperfrakcionace dovoluje ozáření cílového objemu vysokou dávkou záření bez navýšení pozdní toxicity okolních zdravých tkání. Šestitýdenní režim konkomitantní radioterapie využívá jak faktorů navýšení dávky na den a časového faktoru akcelerace.

Parametry výpočtu:

- celková dávka 72 Gray v 6 týdnech,
- jednotlivé frakce 30 x 1,8 Gy a současně 12 x 1,5 Gy v posledních 2,5 týdnech radioterapie, tj. 54 Gy dopolední dávky, 18 Gy odpolední dávky,
- $\alpha/\beta$  poměr pro nádory hlavy a krku = 10,
- $\alpha/\beta$  poměr pro pozdní následky na podkoží = 2,
- faktor zkrácení radioterapie o 1 den ozařování = 0,8 Gy.

Po výpočtu dle LQ modelu je oproti normofrakcionaci navýšení dávky na ozařovaný tumor o 4,53 Gy, zatímco, co se týče pozdních následků radioterapie na zdravé tkáně, je vypočítán pokles dávky o 2 Gy. Podrobné výpočty i tabulky parametrů k výpočtu jsou prezentovány v příručce radiobiologie [82]. Rovněž v praxi retrospektivní klinická srovnání prokázala, že hyperfrakcionovaná akcelerovaná radioterapie poskytuje zlepšení lokoregionální kontroly ve srovnání s normofrakcionací [83]. Obdobné výsledky přinesla i metaanalýza zaměřená na celkové přežití zahrnující různá hyperfrakcionační a akcelerační schémata [84].



#### 4.2.1.2 Situace na Klinice onkologické FN Ostrava – radioterapie

V období 2004-2005 byly v případě indikace léčby zářením používány pouze strategie normofrakcionace a hyperfrakcionace. Strategie konkomitantního boostu (5-týdenního či 6-týdenního) začaly být používány až v letech 2006-2010.

Tabulka č. 1: Strategie radioterapie v letech 2006 – 2010

	Kurativní léčba		Paliativní léčba	
	3D	IMRT	3D	IMRT
CB5w	9,80%	9,00%		
CB6w	8,10%	5,90%		
HF	1,70%			
NF	40,30%	12,60%	12,40%	0,20%

CB5w – režim 5-týdenního konkomitantního boostu (67,5 Gray/40 frakcí - fáze 1: 45 Gray/25 frakcí/5týdnů a fáze 2: 22,5 Gray/15 frakcí/3 týdny)

CB6w – režim 6-týdenního konkomitantního boostu (72 Gray/42 frakcí - fáze 1: 54 Gray/30 frakcí/6týdnů a fáze 2: 18 Gray/12 frakcí/2,5 týdne)

HF – hyperfrakcionační režimy (různé režimy s více než 1 frakcí denně každý den, redukce dávky na každou frakci)

NF – normofrakcionace (10 Gray/5frakcí/1 týden)

3D – technika plánování radioterapie s využitím trojrozměrného plánování

IMRT - léčba zářením s modulovanou intenzitou záření

#### 4.2.1.3 Situace na Klinice onkologické FN Ostrava - toxicita radioterapie

Praktická část této disertační práce se zabývá provedením a zhodnocením klinické studie fáze I. Stěžejním cílem této práce je tedy hodnocení toxicity terapie.

Toxicita byla a nadále je na Klinice onkologické FN Ostrava hodnocena dle RTOG kritérií – Radiation Therapy Oncology Group [60].

Akutní toxicitou při léčbě nádorů hlavy a krku radioterapií je nejčastěji postižena kůže, sliznice, slinné žlázy, hltan a jícn, (v plné verzi dizertační práce prezentováno v příloze č. 3).

Pozdní toxicitou při léčbě nádorů hlavy a krku radioterapií je nejčastěji postižena kůže, podkoží, sliznice, hrtan či slinná žláza.

### 4.3 Cyklooxygenáza

#### 4.3.1 Obecné poznámky

Cyklooxygenázy (COX) jsou enzymy působící konverzi kyseliny arachidonové na prostaglandiny. Tyto metabolity hrají klíčovou roli ve fyziologických a patofyziologických procesech organismu. Byly prokázány 2 izoformy tohoto enzymu – COX1 (cyklooxygenáza 1) a COX2 (cyklooxygenáza 2). Aktivitou COX1 je udržování homeostatických funkcí. COX1 je považován za konstitutivní enzym, jenž se vyskytuje ve sliznici žaludku, střev, v ledvinách, či trombocytech [91], ovlivňuje tonus cév a reguluje krevní průtok či hraje úlohu v imunitní odpovědi.

COX2 je naopak indukovaný enzym, tvořený v buňkách pouze za specifických okolností. Za normálních okolností jsou koncentrace tohoto enzymu v tkáních minimální, přítomnost ve vyšších koncentracích je prokázána v patologicky změněných tkáních (zánět, nádor) [27]. Podrobnější výzkum ukázal, že vysoká exprese COX2 se nachází v novotvořených neoplastických epitelech, v imunitních buňkách v rámci nádorů, ve stromálních fibroblastech a endotelech novotvořených cév [93].

Syntéza COX2 je stimulována růstovými faktory EGF (endothelial growth factor), VEGF (vascular endothelial growth factor), FGF (fibroblast growth factor), cytokiny, TNF

alfa (tumor necrosis growth factor alpha), interleukiny a tumor promotory. Některé genové mutace jako např. u genů pro proteiny HER-2/neu, v-src, wnt signalizační dráhy také způsobují up-regulaci syntézy COX2 [11, 12, 105].

Nadprodukce enzymu COX2 či overexprese mRNA (messenger ribonukleová kyselina) pro COX2 byla prokázána u nádorů tlustého střeva, jícnu, plic, prsu, prostaty či ORL oblasti [12, 29, 30, 31]. Zvýšené hodnoty byly zjištěny však i u adenomů a prekanceróz, ale stejně tak i u nádorových metastáz. Zdá se, že metabolity kyseliny arachidonové ovlivňují hyperproliferaci, transformaci, nádorový růst, invazi a metastázování [34, 105].

#### **4.3.2 Inhibitory cyklooxygenázy-2 v onkologii**

Obecně se inhibitory COX užívají na léčbu bolesti, horeček a zánětů. Od 90. let 20. století byly však zjištěny další účinky těchto léků, včetně jejich protinádorového efektu. Bylo prokázáno, že v nádorových lézích je exprese vysoká a užívání inhibitorů cyklooxygenázy snižuje produkci prostaglandinů a působí v dané populaci snížení incidence některých nádorů [14, 15]. Inhibice cyklooxygenázy neselektivně ovlivňuje nejen patologické procesy, ale bohužel i přirozenou homeostázu tkání [91]. Klinická praxe se proto zaměřuje na selektivní inhibici pouze izoenzymu COX2, která by neovlivňovala funkce sliznic či renální průtok.

##### **4.3.2.1 Epidemiologický důkaz**

Jeden z prvních důkazů o ovlivňování nádorové patogeneze inhibitory cyklooxygenázy přinesly retrospektivní epidemiologické studie u pacientů s kolorektálním karcinomem a familiární adenomatózní polypózou. Tato hodnocení prokázala, že pacienti užívající nesteroidní antiflogistika z neonkologické indikace měli mírnější průběh onkologického onemocnění a že u familiární adenomatózní polypózy pozdější výskyt invazivního karcinomu [16, 17, 37]. I další studie u jiných tumorů (karcinomy prsů, plic, žaludku, jícnu) prokázaly podobný efekt [18].

##### **4.3.2.2 Overexprese v tumorech**

Expresi COX2 v premaligních i maligních lézích bývá zvýšena oproti hladinám v původní fyziologické tkáni, ze které léze vychází. Expresi COX2 je zvýšená v průběhu celé tumorigeneze, od hyperproliferace tkáně až po metastatické onemocnění. Nadměrnou expresi COX2 (až 100 násobně vyšší) lze prokázat u 40-80% nádorů, např. u kolorektálního karcinomu, karcinomu prsu, pankreatu, plic, prostaty... [19, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33].

Nadprodukce COX2 v tkáních koreluje se zvýšenou invazivitou onemocnění, velikostí a diferenciací tumoru, s rozsahem lymfatického postižení, rozsahu novotvorby cév a sníženým celkovým přežitím [34, 35, 36].

##### **4.3.2.3 COX2 a nádorová novotvorba cév**

Tvorba cévního řečiště dovoluje růst tumoru od *carcinoma in situ* až po invazivní tumor [100]. Proangiogenní růstové faktory, receptory a nitrobuněčné dráhy se proto nabízejí jako potenciální klinické terapeutické cíle, které po vhodném zásahu mohou ovlivnit nádorový růst.

Inhibitory COX2 jako celecoxib *in vitro* a *in vivo* na zvířecích modelech potlačují nádorový růst a novotvorbu cév. U pacientů s familiární adenomatózní polypózou bylo prokázáno, že při pravidelném užívání celecoxibu došlo k redukci velikosti i počtu polypů v tlustém střevě, čili prekanceróz závislých na angiogenezi [20, 21].

Mnoho faktorů stimuluje produkci COX2 [22, 23]. Zvýšená produkce COX2 naopak působí nadprodukcí a uvolňováním VEGF [34, 35, 38]. Ve fibroblastech myši s vyraženým genem pro produkci COX2 i po vhodné stimulaci produkce VEGF poklesla o 94% ve srovnání s normálními geneticky neupravenými buňkami [24]. Ukázalo se také, že při expozici normálních fibroblastů vysoké koncentraci COX2 inhibitoru, poklesla produkce VEGF o 92% [25]. Toto propojení COX2 a VEGF bylo studováno i u lidských tkáňových vzorků [26]. Inhibice COX2 a následný pokles VEGF v tumorech působí snížení počtu a délky novotvořených kapilár v tumorech [34, 39, 40, 41, 42, 43]. Na základě studií na

buněčných liniích a zvířecích modelech bylo navrženo několik hypotéz ohledně nitrobuněčných drah regulace cévní novotvorby a COX2. Blokace COX2 inhibitorem brání aktivaci MAP kinázy spouštěné VEGF receptorem, což následně ovlivňuje vaskulární permeabilitu a proliferaci endotheliálních buněk. [34, 44, 45, 46, 47, 49]. Dále COX2 ovlivňuje funkci integrinů, zajišťujících komunikaci mezi endotheliálními buňkami. Blokace COX2 inhibitorem snížila *in vitro* migraci endotheliálních buněk [107, 108]. Tato data byla shrnuta v publikaci Dormonda and Rüegg z r. 2001 [48].

#### **4.3.2.4 Selektivní inhibice COX2**

##### **4.3.2.4.1 Inhibitory cyklooxygenázy**

*In vitro* byly zkoumány různé koncentrace COX2 inhibitorů. Formace buněčných kolonií a jejich proliferace byla inverzní ke stoupající koncentraci inhibitoru COX2 v kultivačním médiu [71, 50].

##### **4.3.2.4.1.1 Farmakokinetické údaje**

Celecoxib – komerčně dostupný inhibitor COX2 pod názvem Celebrex, je po perorálním podání rychle absorbován a dosahuje maximálních plazmatických koncentrací během 2-3 hodin. Celecoxib ve velké míře podléhá metabolismu, méně než 1% podané látky se vylučuje v nezměněné formě močí. Vazba na bílkoviny činí při terapeutické plazmatické koncentraci zhruba 97%, eliminační poločas je 8-12 hodin. Je metabolizován v játrech hydroxylací, oxidací a tvorbou glukuronidů [72].

##### **4.3.2.5 Inhibitory cyklooxygenázy 2 a radioterapie**

Vzhledem k protinádorovým účinkům celecoxibu zjištěným v klinických studiích, byl zkoumán jejich případný potenciační účinek při radioterapii. Několik kolektivů autorů zjistilo zlepšení léčebné odpovědi kombinované léčby a prodloužení doby do relapsu [46, 47, 51, 52]. Tento potenciační efekt, jak je publikováno v literatuře, má koeficient až 1,7 až 3,6 násobku efektu radioterapie [32, 33, 46, 47, 52, 61, 63, 64, 65, 66, 67].

V preklinické oblasti nejvýznamnější prací je publikace z r. 2005 autorů Raju a kol. [71]. Tato práce prokázala zvýšenou radiosensitivitu závislou na koncentraci celecoxibu.

