
Univerzita Karlova v Praze
Lékařská fakulta v Hradci Králové



Význam polymorfismů genů *ATM* a *TGFβ1* v předpovědi pozdních komplikací u chemoradioterapií léčených pacientek s pokročilým karcinomem děložního čípku

Simona Paulíková

Autoreferát disertační práce

Doktorský studijní program Klinická onkologie a radioterapie

Hradec Králové

2014

Disertační práce byla vypracována v rámci doktorského studijního programu Klinická onkologie a radioterapie na Klinice onkologie a radioterapie Fakultní nemocnice v Hradci Králové.

Autor: MUDr. Simona Paulíková, Klinika onkologie a radioterapie FNHK

Školitel: prof. MUDr. Jiří Petera, Ph.D., Klinika onkologie a radioterapie FNHK

Školitel konzultant: doc. MUDr. Renata Soumarová, Ph.D., MBA, Komplexní onkologické centrum Nový Jičín

Oponenti: doc. MUDr. Martina Kubecová, Ph.D., Radioterapeutická a onkologická klinika Fakultní nemocnice Královské Vinohrady

prof. MUDr. Jindřich Fínek, Ph.D., Onkologická a radioterapeutická klinika Fakultní nemocnice Plzeň

Obhajoba se bude konat před Komisí pro obhajoby OR Klinická onkologie a radioterapie dne 12.12.2014 v Hradci Králové- ve FNHK, Bašteckého pavilon, budova č. 23, 3.patro od 13 hod.

Tato práce vznikla za podpory grantu: IGA MZ ČR- NT/11334 a dále podpořena projektem PRVOUK 37/11.

S disertační prací je možno se seznámit na studijním oddělení děkanátu Lékařské fakulty v Hradci Králové, Univerzity Karlovy v Praze, Šimkova 870, 500 38 Hradec Králové (tel. 495 816 131).

prof. MUDr. Jiří Petera, Ph.D.
Předseda komise pro obhajoby disertačních prací

1 Obsah

2	Souhrn:	4
3	Summary:	5
4	Úvod:	6
5	Karcinom děložního čípku:	6
5.1	Epidemiologie.....	6
5.2	Rizikové a prognostické faktory.....	7
5.3	Diagnostika, histopatologie a staging.....	7
5.3.1	Diagnostika.....	7
5.3.2	Histopatologie:	8
5.3.3	Staging:.....	8
5.4	Terapie karcinomu děložního čípku	9
5.5	Poléčebné sledování, komplikace a prognóza	10
5.5.1	Poléčebné sledování (follow up).....	10
5.5.2	Prognóza.....	10
5.5.3	Poléčebné komplikace.....	10
6	Radiobiologické aspekty	12
6.1	Buněčný cyklus, jeho regulace a význam jednotlivých fází.....	12
6.2	Reakce buněk na poškození ionizujícím zářením.....	13
6.3	Radiosenzitivita a radiorezistence	14
7	Gen <i>ATM</i> – Ataxia- teleangiectasia mutated.....	14
7.1	Lokalizace genu, zařazení do proteinové rodiny a funkce	14
7.2	Mutace a polymorfismy genu <i>ATM</i> a buněčná radiosenzitivita	15
8	Gen <i>TGFβ1</i> - transforming growth factor β1 gen	15
8.1	Lokalizace genu, zařazení do proteinové rodiny a funkce	15
8.2	Polymorfismy genu <i>TGFβ1</i> a postiradiční nežádoucí reakce.....	16
9	Cíle disertační práce	17
10	Soubor nemocných, vyšetřovací metody	17
10.1	Pacienti	17
10.2	Léčba a sledování	18
10.3	Vyšetřovací metody- DNA analýza jednotlivých polymorfismů	18
10.4	Statistická analýza	19
11	Výsledky.....	19
12	Diskuze a závěr	21
13	Použitá literatura:	23

2 Souhrn:

Karcinom děložního čípku je, vzhledem ke své incidenci, třetí nejčastější gynekologickou malignitou v České republice. Více jak 50% zjištěných tumorů je diagnostikováno v pokročilém stádiu (tedy stádium IIB a vyšší) a jejich léčba je mnohem náročnější, než u těch ve stádiu nižším. Metodou volby v léčbě pokročilých karcinomů děložního čípku je kombinovaná onkologická léčba, která se skládá z radioterapie (kombinace teleterapie a brachyterapie) a chemoterapie. Tento terapeutický postup nám umožňuje získat dobrou kontrolu nad tumorem, nicméně s sebou přináší riziko vzniku pozdních nežádoucích reakcí, které se vyskytují u 10-15% takto léčených žen. Tyto komplikace bohužel zatím neumíme předpovídat, proto nalezení vhodných prediktivních faktorů vyšší tkáňové radiosenzitivity by nám napomohlo předem určit rizikové pacientky, u kterých by bylo možné upravit léčbu tak, abychom těmto komplikacím předešli.