## **4.4 Studie fáze I**

Vytváření nových či využití stávajících postupů v nových indikacích je v onkologii nutností ke zlepšení léčebných výsledků. Prvním krokem je testování na úrovni studie fáze I [53, 54, 94]. Hlavním cílem je stanovení tolerance nové léčby, detekce nejzávažnějších nežádoucích účinků a stanovení maximální tolerovatelné dávky (MTD), která by měla být následně využívána k dalšímu podrobnějšímu zkoumání [55, 94]. Studie fáze I vždy vycházejí z teoretických předpokladů a preklinických výsledků.

### **4.4.1 Design studií fáze I**

#### **4.4.1.1 Definice toxicity limitující dávku zkoumaného léku/postupu (DLT)**

Definice DLT vychází z předpokladů či toxicit zjištěných z předchozích studií a u kombinací léčebných postupů prohloubení již známých toxicit. Vzhledem k tomu, že každý léčebný postup přináší nové a někdy i nečekané nežádoucí účinky, které nelze předem předpokládat, je nutné stanovit obecná kritéria DLT [55, 56, 57, 61].

Toxicita testované léčby musí být zaznamenávána podle platných kritérií stanovených odbornými společnostmi jako NCI (National Cancer Institute) nebo RTOG [60, 58].

#### **4.4.1.2 Volba startovací dávky pro studii fáze I**

Způsobů, jak stanovit nejnižší startovací dávku přípravku, kterou se bude studie zahajovat, je několik. U vůbec prvního podání léku u člověka je nutno vycházet ze studií na zvířatech, které splňují podmínky Good Laboratory Practice [101].

Pokud je testován nový postup s přípravkem, který je již využíván v jiných indikacích, obecně se doporučuje konzultovat ohledně vstupní dávky výrobce přípravku. Stanovení

vstupní dávky vychází z bezpečnostních studií, které byly provedeny před registrací přípravku.

#### **4.4.1.3 Eskalační schémata**

Základním paradigmatem klinických studií fáze I je premisa, že vyšší dávka se rovná lepší účinnosti. Toto není v onkologii ani v jiném oboru obecně platné, ale je třeba si uvědomit, že studie fáze I zkoumají v první řadě toxicitu, která stoupá s dávkou podaného léku.

V dnešní době se nejčastěji využívá tzv. „3+3“ design studie. Každá kohorta pacientů pro příslušnou hladinu dávky testovaného agens zahrnuje 3 pacienty. Pokud se u jednoho z pacientů vyskytne DLT, do kohorty při stejné dávce se přibírá další 3 pacienty. Pokud žádný pacient či pouze 1 z šesti je postižen toxicitou definovanou jako DLT, je možné eskalovat dávku a otevřít další kohorty pacientů. Pokud naopak 2 ze 3 pacientů v kohortě, či 2 z 6 pacientů v rozšířené kohortě prodělají toxicitu terapie definovanou jako DLT, je tato dávka považovaná za konečnou ve studii, tzv. dávka MAD (maximum administered dose). Dávka nižší o jeden stupeň, tj. dávka podávána v předchozí kohortě je považována za MTD a je také dávkou doporučenou k dalšímu testování ve studii fáze II (phase II recommended dose). Z důvodu bezpečnosti, je nutno v konečné kohortě s dávkou považovanou za MTD provést náběr dalších pacientů do celkového počtu 6-12.

#### **4.4.1.4 Velikost eskalačního kroku**

Výše rozdílu dávky mezi kohortami musí být taktéž stanovena předem. Nejčastěji se využívá eskalace dle modifikovaného Fibonacciho schématu. Tato číselná sekvence se tvoří přičítáním předchozích 2 čísel v numerické řadě. Pro účely eskalace dávky ve studiích fáze I byla tato číselná sekvence upravena a eskalace mezi kohortami se provádí násobky dle určeného schématu,  $n, 2n, 3.3n, 5n, 7n, 9.3n \dots$

Dalšími způsoby stanovení eskalačních kroků mohou být dány absolutním číslem, nejčastěji dvojnásobkem předchozího stupně, tzv. doubling, či např. velikostí/sílou komerčně vyráběných tablet (např. 250mg, 500mg).

#### **4.4.1.5 Volba studijní populace pacientů**

Studijní populace pacientů vychází z primárního záměru studie. Z etického hlediska lze u studie fáze I provádět testování u pacientů s pokročilým onemocněním a u pacientů, u kterých stávající možnosti terapie nepřinášejí dostatečný terapeutický efekt. Dále platí obecná pravidla vedení klinických studií jako zařazování pacientů v dobré fyzické kondici ECOG PS 0 či 1, s dobrou funkcí jater, ledvin či adekvátní hematopoetickou rezervou [53, 61, 95].

#### **4.4.2 Hodnocení studie fáze I**

Základním parametrem hodnocení studie I je stanovení maximální tolerovatelné dávky přípravku ve zkoumaném terapeutickém postupu na základě hodnocení akutní toxicity.

Další cíle je nutno hodnotit tak, jak byly stanoveny v designu studie. Toto zahrnuje plné referování akutní toxicity všech stupňů, případně, pokud studie běží dostatečně dlouho, i popis pozdní toxicity. Často je popisováno i zhodnocení terapeutického efektu ve smyslu počtů parciálních remisí, kompletních remisí, progresí, dále doby do progresu a popřípadě celkového přežití.

## 5 METODIKA PRÁCE

Tato práce si stavěla za cíl zjistit toleranci radioterapie při maximální eskalaci dávky Celebrexu – inhibitoru COX2, dále zjistit korelaci mezi tkáňovou exprexi COX2 v nádoru a sérovými hladinami VEGF jakožto “markerem” vaskulogenezy. Klinická odpověď ve smyslu dosažení remise onemocnění byla druhotným cílem této práce.

### 5.1 Náběr pacientů, vstupní a vylučovací kritéria

Náběr pacientů do studie dle vstupních a vylučovacích kritérií byl zahájen od ledna 2007 a ukončen v prosinci 2008. Pacienti byli o účasti ve studii informováni ústně i formou informačního letáku.

#### 5.1.1 Vstupní kritéria pro zařazení do studie

- 1) přítomnost histologicky verifikovaného spinocelulárního karcinomu HaN s výjimkou karcinomu nasopharyngu
- 2) lokálně pokročilý inoperabilní nález, nemetastatický
- 3) věk minimálně 18 let
- 4) ECOG performance status 0 nebo 1
- 5) schopnost polknout studijní medikaci (kapsle) bez rozkousávání
- 6) dostatečná hematopoetická kapacita (definována vstupními hodnotami periferní krve: hladina hemoglobin  $> 100$  g/l, absolutní počet neutrofilů  $> 1,5 \times 10^9/l$ , počet krevních destiček  $> 100 \times 10^9/l$ )
- 7) dobré renální parametry (definovány sérovými hodnotami kreatininu  $< 100$   $\mu\text{mol/l}$ )
- 8) dostatečné jaterní funkce (definovány sérovými hodnotami alanin transaminázy - ALT a aspartat transaminázy – AST do 2,5 násobku horní hranice normy)
- 9) udělený písemný informovaný souhlas

#### 5.1.2 Vylučovací kritéria

- 1) anamnéza maligního nádorového onemocnění s výjimkou nemelanomových kožních nádorů a *in situ* nádoru čípku děložního
- 2) aktivní vředová choroba gastroduodena
- 3) závažné onemocnění jater či ledvin
- 4) cerebrovaskulární onemocnění
- 5) chronické srdeční selhávání
- 6) těhotenství, kojení
- 7) známá alergie na celecoxib nebo sulfonamidy

### 5.2 Parametry radioterapie

Pacienti byli léčeni plnohodnotnou kurativní radioterapií v režimu 6- týdenního konkomitantního boostu.

#### 5.2.1 Parametry dávek a frakcionace ozařování

- celková dávka záření 72 Gy
- celková dávka na PTV1 54 Gy, 30 frakcí a 1,8 Gy
- dosycovací dávka na PTV2 18 Gy, 12 frakcí a 1,5 Gy

#### 5.2.2 Definice cílových objemů

Cílové objemy zahrnovaly primární tumor definovaný klinickým vyšetřením, zobrazovacími technikami a fibroskopií, potřebné lemy tkání s předpokládaným mikroskopickým šířením, lemy nastavení a nepřesností (set-up margin) a lymfatickou drenáž dle doporučených postupů RTOG [60].

- GTV – objem nádoru - byl definován dle makroskopického nádorového postižení detekovaného kontrastním CT a endoskopií provedenou lékařem ORL.

- CTV – klinický cílový objem - CTV zahrnoval předpokládanou oblast mikroskopického šíření. Byl definován jako GTV s lemem 5mm a klinicky nepostižené uzlinové oblasti dle doporučení RTOG.
- PTV1 – plánovací cílový objem - kompenzuje variabilitu v nastavení mezi jednotlivými dny (tzv. set-up margin). Byl definován jako CTV s lemem 10mm.
- PTV2 – plánovací objem pro boost (dosycení). Obsahoval GTV s 5mm lemem.
- ICRU (International Commission on Radiation Units) bod byl umístěn do středu PTV.

### 5.2.3 Technika

Hlava a krk pacienta byly znehybněny individuálně připravovanou termoplastickou maskou. Plánovací CT simulace byla prováděna na oblast hlavy a krku od baze lebni až k infraklavikulárním prostorám. CT bylo prováděno bez kontrastní látky, CT řezy byly 3 mm tlusté.

Plánování ozařovacích objemů bylo prováděno na plánovacích systémech vhodných pro trojrozměrnou konformní radioterapii a IMRT (Precise Plan, Electra).

Distribuce dávky v PTV a v okolních tkáních byla získávána trojrozměrně a byla vyjádřena formou dávkově objemových histogramů (DVH). Homogenita dávky v PTV respektovala doporučení ICRU, minimum předepsané dávky bylo 95%, maximum překročení předepsané dávky 107%.

Ozařovací pole byla nastavena a upravena použitím techniky “beam’s eye view”. Byla využívána technika „step-and-shoot“. Digitální portálové zobrazení bylo získáváno 1x týdně a srovnáváno s rekonstruovanými snímky s plánovacího CT. Rozdílnosti v nastavení nad 5mm byly korigovány.

Technika IMRT byla využívána u iradiace tumorů v blízkosti míchy jakožto kritického orgánu v případech, kdy hrozilo riziko překročení maximálních tolerančních dávek.

#### 5.2.3.1 Kritické orgány

V této lokalitě byla za kritický orgán považována mícha, maximální dávky na míchu nepřekročily 45 Gy.

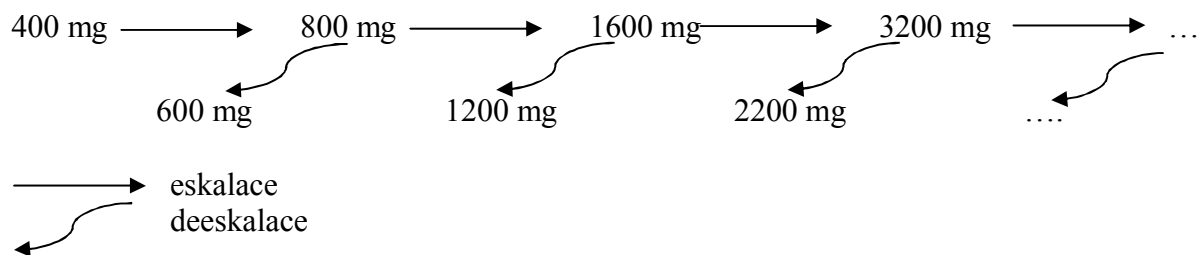
### 5.3 Celebrex

Pacientům byl v tomto studijním protokolu podáván inhibitor cyclooxygenázy-2 celecoxib po celou dobu ozařování včetně sobot, nedělí či dnů pracovního klidu, počínaje 1. dnem ozařování, konče posledním dnem ozařování.

Byla prováděna eskalace dávky dle předem stanoveného schématu – zdvojování dávky až do dosažení DLT a následná deeskalace dávky o 1/3 (se zohledněním velikosti, resp. síly tablet Celebrexu - 200mg).

Startovací dávka vycházela ze zkušeností ze studií prováděných v minulosti [42, 43, 44, 45, 46, 47, 48, 49] a byla stanovena na 400mg /den (ve 2 podáních à 200mg).

*Nákres plánované eskalace / deeskalace dávky*



Kohorty pacientů byly tříčlenné, další náběh pacientů do kohort byl prováděn při dosažení toxicity kombinované terapie předem stanovené jako toxicita limitující dávku.

Nebyla povolena redukce dávky studijního léku u jednotlivého pacienta (tzv. “intra-patient”). V případě nežádoucích účinků či jiných komplikací bylo indikováno ukončení podání Celebrexu.

## **5.4 Hodnocení toxicity, hodnocení léčebné odpovědi**

### **5.4.1 Metodika hodnocení časně a pozdní toxicity**

Časná toxicita terapie byla hodnocena dle RTOG kritérií, které v té době byly standardem na Klinice onkologické FN Ostrava, kde studie probíhala [60] – v plné verzi dizertační práce uvádím v příloze podrobnou tabulku toxicit. Toxicita terapie byla hodnocena po ukončení radioterapie a při kontrole 6 týdnů po ukončení radioterapie. Pozdní toxicita byla hodnocena dle CTC AE (Common Toxicity Criteria for Adverse Events) verze 3, která v té době byla v době provádění klinické studie nejaktuálnější [58]. Tato byla hodnocena pro účely této studie při návštěvách ve 3. a 6. měsíci po ukončení ozařování a samozřejmě i při následných kontrolách v rámci nestudijních kontrol pacientů.

### **5.4.2 Definice DLT (toxicita limitující dávku)**

V rámci přípravy základního designu tohoto klinického hodnocení byla stanovena kritéria nepřijatelné toxicity léčby. Tyto zahrnovala:

- jakoukoliv hematologickou či nehematologickou toxicitu III. nebo vyššího stupně
- mukozitidu III. st. v ozařované oblasti
- dermatitidu III. st. v ozařované oblasti
- polykací obtíže znemožňující perorální příjem studijní medikace
- akutní toxicitu terapie, která způsobí ukončení léčby nebo přerušeni na více než 5 dnů

### **5.4.3 Definice cílové dávky (phase II recommended dose)**

Bylo stanoveno, že dávka o 1 stupeň nižší než dávka působící DLT bude považována za cílovou dávku, doporučenou k testování na úrovni klinického hodnocení fáze II.

### **5.4.4 Metodika hodnocení léčebné odpovědi**

Hodnocení léčebné odpovědi bylo druhotným cílem studie. Léčebná odpověď byla hodnocena v 6 týdnech po ukončení radioterapie, dále ve 3 měsících, v 6 měsících, ve 12 měsících, v 18 měsících a ve 24 měsících po ukončení léčby.

Hodnocení bylo vyjádřeno ve smyslu hodnocení dosažení remise na kompletní remise, parciální remise, relaps/progrese. Toto hodnocení bylo prováděno dle kritérií RECIST, verze 1.0, která v době iniciace této studie byla aktuální [106].

## **5.5 Histochemické zpracování vzorků tkání**

Byla provedena analýza původních vzorků tkání získaných biopsií pro účely diagnostiky. Analýza vzorků zahrnovala ověření diagnózy a dále hodnocení tkáňové exprese COX2 pro účely určení korelace vstupních hodnot exprese COX2 v nádorových buňkách s hladinami VEGF v séru při léčbě.

Po fixaci tkáně formalinem byly z parafinových bločků získány řezy 3-4 $\mu$ m tlusté. Byly vždy připraveny čerstvé řezy, které byly barveny hematoxylinem a eosinem. Na těchto řezech byla mikroskopicky ověřena původní histopatologická diagnóza. Dále byly připraveny další čerstvé řezy, které byly dle doporučení výrobce manuálně zpracovávány monoklonální myší protilátkou proti lidské COX2 [69]. Toto bylo prováděno zkušeným personálem Patologického ústavu FN Ostrava. Buněčný barvicí vzor pro anti-COX2 byl cytoplasmatický. Jako chromagen byl využit diaminobenzidine.

Expresí COX2 byla vyjádřena v procentech pozitivně zbarvených buněk k celkovému počtu buněk. Odečet byl prováděn zkušeným patologem ve FN Ostrava.

## 5.6 Zpracování sérových vzorků k detekci VEGF

Pro účely hodnocení případného korelátu léčebné odpovědi vyjádřené poklesem vaskulogeneze byly prováděny odběry krve v průběhu radioterapie a v poléčebném sledování.

Odběr a zpracování sérových vzorků VEGF bylo prováděno v první den ozařování (značeno jako I), v polovině ozařovacího cyklu – 15. den (značeno jako II), v poslední den ozařování (značeno jako III) a při první kontrole v poléčebném sledování 6 týdnů po ukončení radioterapie (značeno jako IV).

Vzorek krve po odebrání byl ihned centrifugován při 3000 otáčkách/s po dobu 5 minut a pipetou bylo odebráno sérum. Toto bylo rozděleno do 2 zkumavek ke zmrazení. Jedna zkumavka byla určena k laboratornímu zpracování, druhá jako záloha. Vzorky byly konzervovány při teplotě  $-30^{\circ}$  Celsia až do transportu, který byl prováděn v suchém ledu.

Hladina sérové VEGF byla hodnocena metodou ELISA (Enzyme-linked Immunosorbent Assay) za použití komerčně dostupné monoklonální protilátky proti VEGF. Zpracování bylo prováděno dle doporučení výrobce zkušenou imunologickou laboratoří.

Hladina sérové VEGF byla vyjádřena v absolutních číslech v ng/ml (nanogram / mililitr).

## 5.7 Statistické zpracování

Ke zpracování primárních normálních parametrických dat byly použity robustní statistické metody – průměr, rozptyl, frekvenční tabulky. Do zpracování byla zahrnuta všechna získaná data.

K dalšímu zpracování dat byly využity speciální statistické metody dle doporučení statistika: McNemarův test srovnání dichotomních kategorických dat, Shapiro-Wilk test k analýze kontinuálních dat o neparametrickém rozložení, Mann-Whitney U test ke srovnání dat mezi skupinami a Wilcoxon test ke srovnání párových dat. Ke zjištění korelace (míry vztahu) mezi expresí COX2 a hladinami VEGF byl využit Spearmanův korelační koeficient [68].

Všechny testy byly provedeny na hladině významnosti  $\alpha = 0,05$ .



## 6 PRAKTICKÁ ČÁST, VÝSLEDKY PRÁCE

### 6.1 Pacientský soubor

V období od ledna 2007 do června 2008 byl proveden náběr pacientů s lokálně pokročilým, negeneralizovaným spinocelulárním karcinomem oblasti HaN. Generalizace byla vyloučena sonografií dutiny břišní a skiagramem nebo CT vyšetřením hrudníku. Parametry onemocnění a celkového stavu pacientů splňovala vstupní kritéria.

Do studie bylo zahrnuto 32 pacientů. 29 pacientů byli muži, 3 ženy, poměr mužů k ženám byl 9 : 1.

Průměrný věk pacientů byl 59 let, rozptyl 44-78 let. 15 pacientů bylo ve věkovém rozmezí 51-60 let, 11 pacientů bylo ve věku 61-70 let.

#### 6.1.1 Charakteristika pacientů

Vzhledem ke vstupním kritériím do studie byli zařazeni pacienti v dobrém celkovém fyzickém stavu ECOG PS 0 a 1 a s dobrými orgánovými funkcemi.

##### 6.1.1.1 Laboratorní nálezy

Průměrná vstupní hladina hemoglobinu celého souboru pacientů při vstupu do studie byla 140,8 g/l, minimální hodnota byla 110 g/l, maximální 163 g/l.

Průměrná sérová hladina kreatininu byla 87,1 µg/l, minimální hodnota byla 55 µg/l, maximální 117 µg/l.

Průměrná sérová hladina alanin transferázy (ALT) byla 0,44 µkat/l, minimální hodnota byla 0,08 µkat/l, maximální 1,81 µkat/l.

##### 6.1.1.2 Váha

Průměrná váha pacientů ve studijním souboru byla 72kg, minimální hodnota 50kg, maximální 168kg. Většina pacientů se pohybovala v rozmezí 51-80kg, váha třetiny pacientů se pohybovala v intervalu 61-70kg.

##### 6.1.1.3 Komorbidity

Nejčastějšími komorbiditami pacientů byly hypertenze (15 pacientů), chronická bronchitis (9 pacientů), chronická obstrukční plicní nemoc (4 pacienti), hepatopatie (3 pacienti) a stylismus.

#### 6.1.2 Anatomická distribuce nádorů

V souboru 32 pacientů se u 28,1% se jednalo o karcinomy baze úst, u 31,3% o karcinomy orofaryngu (z toho ve 40% o karcinom tonzily), u 9,4% o karcinomy hypofaryngu a u 31,3% o karcinomy laryngu.

#### 6.1.3 Stádium onemocnění

Ve skupině 32 pacientů mělo 22 v době zahájení terapie onemocnění ve stádiu IV, 10 pacientů onemocnění ve stádiu III. V případech tumorů ve stádiu III se jednalo o onemocnění buď inoperabilní vzhledem k perioperačním rizikům nebo o pacienty neoperované z důvodu osobního rozhodnutí pacienta.

Tabulka č. 2: Distribuce patientského souboru dle stádia onemocnění v jednotlivých anatomických lokalizacích

Lokalita nádoru ↓ / Stádium onemocnění →	III	IV
Karcinomy dutiny ústní	0	10
Karcinomy hltanu	1	9
Karcinomy hrtanu	9	3
Souhrnně všichni pacienti	10	22

#### 6.1.4 TNM

Na pokročilosti onemocnění a zařazení onemocnění do pokročilého stádia III či IV u jednotlivých pacientů, tak jak byla definována dle TNM klasifikace verze 6, se u 31 pacientů

podílela velikost tumoru a u 22 pacientů postižení uzlin. U 11 nebyly nalezeny postižené lymfatické uzliny ani při klinickém ORL vyšetření ani při vstupním kontrastním CT vyšetření. Rozsáhlé postižení uzlin, N2 nebo N3, bylo zjištěno u 14 pacientů.

Počty výskytu jednotlivých stádií tumoru (T) / lymfatických uzlin (N).

T1	T2	T3	T4	N0	N1	N2	N3
0	1	15	16	11	7	13	1

### 6.1.5 Histologie

Všechny histologické nálezy získané z původních diagnostických biopsií na různých pracovištích v regionu byly ověřeny 2. čtením. Shoda mezi 1. a 2. čtením histologie byla 100%. U všech pacientů se jednalo o dlaždicobuněčné karcinomy.

Diferenciace (vyzrávání tkáně) byla vyjádřena stupněm (označeným jako G1, G2, G3), její rozložení bylo:

G1	G2	G3
11	16	5

## 6.2 Radioterapie

U všech pacientů byl dodržen předepsaný ozařovací režim a celý cyklus radioterapie a bylo dosaženo dávky 72 Gy. U všech pacientů byly dodrženy předepsané objemy, tak jak byly definovány výše (metodika práce, kapitola 5.2).

V prezentovaném souboru byla celková doba radioterapie průměrně 43,9 dnů, nejkratší doba ozařování byla 40 dnů, u 6 pacientů radioterapie trvala více než 45 dnů, z toho u 4 pacientů více než 50 dnů.

Tabulka č. 3: Frekvenční tabulka vyjadřující počet dnů radioterapie a počet pacientů ozařovaných daný počet dnů (včetně dnů víkendů)

Počet ozařovacích dnů	40	41	42	43	44	45	46	47	48	49	50	51	52
Počet pacientů	4	1	6	7	5	3	0	1	1	0	3	0	1

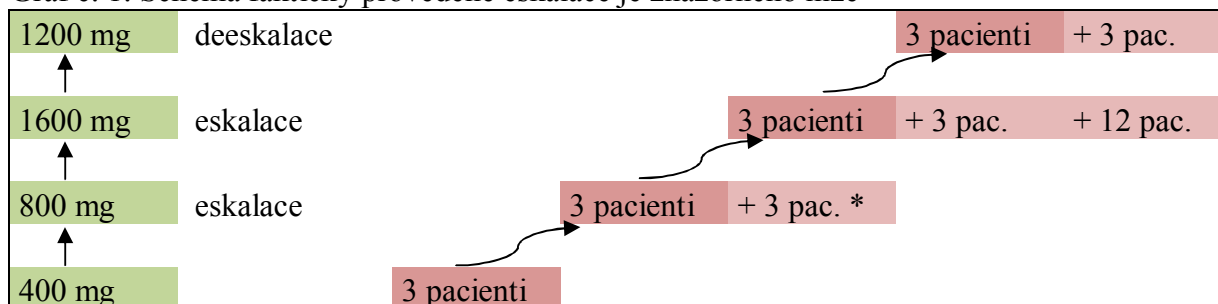
K prodloužení délky radioterapie docházelo z důvodu výskytu dnů pracovního klidu mimo soboty a neděle (státní svátky, vánoce ...) a v několika případech z důvodu technických odstávek ozařoven (závady, servis...). Tato neplánovaná prodloužení terapie nebyla korigována.

## 6.3 Celebrex

Všichni pacienti zařazení do klinického hodnocení užívali Celebrex tak jak bylo stanoveno v protokolu. Dávka byla rozdělena do dvou podání – ranní a večerní medikace dle řádu lůžkové části Kliniky onkologické FN Ostrava.

Pacienti byli rozděleni do kohort dle dávek Celebrexu – viz schéma.

Graf č. 1: Schéma fakticky provedené eskalace je znázorněno níže



\* 1 pacient vyřazen – nespolupráce

První kohorta 3 pacientů obdržela dávku 400mg Celebrexu na den, což je dávka hodnocena jako bezpečná, doporučována výrobcem a běžně dlouhodobě užívána v léčbě chronických revmatoidních onemocnění. V této skupině žádný z pacientů neměl v den ukončení iradiace toxicitu III. stupně dle RTOG.

Po dokončení hodnocení všech pacientů 1. kohorty, byla otevřena 2. kohorta pacientů. V druhé kohortě jsme eskalovali dávku na dvojnásobek, na 800mg/den. U jednoho pacienta došlo v posledním týdnu kombinované terapie k rozvoji mukozitidy III. stupně. Kohorta byla proto rozšířena a byl proveden náběh dalších 3 pacientů. Jeden pacient nedokončil užívání Celebrexu, nikoliv z důvodu toxicity ale z důvodu nespolupráce. Nebylo dosaženo 30% toxicity v rámci kohorty (jak bylo definováno v designu studie), proto jsme dávku eskalovali dále.

Ve třetí kohortě jsme navýšili dávku Celebrexu opět dvojnásobně, tj. na 1600mg/den. Tuto dávku jsme již dále neeskalovali, ale naopak rozšířili patientský soubor, vzhledem k tomu, že předpokladem bylo, že se bude jednat o soubor konečný. Celkem do této kohorty pacientů bylo zařazeno 18 pacientů. V této kohortě pacientů došlo k rozvoji 3 případů dermatitidy III. st., jeden z těchto tří pacientů měl i mukozitidu III. st.. U jednoho pacienta došlo ve 3 týdnu radioterapie k rozvoji generalizovaného exantému, jehož etiologie nebyla zjištěna, a proto byl Celebrex profylakticky vysazen a tato reakce byla hodnocena jako toxicita spojená s užíváním Celebrexu. Jak již bylo zmíněno výše, tuto dávku jsme již dále neeskalovali, jednak proto, že se jednalo až o 4- násobek běžné doporučené dávky (riziko nepředvídatelných lékových interakcí), a také proto, že již se jednalo o 8 kapslí denně rozdělených do 2 dávek, což při zachování původní chronické medikace pacientů již bylo náročné na spolupráci (velké množství léků).

Vzhledem k výskytu 4 případů akutní toxicity ve 3. kohortě pacientů bylo naopak přistoupeno k deeskalaci dávky. V této kohortě pacienti užívali dávku Celebrexu 1200mg/den. Zde bylo zařazeno celkem 6 pacientů. V této kohortě pacientů nedošlo k rozvoji akutní reakce III. či IV. stupně, proto byl náběh pacientů do studie na této úrovni ukončen.

U žádného pacienta z žádné kohorty nedošlo k rozvoji akutní reakce IV. stupně.

Tabulka č. 4: Distribuce výskytu akutní toxicity léčby III. st. v rámci kohort

Akutní toxicita III. stupně	dermatitida	mukozitida	jiná	souhrn toxicit III. stupně
400 mg / den	0	0	0	0
800 mg / den	0	1	0	1
1600 mg / den	3*	1*	1	4
1200 mg / den	0	0	0	0

\*2 DLT u jednoho pacienta

## 6.4 „Phase II dose“

Vzhledem k výše prezentovaným výsledkům toxicity a eskalaci dávky, lze zhodnotit, že bezpečnou dávkou pro další klinické hodnocení (studie fáze II) za podobných vstupních kritérií je dávka 1200mg / den rozdělena do 2 podání (ráno, večer).

## 6.5 Celkové zhodnocení toxicity radioterapie

### 6.5.1 Časná toxicita

Během radioterapie se vyskytla i méně závažná toxicita nižších stupňů, která nespňovala kritéria DLT (dose limiting toxicity), tak jak byla stanovena v designu studie. Celý rozsah časných toxicit, nezávisle na stupni dle RTOG, je znázorněn v následující tabulce.

Tabulka č. 5: Akutní toxicita léčby (všechny stupně) v kohortách pacientů

Akutní toxicita jakéhokoliv stupně \ Dávka Celebrexu	400mg / den	800mg / den	1600mg / den	1200mg / den	Výskyt toxicity nezávisle na dávce Celebrexu
Mukozitida	3	5	18	6	32
Dermatitida	3	5	18	6	32
Dysfagie se snížením perorálního příjmu	1	2	9	2	14
Pocit suchosti v ústech	1		1		2
Anémie	1	1	6	1	9
Leukopenie			1		1
Lymfopenie			1		1
Hepatopatie		3	1	1	5
Zhoršení renálních funkcí		1	1		2
Slabost, únava	2		3		5
Váhový úbytek		1	7	1	9
Kandidová stomatitida	1	2	8	4	15
Nevolnost	1	1	1		2
Bolest s nutností užití opioidů	1	1	4	1	7
Hemoptoe			1		1
Pyróza			1		1
Otok hrtanu				1	1

### 6.5.2 Pozdní toxicita

I když hodnocení pozdní toxicity není přísně vzato parametrem k posouzení tolerance léčby při eskalaci dávky v rámci studie fáze I, samozřejmě byla i tato toxicita zaznamenávána, tak jak je to prováděno u všech pacientů léčených na Klinice onkologické FN Ostrava. Bylo hodnoceno postižení: kůže – atrofie, hyperpigmentace, podkoží – indurace, fibróza, sliznice v ozařovaném poli – petechie, atrofie, hrtanu – otok, a pocit suchosti v ústech a související poruchy příjmu potravy.

Hodnocení bylo prováděno při kontrole 6 měsíců po ukončení terapie. Nejčastějším nežádoucím pozdním následkem léčby byla fibróza podkoží, dále xerostomie a asymptomatický otok hrtanu či otok hrtanu bez respirační insuficience. Postižení I. stupně se vyskytlo častěji než postižení II. stupně. U žádného pacienta nebyla zaznamenána pozdní toxicita III. či vyššího stupně ani systémová toxicita mimo oblast radiace.

Vzhledem k tomu, že pozdní toxicita byla hodnocena s odstupem několika měsíců po ukončení léčby, část pacientů nebylo možno hodnotit. Důvodem bylo buď úmrtí pacienta, či relapsu nebo progresu onemocnění v ozařovaném poli, tj. i v poli výskytu nežádoucích účinků.

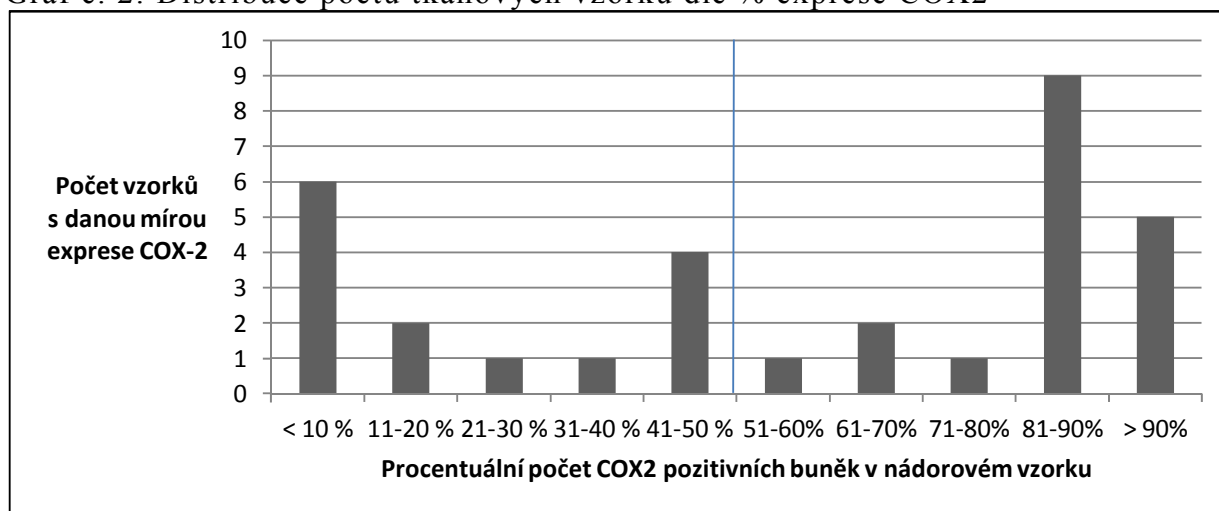
Tabulka č. 6: Výskyt pozdní toxicity léčby v jednotlivých kohortách pacientů

Oblasti hodnocení toxicity	kůže		podkoží		sliznice		slinné žlázy		hrtan		nehodnoceno
	I	II	I	II	I	II	I	II	I	II	
Kohorta I	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	2
Kohorta II	2	0	3	2	2	0	3	1	3	0	0
Kohorta III	3	1	11	2	2	1	3	6	6	2	5
Kohorta IV	2	0	5	0	2	0	2	1	0	2	1
Souhrnně	7	2	19	4	6	1	8	8	9	4	8

## 6.6 Expres cyklooxygenázy

V biotických histologických vzorcích z odebrané nádorové tkáně všech zařazených 32 pacientů jsme testovali expresi enzymu COX2. Expres COX2 byla vyjádřena procentem COX2 pozitivních buněk v poměru ke všem buňkám. Procentuální rozložení exprese tkáňové COX2 v souboru testovaných vzorků znázorňuje histogram níže.

Graf č. 2: Distribuce počtů tkáňových vzorků dle % exprese COX2



18 vzorků vykazovalo expresi COX2 vyšší 50%, ve 14 vzorcích byla exprese rovna 50% nebo méně než 50%. Expres menší než 50% pozitivních buněk byla označena jako nízká (low), naopak exprese nad 50% jako vysoká (high). Vzhledem k použité semikvantitativní metodice k získání těchto dat další rozdělování tohoto malého souboru jsme již nedělali a hodnocení exprese COX2 bylo prováděno na souboru jako celku.

## 6.7 Sérové hladiny VEGF

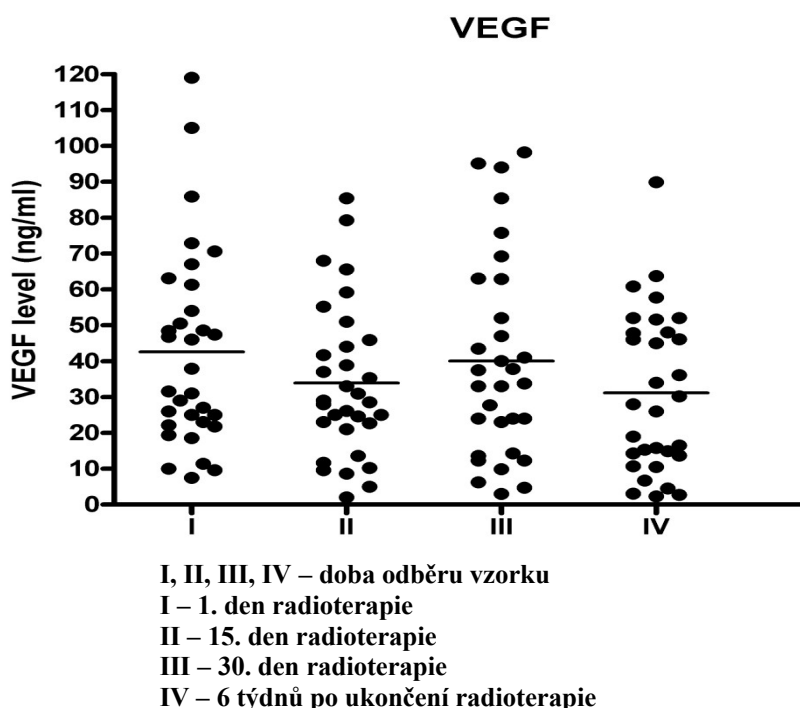
Další testovanou proměnnou byla hladina VEGF v séru pacientů. Písemný souhlas s testováním jsme obdrželi od všech zúčastněných pacientů.

Vzorek séra byl odebírán v průběhu radioterapie:

- na začátku radioterapie – v 1. den radioterapie, označováno jako I,
- v polovině radioterapie – 15. ozařovací den, označovaný jako II,
- v poslední den radioterapie – 30. ozařovací den, označovaný jako III,

- poslední odběr byl prováděn 6 týdnů po ukončení radioterapie s Celebrexem (follow-up), označován jako IV.

Graf č. 3: Sérové hladiny VEGF v průběhu léčby (I, II, III) a ve follow-up (IV)



Byla provedena analýza vývoje hladiny VEGF v séru v průběhu léčby. Statistická analýza byla provedena párovým t-testem. Párování hodnot bylo vysoce signifikantní.

Nebyl prokázán signifikantní rozdíl mezi hladinami sérové VEGF mezi 1. a 15. ozařovacím dnem (I vs. II),  $p = 0,12$ .

Nebyl prokázán signifikantní rozdíl mezi hladinami sérové VEGF ani mezi 1. a 30. ozařovacím dnem (I vs. III),  $p = 0,52$ .

Signifikantní pokles hladiny VEGF v séru byl prokázán mezi 1. ozařovacím dnem (tumor neovlivněn léčbou) a 6 týdnů po ukončení ozáření (doba předpokládané remise po léčbě) – I vs. IV,  $p = 0,011$ .

## 6.8 Korelace mezi COX2 a VEGF

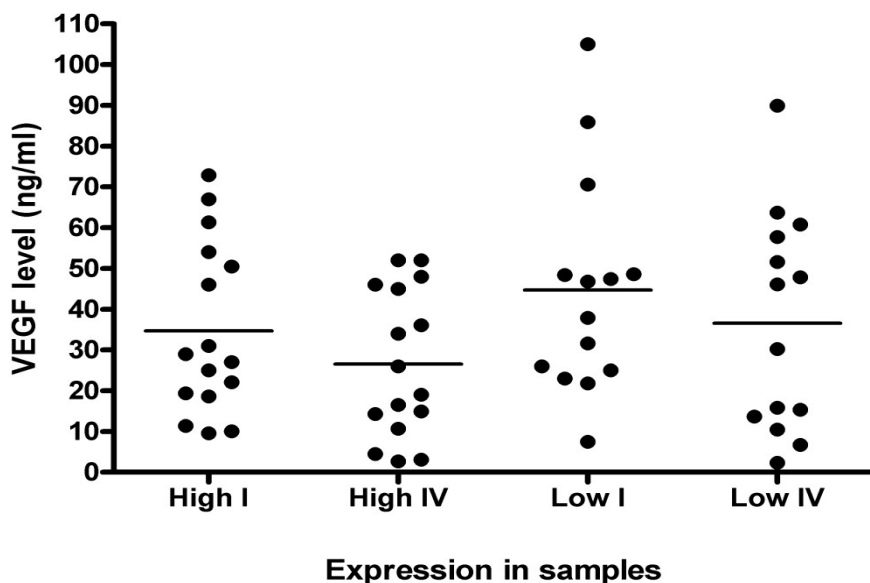
Dále byla provedena statistická korelace mezi expresí COX2 v nádoru a poklesem hladiny VEGF v průběhu léčby, resp. po léčbě (odběr IV).

V celé studijní populaci nebyla nalezena korelace mezi expresí COX2 v biotické tkáni v nádoru a dynamikou VEGF popsanou výše,  $p = 0,419$ .

U pacientů s nízkou expresí COX2 ( $\leq 50\%$ ) signifikantní pokles v hladinách VEGF taktéž nebyl prokázán.

Nicméně u pacientů, kde exprese COX2 v nádoru byla vstupně vysoká, byl zaznamenán signifikantní pokles VEGF mezi hladinami při zahájení léčby (I) a v poléčebném sledování (IV),  $p = 0,022$ .

Graf č. 4: Korelace mezi expresí COX2 a sérovou hladinou VEGF



High I – sérová hladina v 1. den RT u pacientů s expresí COX2 u > 50% buněk v nádoru  
 High IV - sérová hladina 6 týdnů po RT u pacientů s expresí COX2 u > 50% buněk v nádoru  
 Low I – sérová hladina v 1. den RT u pacientů s expresí COX2 ≤50% buněk v nádoru  
 Low IV - sérová hladina 6 týdnů po RT u pacientů s expresí COX2 ≤50% buněk v nádoru

## 6.9 Léčebná odpověď, follow-up

Hodnocení léčebné odpovědi bylo druhotným cílem studie. Léčebná odpověď byla hodnocena v 6 týdnech po ukončení radioterapie, dále ve 3 měsících, v 6 měsících, ve 12 měsících, v 18 měsících a ve 24 měsících po ukončení léčby. Vzhledem k tomu, že pozdní toxicita byla hodnocena s odstupem několika měsíců od ukončení léčby, část pacientů nebylo možno hodnotit vzhledem k jejich úmrtí. Pro přehlednost tato úmrtí jsou zahrnuta do tabulky níže, i když *sensu stricto* se nejedná o léčebnou odpověď jako takovou. V této tabulce tyto údaje slouží spíše k vysvětlení úbytku pacientů pro následný follow-up.

Tabulka č. 7: Léčebná odpověď v poléčebném sledování

	6 týdnů	3 měsíce	6 měsíců	9 měsíců	12 měsíců	18 měsíců	24 měsíců
Kompletní remise	22	23	21	21 <sup>+</sup>	18	16 <sup>+</sup>	15 <sup>+</sup>
Parciální remise	7	5	0	2*	1*	1*	1*
Relaps/progrese	3	3	7	3	5	2	2
Úmrtí spojené s tumorem	0	0	3	2	1	4	1
Úmrtí nesouvisející s tumorem	0	1	0	0	1	1	0
Počet pacientů pro další follow-up	32	31	28	26	24	19	18

\* léčebná odpověď po reiradiaci

<sup>+</sup> 1 pacient po salvage chirurgii

(Nota bene: celkem u 3 pacientů byla provedena salvage chirurgická léčba, u 2 pacientů se jednalo o laryngektomii s blokovanou direkci krčních uzlin, u 1 pacienta o rozšířenou tonsilektomii. 4 pacienti byli léčeni reiradiací pro recidivu onemocnění.)

Tabulka č. 8: Klinická odpověď ve 3 měsících sledování

Klinická odpověď	Kompletní remise	Parciální remise	Progrese / relaps
Kohorta 1 (400mg/den)	1	1	1
Kohorta 2 (800mg/den)	5	0	0
Kohorta 3 (1600mg/den)	12	4	2
Kohorta 4 (1200mg/den)	5	0	1
Celkem	23	5	4

Tabulka č. 9: Klinická odpověď v 6 měsících sledování

Klinická odpověď	Kompletní remise	Parciální remise	Progrese / relaps	Úmrtí související s tumorem
Kohorta 1 (400mg/den)	0	0	1	2
Kohorta 2 (800mg/den)	4	0	1	0
Kohorta 3 (1600mg/den)	13	0	3	1
Kohorta 4 (1200mg/den)	4	0	2	0
Celkem	21	0	7	3

(Nota bene: poslední sloupec vyjadřuje léčebnou odpověď jako takovou, nýbrž slouží k ilustraci úbytku pacientů.)

Rozdíl v relativních proporcích kompletních a parciálních remisí ve 3 a 6 měsících poléčebného sledování byl statisticky nesignifikantní,  $p = 0,073$ .

Tabulka č. 10: Vývoj léčebné odpovědi v čase

	6 týdnů	3 měsíce	6 měsíců	9 měsíců	12 měsíců	18 měsíců	24 měsíců
Kumulativní počet kompletních remisí	22	23	21	21	18	16	15
Parciální remise	7	5	0	2	1	1	1
Nově vzniklý relaps či progrese	3	1	6	1	3	1	1
Kumulativní počet úmrtí související s tumorem	0	0	3	5	6	10	11

(Nota bene: Úmrtí pacientů bylo buď v souvislosti s tumorem, nebo bylo na interní komorbidity.)

Dva pacienti zemřeli na kardiovaskulární příhodu. Dva pacienti zemřeli časně po léčbě, jeden na maligní kachektizaci při perzistentním onemocnění. U dvou pacientů bylo zjištěno generalizované onemocnění, aniž by byl lokoregionálně zjištěn tumor. U jednoho z těchto 2 pacientů se jednalo o generalizaci v plicích, která mohla souviset s primárním onemocněním, u 2. pacienta (žena) se jednalo o generalizaci do skeletu, která nebyla dále došetřována.

U jednoho pacienta bylo zjištěno histologicky verifikované duplicitní maligní postižení plic. Další úmrtí proběhla až s odstupem více než 18 měsíců po ukončení léčby a to v souvislosti s relapsem onemocnění.)



## 7 DISKUZE

Nádory HaN jsou sice malou skupinou nádorů, nicméně vzhledem k náročnosti léčby a špatné prognóze velmi významnou. Tyto nádory postihující převážně muže a vyskytují se v produktivním věku. V úvodu jsem nastínila demografická data celonárodní, dále situaci na Klinice onkologické ve FN v Ostravě, která je v Moravskoslezském kraji největším onkologickým centrem. Studijní soubor prezentovaný v této práci zahrnoval 32 pacientů, a, byť byl početně malý, tak svým demografickým rozložením odpovídal velkým souborům pacientů.

Ve snaze o zlepšení lokoregionální kontroly nádorů je celosvětově zkoumáno mnoho přístupů. Jedním z nich je ovlivnění nitrobuněčných drah inhibicí enzymu COX2. Raju a kolektiv [71] prezentovali v roce 2005 *in vitro* studii na tkáňových liniích HaN nádorů, na kterých prokázali inhibiční efekt na nádorový růst způsobený celekoxibem. Dále byl v této studii na tkáňových kulturách prokázán potenciační efekt celekoxibu na radioterapii a koncentrační závislost tohoto efektu.

Na základě těchto informací jsme připravili studii fáze I, která vycházela z těchto teoretických předpokladů a měla za prvotní cíl zjištění maximální tolerovatelné dávky Celebrexu (celekoxibu, inhibitoru COX2) *in vivo* u pacientů s pokročilým nádorem HaN ozařovaných s kurativním záměrem.

V dostupné literatuře zabývající se léčbou různých nádorů inhibitory COX2, za tzv. vysokou dávkou celekoxibu byla považována dávka 800mg / den rozdělena do dvou podání [73, 74, 75, 76, 77]. V žádné studii nebyla prováděna eskalace do vyšší dávky. Buď “up-front” byla stanovena tato dávka jako nejvyšší testovaná, nebo byla na této dávkové úrovni klinická hodnocení ukončena, i když nebyla dosažena DLT.

V této studii jsme předem žádnou stropovou dávku celekoxibu nestanovili. V průběhu eskalace se však ukázalo, že maximální dávkou, kterou jsou pacienti ochotni po dobu radioterapie užívat, je dávka 1600mg / den, a to z důvodu množství užívaných tablet na den ( t.č. jsou komerčně dostupné tablety à 200 mg). Při této dávce se také již objevila zvýšená toxicita radioterapeutické léčby, proto v dalším testování byla dávka snížena. V našem souboru pacientů jsme zjistili, že dávka 1200 mg / den ve dvou podáních je nejvyšší tolerovanou dávkou Celebrexu, při které není toxicita radioterapie vyšší či neúnosná.

Dalším cílem této malé klinické studie fáze I bylo zhodnocení exprese COX2 v nádorové tkáni. Vzhledem k tomu, že toto nebylo primárním cílem studie, nezatěžovali jsme pacienty novým odběrem biopsie a použili jsme k testování původní diagnostické vzorky. Souhlas k testování původních diagnostických biopsií udělilo všech 32 pacientů.

K hodnocení byla použita semikvantitativní imunohistochemická metodika, nedovolující podrobnou analýzu. Přesnější metodiky jako např. FISH - fluorescentní *in situ* hybridizace v tomto malém souboru využity nebyly, jednak pro finanční a technickou náročnost a jednak proto, že se jednalo o vstupní pilotní soubor pacientů. Nicméně použití komerčně dostupných testů dostatečně posloužilo ke “skrininkovým” účelům této studie ve smyslu identifikace vysoké a nízké exprese COX2 v nádorových buňkách. U poloviny souboru vzorků buňky exprimující COX2 tvořily dominantní populaci nádorových buněk (nad 50%). Tato data odpovídají zjištěním a prezentovaným výsledkům v odborné literatuře a to jak u nádorů HaN [29, 30], tak i ostatních solidních nádorů [73, 78, 79 ].

Řada studií zkoumajících expresi COX2 v nádorech prokázala nadměrnou expresi VEGF v nádorových buňkách [34, 66, 67, 80] a také závislost produkce VEGF na COX2 [81]. V této studii nás zajímalo, zda existuje měřitelný korelát vaskulogenezy u nádorů HaN, zda je jakkoliv závislý na expresi COX2 v nádorové tkáni a případně, zda se mění v závislosti na léčbě. Carbone a kolektiv [80] prezentovali předběžná data na téma pohybu hladin VEGF u léčby nemalobuněčných karcinomů plic, kde prokázali pokles sérové hladiny VEGF po kombinované

terapii (chemoterapie, radioterapie, celekoxib). Jednalo se nicméně o předběžné výsledky a nejsme si vědomi, že by kdy byly publikovány kompletní závěrečné výsledky této studie.

V našem souboru jsme hodnotili vývoj hladin sérové VEGF v průběhu léčby a při kontrole 6 týdnů po ukončení kombinované léčby (radioterapie, celekoxib). K odběru hladin VEGF udělili souhlas všichni pacienti. V průběhu radioterapie k signifikantnímu poklesu hladin VEGF nedošlo. Signifikantní pokles VEGF se projevil až s odstupem 6 týdnů ve srovnání se vstupními hladinami.

Zhu a kolektiv prezentovali práci ohledně léčby nemalobuněčných plicních karcinomů. Zjistili, že při kombinované terapii s celekoxibem k poklesu produkce VEGF došlo u nádorů s vysokými hladinami COX2, zatímco u nádorů neexprimujících COX2 k poklesu produkce VEGF nedošlo [81].

I v našem souboru jsme provedli tuto analýzu. Soubor pacientů jsme rozdělili na skupinu s vysokou expresí COX2 v nádorové tkáni (nad 50%) a s nízkou expresí (pod 50%). Hodnotili jsme u těchto 2 skupin pacientů vývoj hladin VEGF. Analýza prokázala, že pokles VEGF u pacientů v poléčebném sledování, prokázaný v celé studijní populaci, je omezen pouze na pacienty s nadpoloviční populací nádorových buněk exprimujících COX2 v nádorové tkáni. U pacientů s tumory s nízkou expresí COX2 k poklesu sérové VEGF nedošlo.

Toto klinické zjištění nedokazuje lepší účinnost kombinované terapie a nedovoluje činit žádné závěry. Signifikantní pokles VEGF u pacient s COX2 exprimujícími tumory naznačuje možnou klinickou interakci nitrobuněčných drah a nastiňuje případnou cestu k dalšímu zkoumání.

## 8 ZÁVĚR

Léčba nádorů HaN prochází v posledních desetiletích změnami jak v oblasti technologií při ozařování, operačních technik, tak i v oblasti onkologické systémové terapie a potenciace radioterapie. Množství vědeckých týmů celosvětově zkoumá na laboratorní i klinické úrovni metodiky, jak zlepšit výsledky onkologické léčby nádorů HaN, a tak i přežití pacientů.

Tato malá klinická studie si stavěla za cíl stanovení dávky celekoxibu vhodné pro další klinické testování – phase II dose. Tato byla stanovena na 1200 mg / den (rozdělena do 2 dávek). Dále výsledky doplňujících testování ukázaly, že u tumorů s nadpoloviční populací buněk exprimující COX2 dochází ke statisticky významnému poklesu VEGF v poléčebném sledování.

Tato klinická studie nebyla koncipována k vysvětlení mechanismů interakce radioterapie a COX2 či COX2 a VEGF.

V této práci dále popisně prezentuji klinické výsledky léčby.

Zjištěné parametry mohou být nápomocny k přípravě studie fáze II zahrnující větší počet pacientů a několik dalších proměnných jako rozdělení dle lokalizací nádorů, vstupních charakteristik pacientů či načasování podání celekoxibu v průběhu léčby.

## 9 LITERATURA

1. KUMAR, V. – LINGEN, M. W., Head and Neck. *Robbins and Cotran Pathologic Basis of Disease*, 8. vyd. Philadelphia: Saunders Elsevier, 2010. Kapitola 16, s. 740-753. ISBN 9781416031215
2. PARKIN, D.M., BRAY, F., FERLAY, J., PISANI, P., Global Cancer Statistics, 2002. *CA: A Cancer Journal for Clinicians*, March 2005, vol. 55, s. 74-108
3. JEMAL, A., SIEGEL, R., WARD, E., HAO, Y., XU, J., MURRAY, T., THUN, M.J., Cancer Statistics, 2008. *CA: A Cancer Journal for Clinicians*, March 2008, vol. 58, s. 71-96
4. HADDAH, R.I., SHIN, D.M., Recent advances in head and neck cancer. *New England Journal of Medicine*, September 2008, vol. 359, s. 1143-1154
5. CHATURVEDI A.K., ET AL., Incidence trends for human papillomavirus – related and – unrelated oral squamous cell carcinomas in the United States. *Journal of Clinical Oncology*, February 2008, vol. 26, no. 4, s. 612-619
6. BOYLE, J.O., ET AL., The incidence of p53 mutations increases with progression of head and neck cancer. *Cancer Research*, 1993, vol. 53, no. 19, s. 4477-4480
7. ROSIN, M.P., ET AL., Use of allelic loss to predict malignant risk for low-grade oral epithelial dysplasia. *Clinical Cancer Research*, February 2000, vol. 53, no. 2, s. 357-362
8. ÚSTAV ZDRAVOTNICKÝCH INFORMACÍ A STATISTIKY ČR, *Novotvary 2005, 2006, 2007/Cancer Incidence 2005, 2006, 2007 in the Czech Republic*, Praha: ÚZIS, 2005,2006,2007, ISBN: 978-80-7280-723-9, ISBN: 978-80-7280-796-3, ISBN: 978-80-7280-796-3, <http://www.uzis.cz>
9. SOBIN L.H., WITTEKIND Ch., *TNM klasifikace*, 6. vydání, Praha: Ústav zdravotnických informací a statistiky České republiky, 2002, česká verze 2004, ISBN 80-7280-391-3
10. ŠLAMPA, P., PETERA, J. – VOŠMIK, M., ŠLAMPA, P., KUBEŠ, J., PÁLA, M., DOLEŽEL, M., RŮŽIČKOVÁ, J., KORDAČ, P. Zhoubné nádory hlavy a krku. *Radiační onkologie*, 1. vyd., Praha: Galén Karolinum, 2007. Kapitola 3, s. 67-104
11. ARAKI, Y., OKAMURA, S., HUSSAIN, S.P., NAGASIMA, M., HE, P., SHISEKI, M., MIURA, K., HARRIS, C.C. Regulation of cyclooxygenase-2 expression by the Wnt and Ras pathways. *Cancer Research*, February 2003, vol. 63, no. 3, s. 728-734
12. CHAN, G., BOYLE, J.O., YAN, E.K. ET AL. Cyclooxygenase-2 Expression Is Up-Regulated in Squamous Cell Carcinoma of the Head and Neck. *Clinical Cancer Research*, March 1999, vol. 1, s. 991-994
13. VADLAMUDI, R., MANDAL, M., ADAM, L., ET AL. Regulation of cyclooxygenase-2 pathway by HER2 receptor. *Oncogene*. January 1999, vol. 18, no. 2, s. 305-314
14. THUN, M.J., HENLEY, S.J., PATRONO, C., Nonsteroidal anti-inflammatory drugs as anticancer agents: mechanistic, pharmacologic, and clinical issues. *Journal of the National Cancer Institute*, February 2002, vol. 94, no. 4, s. 252-266
15. HAWK, E.T., VINER, J.L., DANNENBERG, A., DUBOIS, R.N., COX2 in cancer – a player that's defining rules. *Journal of the National Cancer Institute*, April 2002, vol. 94, no. 8, s. 545-546
16. GRIDLEY, G., McLAUGHLIN, J.K., EKBOM, A., ET AL.. Incidence of cancer among patients with rheumatoid arthritis. *Journal of the National Cancer Institute*, February 1993, vol. 85, no. 4, s. 307-311
17. SUH, O., METTLIN, C., PETRELLI, N.J. Aspirin use, cancer, polyps of the large bowel. *Cancer*, August 1993, vol. 72, issue 4, s. 1171-1177
18. KOKI, A.T., LEATHY, K.M., MASFERRER, J.L. Potential utility of COX2 inhibitors in chemoprevention and chemotherapy. *Expert Opinion on Investigational Drugs*, October 1999, vol. 8, no. 10, s. 1623-1638
19. GASPARINI, G., LONGO, R., SARMIENTO, R., MORABITO, A. Inhibitors of cyclo-oxygenase 2: a new class of anticancer agents?, *Lancet Oncology*, October 2003; vol. 4, no. 10, s. 605-615
20. STEINBACH, G., LYNCH, P.M., PHILLIPS, R.K., ET AL., The effect of celecoxib, a cyclogenase-2 inhibitor, in familial adenomatous polyposis. *The New England Journal of Medicine*, June 2000, vol. 342, no. 26, s. 1946-1952
21. KONERDING, M.A., FAIT, E., GAUMANN, A., 3D microvascular architecture of pre-cancerous lesions and invasive carcinomas of the colon. *British Journal of Cancer*, May 2001, vol. 84, issue 10, s. 1354-1362
22. MARK, K.S., TRICKLER, W.J., MILLER, D.W., Tumor necrosis factor-alfa induces cyclooxygenase-2 expression and prostaglandin release in brain microvessel endothelial cells. *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*, June 2001, vol. 297, no. 3, s. 1051-1058
23. JONES, M.K., SZABO, I.L., KAWANAKA, H, ET AL., Von Hippel Lindau tumor suppressor and HIF-1 alpha: New targets of NSAIDs inhibition of hypoxia-induces angiogenesis. *Federation of American Societies for Experimental Biology Journal*, February 2002, vol. 16, s. 264-266
24. SENO, H., OSHIMA, M., ISHIKAWA, T.O., ET AL., Cyclooxygenase 2 and prostaglandin E(2) receptor EP(2)-dependent angiogenesis in Apc(Delta716) mouse intestinal polyps. *Cancer Research*, January 2002, vol. 62, s. 506-511
25. WILLIAMS, C.S., TSUJI, M., REESE, J., ET AL., Host cyclooxygenase-2 modulates carcinoma growth. *The Journal of Clinical Investigation*, June 2000, vol. 105, issue 11, s. 1589-1594
26. YUAN, A., PAN-CHYR, Y., KWEN-TAY, L., ET AL., Tumoral cyclooxygenase-2 (COX2) overexpression correlates with vascular endothelial growth factor (VEGF) expression and angiogenesis, and associated with short survival and early relapse in non-small cell lung cancer. *Sbornik: Proceedings of the American Association for Cancer Research 2003*, 44, s. 928 (Abstract)
27. WON, J.H. Cyclooxygenase-2: A Potential Target in Human Cancer. *Cancer Treatment and Research*, June 2004, vol. 36, issue 3, s. 161-162
28. HALLER, D.G. COX2 Inhibitors in Oncology. *Seminars in Oncology*, August 2003, (Suppl. 12), vol. 30, no. 4, s. 2-8
29. CHANG, B.W., KIM, D.H., KOWALSKI, D.P., ET AL. Prognostic Significance of Cyclooxygenase-2 in Oropharyngeal Squamous Cell Carcinoma. *Clinical Cancer Research*, March 2004, vol. 10, s. 1678-1684
30. NIX, P, LIND, M., GREENMAN, J., ET AL. Expression of COX2 protein in radioresistant laryngeal cancer. *Annals of Oncology*, May 2004, vol. 15, issue 5, s. 797-801

31. TERACADO, N., SHINTANI, S., YANO, J., ET AL. Overexpression of cyclooxygenase-2 is associated with radioresistance in oral squamous cell carcinoma. *Oral Oncology*, April 2004, vol. 40, no. 4, s. 383-389
32. SMINIA, P., KUIPERS, G., GELDOF, A., ET AL. COX2 inhibitors act as radiosensitiser in tumour treatment. *Biomedicine and Pharmacotherapy*, October 2005, (Suppl. 2), vol. 59, s. 272-275
33. KOKI, A.T., LEATHY, K.M., MASFERRER, J.L. Potential utility of COX2 inhibitors in chemoprevention and chemotherapy. *Expert Opinion on Investigational Drugs*. October 1999, vol. 8, no. 10, s. 1623-1638
34. GALLO, O., FRANCHI, A., MAGNELLI, L., ET AL. Cyclooxygenase-2 Pathway Correlates with VEGF Expression in Head and Neck Cancer. Implication for Tumor Angiogenesis and Metastasis. *Neoplasia*, 2001; vol. 3, no. 1, pp. 53-61
35. TSUJI, M., KAWANO, S., TSUJI, S., ET AL. Cyclooxygenase regulates angiogenesis induced by colon cancer cells. *Cell*, 1998; 93, pp. 705-716
36. MILAS, L. Cyclooxygenase-2 (COX2) enzyme inhibitors as potential enhancers of tumor radioresponse. *Seminars in Radiation Oncology*, October 2001, vol. 11, no.: 4, s. 290-299
37. LIN, D.T., SUBBARAMAIAH, K., SHAH, J.P., DANNENBERG, A.J., BOYLE, J.O. Cyclooxygenase-2: a novel molecular target for the prevention and treatment of head and neck cancer. *Head and Neck*, August 2002, vol. 24, issue 8, s. 792-799
38. GATELY, S. The contributions of cyclooxygenase-2 to tumor angiogenesis. *Cancer and Metastasis Reviews*, 2000, vol. 19, no. 1-2, s. 19-27
39. ZWEIFEL, B., OMBERG, R., WOERNER, M., ET AL., Inhibition of prostaglandins by celecoxib results in suppression of tumor growth and reduces VEGF levels in human head and neck xenograft model. *Proceedings of the American Association for Cancer Research*, 2001, vol. 43, s. 77
40. LEATHY, M.L., ORNBERG, R.L., WANG, Y., ET AL. Cyclooxygenase-2 Inhibition by Celecoxib Reduces Proliferation and Induces Apoptosis in Angiogenic Endothelial Cells *in vitro*. *Cancer Research*, February 2002, vol. 62, no. 1, s. 625-631
41. MASFERRER, J. Approach to Angiogenesis Inhibition Based on Cyclooxygenase-2. *Cancer Journal*, November-December 2001, vol. 7, suppl. 3, s. 144-150
42. SAWAOKA, H., TSUJI, S., TSUJII, M., ET AL., Cyclooxygenase inhibitors suppress angiogenesis and reduce tumor growth *in vivo*. *Laboratory Investigation*, 1999, vol. 79, no 12, s. 1469-77
43. LIU, X.H., KIRSCHENBAUM, A., YAO, S., ET AL., Inhibition of cyclooxygenase-2 suppresses angiogenesis and the growth of prostate cancer *in vivo*. *The Journal of Urology*, September 2000, vol. 164, issue 3, part 1, s. 820-825
44. MASFERRER, J.L., LEATHY, K.M., KOKI, A.T., ET AL. Antiangiogenic and Antitumor Activities of Cyclooxygenase-2 Inhibitors. *Cancer Research*, March 2000, vol. 60, s. 1306-1311
45. WEI, D., WANG, L., HE, Y., ET AL. Celecoxib inhibits vascular endothelial growth factor expression in and reduces angiogenesis and metastasis of human pancreatic cancer via suppression of Sp1 transcription factor activity. *Cancer Research*, March 2004, vol. 64, no. 6, s. 2030-2038
46. MILAS, L., KISHI, K., HUNTER, N., ET AL. Enhancement of Tumor Response to Gamma-Radiation by an Inhibitor of Cyclooxygenase-2 Enzyme. *Journal of the National Cancer Institute*, September 1999; vol. 91, no. 17, s. 1501-1504
47. KISHI, K., PETERSEN, S., PETERSEN, C., ET AL. Preferential Enhancement of Tumor Radioresponse by a Cyclooxygenase-2 Inhibitor. *Cancer Research*, March 2000, vol. 60, no. 5, s. 1326-1331
48. DORMOND, O., RÜEGG, C. Inhibition of tumor angiogenesis by non-steroidal anti-inflammatory drugs: emerging mechanisms and therapeutic perspectives. *Drug Resistance Updates: reviews and commentaries in antimicrobial and anticancer chemotherapy*, October 2001, vol. 4, no. 5, s. 314-321
49. DITTMANN, K.H., MAYER, K., OHNESEIT, P.A., ET AL. Celecoxib induces tumor cell radiosensitization by inhibiting radiation induced nuclear EGFR transport and DNA-repair: a COX2 independent mechanism. *International Journal of Radiation Oncology, Biology and Physics*, January 2008, vol. 70, issue 1, s. 203-212
50. WANG, Z., FUENTES, C.F., SHAPSHAY, S.M. Angiogenic and chemopreventive activities of celecoxib in oral carcinoma cell. *The Laryngoscope*, May 2002, vol. 122, no. 5, s. 839-843
51. PYO, H., CHOY, H., AMORINO, G.P., ET AL. A Selective Cyclooxygenase -2 Inhibitor, NS-398, Enhances the Effect of Radiation *in vitro* and *in vivo* Preferentially on the Cells That Express Cyclooxygenase-2. *Clinical Cancer Research*, October 2001, vol. 7, s. 2998- 3005
52. PETERSEN C, PETERSEN S, MILAS L, ET AL. Enhancement of intrinsic tumor cell radiosensitivity induced by a selective cyclooxygenase-2 inhibitor. *Clinical Cancer Research*, June 2000, vol. 6, s. 2531-20
53. Good Clinical Practice, *International Conference on Harmonisation of Technical Requirements for Registration of Pharmaceuticals for Human Use*, dostupné z: [www.ich.org](http://www.ich.org), poslední verze 2011 [cit. 2011-06-15]
54. Declaration of Helsinki, *World Medical Association*, dostupné z: [www.wma.net](http://www.wma.net), poslední verze 2011 [cit. 2011-06-15]
55. KUMMAR, S., GUTIERREZ, M., JAMES, H., ET AL., Drug development in oncology: classical cytotoxics and molecularly targeted agents, *British Journal of Clinical Pharmacology*, July 2006, vol. 62, no. 1, s. 15-26
56. DENT, S.F., EISENHAUER, E.A., Phase I trial design: Are new methodologies being put in practice?, *Annals of Oncology*, August 1996, vol. 7, no. 6, s. 561-566
57. KERR, D.J., Phase I clinical trials: Adapting methodology to face new challenges, *Annals of Oncology*, 1994, vol. 5, suppl. 4., s. 67-70
58. Common Toxicity Criteria, *National Cancer Institute*, dostupné z: [http://ctep.cancer.gov/protocolDevelopment/electronic\\_applications/ctc.htm](http://ctep.cancer.gov/protocolDevelopment/electronic_applications/ctc.htm), poslední verze 15.12.2010 [cit. 2011-06-15]
59. HARDROCK, Head and neck cancer: Assessment of risk factors, stage distribution, radiotherapy optimization, causes of relapse - keypoints, dostupné z: <http://hardrock.registry.cz>, [cit. 2011-06-15]
60. Radiation Therapy Oncology Group, *Cooperative Group Common Toxicity Criteria*, dostupné z: <http://www.rtog.org/ResearchAssociates/AdverseEventReporting/AcuteRadiationMorbidityScoringCriteria.aspx>, poslední verze 2011 [cit. 2011-06-15]
61. National Cancer Institute, Cancer Therapy Evaluation Program, *Protocol Templates and Guidelines* [online], poslední revize 18.5.2011 [cit. 2011-06-06]; Dostupné z: <http://ctep.cancer.gov/guidelines/templates.html>

62. FUTURA, Y., HUNTER, N., BARKLEY, Y. Jr, et al., Increase in radioresponse of murine tumors by treatment with indomethacin. *Cancer Research*, June 1988, vol. 48, no.11, s. 3008-3013
63. MILAS, L., FUTURA, Y., HUNTER, N., ET AL., Dependence of indomethacin-induced potentiation of murine tumor radioresponse on tumor host immunocompetence. *Cancer Research*, August 1990, vol. 50, no. 15, s. 4473-4477
64. PETERSEN, C., PETERSEN, S., MILAS, L., ET AL., Human glioma cell radiosensitisation by a selective COX2 inhibitor. *Clinical Cancer Research*, 2000, vol. 6, s. 2513-20
65. WEPPELMANN, B., MONKEMEIER, D. The influence of prostaglandin antagonists on radiation therapy of carcinoma of cervix. *Gynecologic Oncology*, Februar 1984, vol. 17, no. 2, s. 196-199
66. DAVIS, T.W., O'NEAL, J.M., PAGLE, M.D., ET AL. Synergy between Celecoxib and Radiotherapy Results from Inhibition of Cyclooxygenase-2-Derived Prostaglandin E2, a Survival Factor for Tumor and Associated Vasculature. *Cancer Research*, January 2004, vol. 64, no. 1, s. 279-285
67. GORSKI, D.H., BECKETT, M.A., JASKOWIAK, N.T., ET AL. Blockade of the Vascular Endothelial Growth Factor Stress Response Increases the Antitumor Effects of Ionizing Radiation. *Cancer Research*, July 1999, vol. 59, no. 14, s. 3374-3378
68. KASAL, P., SVACINA, Š. – HAAS, T. Statistika. In *Lékařská informatika*. Praha: Nakladatelství Univerzity Karlovy Karolinum, 1998. Kapitola 2, s. 136-215
69. Monoclonal Mouse Anti-Human COX2 (Cyclooxygenase-2). Brno: DAKO, 2007. <http://www.dako.com/dist/download.pdf?objectid=109213003>
70. TERAKADO, N., SHINTANI, S., YANO, J., ET AL. Overexpression of cyclooxygenase-2 is associated with radioresistance in oral squamous cell carcinoma. *Oral Oncology*, April 2004, vol. 40, no. 4, s. 383-389
71. RAJU, U., ARIGA, H., DITTMANN, K., ET AL. Inhibition of DNA Repair as a Mechanism of Enhanced Radioresponse of Head and Neck Carcinoma Cells by a Selective Cyclooxygenase-2 Inhibitor, Celecoxib. *International Journal of Radiation Oncology, Biology, Physics*, October 2005, vol. 63, no. 2, s. 520-528
72. AISLP, Informační systém humánních, homeopatických a veterinárních léčivých přípravků, [www.aispl.cz/cs/](http://www.aispl.cz/cs/), poslední verze 6.4.2011 [cit. 2011-06-15]
73. LAIO, Z., MILAS, L., KOMAKI, R., ET AL. Combination of COX2 Inhibitor With Radiotherapy or Radiochemotherapy in Treatment of Thoracic Cancer. *American Journal of Clinical Oncology*, August 2003, vol. 26, issue 4, suppl. 2, s. 85-91
74. GANSWINDT, U., BUDACH, V., JENDROSSEK, V., ET AL. Combination of celecoxib with percutaneous radiotherapy in patients with localised prostate cancer – a phase I study. *Radiation Oncology*, April 2006, s.1-9
75. JAVLE, M.M., CAO, S., DURRANI, F.A., ET AL. Celecoxib and Mucosal Protection: Translation from an Animal Model to a Phase I Clinical Trial of Celecoxib, Irinotecan and 5-Fluorouracil. *Clinical Cancer Research*, February 2007, vol. 13, no. 3, s. 965 – 971
76. DAWSON, S.J., MICHAEL, M., BIAGI, J., ET AL. A phase I/II trial of celecoxib with chemotherapy and radiotherapy in the treatment of patients with locally advanced oesophageal cancer [Abstract]. *Investigational New Drugs*, April 2007, vol. 25, no. 2
77. LIAO, Z., KOMAKI, R., MILAS, L., ET AL. A Phase I Clinical Trial of Thoracic Radiotherapy and Concurrent Celecoxib for Patients with Unfavorable Performance Status, Inoperable / Unresectable Non-Small Cell Lung Cancer. *Clinical Cancer Research*, May 2005, vol. 11, no. 9, s. 3342-3348
78. RICH, T.A., SHEPARD, R. COX2 Inhibitors as Radiation Sensitisers for Upper GI Tract Cancer: Esophagus, Stomach, and Pancreas. *American Journal of Clinical Oncology*, August 2003, vol. 26, no. 4, suppl. 2, s. 110-113
79. XI, H., BALDUS, S.E., WARNECKE-EBERZ, U., ET AL. High Cyclooxygenase-2 Expression Following Neoadjuvant Radiochemotherapy Is Associated with Minor Histopathologic Response and Poor Prognosis in Esophageal Cancer. *Clinical Cancer Research*, December 2005, vol. 11, no. 23, s. 8341-8347
80. CARBONE, D., CHOY, H., DANG, T., ET AL. Serum/plasma VEGF level changes with cyclooxygenase-2 (COX2) inhibition in combined modality therapy in stage III non-small cell lung cancer (NSCLC): preliminary results of a phase II trial [Abstract]. *Proceedings of the Annual Meeting of the American Society for Clinical Oncology 2002*, abstract no. 1270
81. ZHU, Y.M., AZAHRI, N.S.M., YU, D.C., ET AL. Effects of COX2 inhibition on expression of vascular endothelial growth factor and interleukin-8 in lung cancer cells. *BioMed Central Cancer*, 2008, vol. 8, no. 218, s. 1-10.
82. FELTL, David, CVEK, Jakub. *Klinická radiobiologie*. 1. vyd. Havlíčkův Brod: Tobiáš, 2008. 57-66 s. ISBN 978-80-7311-103-8
83. PARSONS, J.T., MENDENHALL, W.M., CASSISI, N.J., ET AL., Hyperfractionation for head and neck cancer. *International Journal of Radiation Oncology, Biology, Physics*, April 1988, vol. 14, no. 2, s. 649-658
84. BOURHIS, J., OVERGAARD, J., AUDRY, H., ET AL., Hyperfractionated or accelerated radiotherapy in head and neck cancer: a meta-analysis, *The Lancet*, September 2006, vol. 368, issue 9538, s. 843-859
85. MAO, L., ET AL.. Frequent microsatellite alterations at chromosomes 9p21 and 3p14 in oral premalignant lesions and their value in cancer risk assessment. *Nature Medicine*, June 1996, vol. 2, no. 6, s. 682-685
86. IZZO, J.G. ET AL.: Dysregulated cyclin D1 expression early in head and neck tumorigenesis: *in vivo* evidence for an association with subsequent gene amplification. *Oncogene*, November 1998, vol. 17, no. 18, s. 2313-2322
87. KOREN, R., KRISTT, D., ET AL.: The spectrum of laryngeal neoplasia: the pathologist's review. *Pathology, Research and Practice*, 2002, vol. 198, no. 11, s. 709-715
88. KARNOFSKY, D.A., BURCHENAL, J.H.. The Clinical Evaluation of Chemotherapeutic Agents In Cancer. s. 196. In: MacLEOD, C.M. (Ed.). Evaluation of Chemotherapeutic Agents. *Columbia Univ. Press*, 1949, s. 191-205
89. OKEN, M.M., CREECH, R.H., TORMEY, D.C., HORTON, J., DAVIS, T.E., MCFADDEN, E.T., CARBONE, P.P.: Toxicity And Response Criteria Of The Eastern Cooperative Oncology Group. *American Journal of Clinical Oncology*, December 1982, vol. 5, issue 6, s. 649-655
90. KLENER, P. – KLENER, P. Klasifikace nádorových onemocnění a staging. In *Klinická onkologie*. Praha: Galén, 2002. Kapitola 7.4, s. 106
91. MURRAY, K.R. – MAYES P.A. Metabolismus nenasycených mastných kyselin a eikosanoidů. In *Harperova biochemie*. H&H, 1998. Kapitola 25, s. 243-251

92. NIEDER, C. – MILAS L. Role of Cyclooxygenase-2 (COX2) and Its Inhibition in Tumor Biology and Radiotherapy. In *Modification of Radiation Response: Cytokines, Growth Factors and Other Biological Targets*. Heidelberg: Springer Verlag Berlin, 2003. Kapitola 18, s. 241- 258
93. FOSSLIEN, E. Biochemistry of cyclooxygenase (COX)-2 inhibitors and molecular pathology of COX2 in neoplasia. *Critical Reviews In Clinical Laboratory Sciences*. October 2000, vol. 37, no. 5, s. 431-502
94. GREEN, S., CROWLEY, J., BENEDETTI, J., SMITH, A., *Clinical Trials in Oncology*. 2. edition, Chapman and Hall/CRC, 2002. 280s. ISBN 1584883022
95. KLENER, P. – KLENER. P. Chemoterapie. In *Klinická onkologie*. Praha: Galén, 2002. Kapitola 11, s. 149-153
96. KREIMER, A.R., CLIFFORD, M.G., BOYLE, P., FRANCESCHI, S.: Human Papillomavirus Types in Head and Neck Squamous Cell Carcinomas Worldwide: A Systematic Review. *Cancer Epidemiology, Biomarkers and Prevention*, February 2005, vol. 14, s. 467-475
97. TERMINE, N., PANZARELLA, V., FALASCHINI, S., ET AL.: HPV in oral squamous cell carcinoma vs head and neck squamous cell carcinoma biopsies: a meta-analysis (1988-2007). *Annals of Oncology*. October 2008, vol. 19, no. 10, s. 1681-1690
98. BONNER, J.A., HARARI, P.M., GIRALT, J., ET AL.: Radiotherapy plus cetuximab for squamous-cell carcinoma of the head and neck. *New England Journal of Medicine*. February 2006, vol. 354, s. 567-578
99. HARRINGTON, K.J., EL-HARIRY, I.A., HOLFORD, C.S., ET AL., Phase I study of lapatinib in combination with chemoradiation in patients with locally advanced squamous cell carcinoma of the head and neck. *Journal of clinical oncology*. March 2009, vol. 27, no. 7, s. 1100-1107
100. HANAHAN, D., WEINBERG, R.A.. The hallmarks of cancer. *Cell*. January 2000, vol. 100, s. 57–70
101. WORLD HEALTH ORGANIZATION ON BEHALF OF THE SPECIAL PROGRAMME FOR RESEARCH AND TRAINING IN TROPICAL DISEASES, *Handbook: good laboratory practice (GLP): quality practices for regulated non-clinical research and development*. Paris, 2009, 2nd Edition, ISBN: 978 92 4 154755 0, <http://apps.who.int/tdr/publications/training-guideline-publications/good-laboratory-practice-handbook/pdf/glp-handbook.pdf>
102. LICITRA, L., FELIP, E. Squamous cell carcinoma of the head and neck: ESMO Clinical Recommendations for diagnosis, treatment and follow-up. *Annals of Oncology* 20, 2009, vol. 20, suppl. 4, s. 121-122
103. PETERSEN, C., BAUMANN, M., PETERSEN, S. New Targets for the Modulation of Radiation Response – Selective Inhibition of the Enzyme Cyclooxygenase 2. *Current Medicinal Chemistry – Anti-Cancer Agents*. 2003, vol. 3, no. 5, s. 354-359
104. ÚSTAV ZDRAVOTNICKÝCH INFORMACÍ A STATISTIKY ČR, *Mezinárodní statistická klasifikace nemocí a přidružených zdravotních problémů – Desátá revize*, Praha: ÚZIS, 2010, ISBN: 978-80-904259-1-0
105. NIEDER, C., MILAS, L., ANG, K.K. – MILAS, L., MASON, K., LIAO, Z., RAJU, U., MILAS, M., HUSAIN, A., ANG, K. Role of Cyclooxygenase-2 (COX—2) and Its Inhibition in Tumor Biology and Radiotherapy. *Modification of Radiation Response*, Springer Verlag Berlin Heidelberg New York 2003. Kapitola 18, s. 241-258
106. THERASSE, P., ARBUCK, S.G., EISENHAUER E.A., ET AL.: New Guidelines to Evaluate Response to Treatment in Solid Tumors. *Journal of the National Cancer Institute*, Feb 2000, vol. 92, no. 3, s. 205-216
107. DANIEL, T.O., LIU, H., MORROW J.D., ETA L.: Thromoxane A2 is a mediator of caclooxygenase-2-dependent endothelial migration and angiogenesis. *Cancer Research*, 1999, vol. 59, s. 4574-4577
108. DORMOND, O., FOLETII, A., PAROZ, C., RUEGG, C.: NSAIDs inhibit alpha V beta 3 integrin-mediated and Cdc42/Rac-dependent endothelial-cell spreading, migration and angiogenesis. *Nature Medicine*, 2001, vol. 7, s. 1041-1047.

## 10 PŘEHLED PUBLIKAČNÍ ČINNOSTI

2012

článek v časopise s impakt faktorem 3,561

**Hyperfractionated accelerated radiotherapy with concomitant integrated boost of 70-75Gy in 5 weeks for advanced head and neck cancer. A phase I dose escalation study.**

Jakub Cvek, Jiri Kubes, Eva Skacelikova, Bretislav Otahal, Pavel Kominek, Magdalena Halamka, David Feltl

Strahlentherapie und Onkologie 2012, 8, 188:666 – 670

článek

**Projekt HARDROCK: Parametrický sběr a analýza dat pacientů s nádory hlavy a krku na Klinice onkologické FN Ostrava – důraz na význam frakcionace a definice cílového objemu v radioterapii.**

Magdalena Halámka, David Feltl, Jakub Cvek, Ladislav Dušek

Klinická onkologie 25, 2012, 4, 274 – 281

příslib publikace (článek) v časopise s impakt faktorem 1,528

**Predicting Factors for Locoregional Failure of High Dose Rate Radiotherapy for Early Stage Oral Cancer.**

Jiří Petera, Igor Sirák, Luboš Tuček, Miroslav Hodek, Petr Paluska, Linda Kašáková, Simona Paulíková, Milan Vošmik, Helena Doležalová, Michaela Cvanová, Magdalena Halamka, Jan Laco

Personalized Medicine, předpoklad 11/2012

2011

článek v časopise s impact faktorem 3,123

**Plasma Levels of Vascular Endothelial Growth Factor during and after Radiotherapy in Combination with Celecoxib in Patients with Advanced Head and Neck Cancer.**

Magdalena Halamka, Jakub Cvek, Jiri Kubes, Eva Zavadova, Pavel Kominek, Jaroslav Horacek, Ladislav Dusek, David Feltl

Oral Oncology 2011 Aug ;47 (8):763-7

článek

**Studie fáze I v onkologii aneb slovy Paracelsa: lék se od jedu odlišuje pouze podaným množstvím.**

Magdalena Halámka

Postgraduální medicína 06/2011: 616-619

článek

**Hyperfrakcionovaná radioterapie 70–75 Gy za 5 týdnů s konkomitantním podáním cetuximabu u pokročilých nádorů hlavy a krku – studie fáze I.**

Jakub Cvek, Jiří Kubeš, Břetislav Otáhal, Pavel Komínek, Eva Skácelíková, Magdalena Halamka, David Feltl

Onkologie 2011; 5(6): 359-362

2009

abstrakt ve sborníku a poster

**Plasma Level of Vascular Endothelial Growth Factor (VEGF) during Radiotherapy with Celecoxib in Patients with Advanced Head and Neck Cancer**

David Feltl, Magdalena Klimešová, Eva Zavadová, Jakub Cvek, Jaroslav Horáček

abstrakt a poster na ASTRO Meeting (American Society for Therapeutic Radiology and Oncology), strana S565 a Wolfsberg Meeting on Molecular Radiation Biology/Oncology

příspěvek ve sborníku a přednáška

**Kombinace radioterapie s perorálním podáním celecoxibu (Celebrex) – poznatky ze studie.**

Klimešová M., Cvek J., Vybíralová M., Kubeš J., Zavadová E., Horáček J., Vaculová J., Feltl D.

Sborník příspěvků Radiační onkologie 2009, s. 84-87