Rozvoj molekulárně biologických metod v posledních letech přinesl nové poznatky ohledně kancerogeneze, buněčného cyklu a v neposlední řadě i ohledně procesů probíhajících v buňce po ozáření. Výsledky dostupné z literatury naznačují, že za vyšší tkáňovou radiosenzitivitou stojí mutace genů, které se podílejí na reparaci DNA a které ovlivňují buněčnou proliferaci.

Cílem našeho projektu bylo prokázat asociaci mezi jednotlivými polymorfismy genů *ATM* a *TGFβ1* a pozdní toxicitou chemoradioterapie, u pacientek léčených pro pokročilý karcinom děložního čípku na Klinice onkologie a radioterapie Fakultní nemocnice v Hradci Králové. Dále jsme se také snažili validizovat vhodné a rychlé metody k jejich analýze.

Do studie bylo zařazeno celkem 55 žen léčených pro karcinom děložního čípku, ve stádiu IIB a vyšším, chemoradioterapií. Od těchto pacientek jsme odebrali 2 zkumavky nesrážlivé krve, které byly následně analyzovány na přítomnost námi zvolených polymorfismů na Ústavu Klinické biochemie a diagnostiky FNHK. Statistické zpracování výsledků proběhlo na Institutu biostatistiky a analýz Masarykovy univerzity v Brně.

Asociaci mezi jednotlivými polymorfismy genů *ATM* a *TGFβ1* a pozdní toxicitou chemoradioterapie se nám prokázat nepovedlo. Prokázali jsme ale statisticky významnou asociaci mezi homozygotním haplotypem genu *TGFβ1* – Triple homozygot (- 509C>T, 1552delAGG a L10P) a rozvojem pozdních komplikací III-IV stupně ($p=0,021$) i I-IV stupně ($p=0,012$). Také jsme zavedli a optimalizovali vhodnou metodiku k vyšetření zkoumaných genetických markerů.

Dle výsledků naší studie i dle dostupných literárních údajů se ve vztahu k rozvoji pozdních účinků po prodělané radioterapii zdá vhodné testovat spíše haplotypy či genotypy složené z jednotlivých rizikových polymorfismů, než polymorfismy samotné.

3 Summary:

Cervical cancer is due to high incidence the third most commonly diagnosed gynecological cancer in the Czech republic. More than 50% of these tumors are diagnosed in advanced stage (st. IIB and higher) and therapy is more difficult than in lower stage tumors. The standard treatment method for locally advanced cervical cancers is combined oncological therapy including external beam radiotherapy, brachytherapy and concomitant chemotherapy. This treatment provides good tumor control, but there is also a risk of late complications in irradiated area. Severe late complications affect 10-15% of patients. It is still not possible to predict late complications and therefore detection of valid predictive factors for high tissue radiosensitivity could help to identify patients with increased risk before therapy. Knowledge of such predictive factors would also help to individualize the treatment.

New molecular biological methods brought new findings about cancerogenesis, cell cycle regulation and cellular reaction to the radiation damage. It was hypothesized, that mutation of genes involved in DNA damage repair or cell proliferation are one of causes of high tissue radiosensitivity.

The aim of our study was to evaluate relations between *ATM* and *TGFβ1* polymorphisms and late tissue toxicity in patients treated for cervical carcinoma by chemoradiotherapy at the Department of Oncology and Radiotherapy of Faculty Hospital Hradec Králové. The second purpose was validation of methods for gene polymorphisms analysis.

The study included 55 patients with locally advanced cervical cancer (FIGO IIB and higher) treated by chemoradiotherapy. Two test tubes of anticoagulated blood were collected from each patient. DNA was extracted from leucocytes and after that the presence of tested polymorphisms was investigated at the Institute of Clinical Biochemistry and Diagnostics of Faculty Hospital Hradec Králové. Statistical analysis was performed at the Institute of Biostatistics and Analyses, Masaryk University Brno.

We didn't prove association between single polymorphisms of candidate genes *ATM* and *TGFβ1* and late toxicity after chemoradiotherapy. On the other hand we established significant association between compound homozygous haplotype of gene *TGFβ1* – Triple homozygot (- 509C>T, 1552delAGG a L10P) and late complications grade III-IV (p=0,021) and grade I-IV (p=0,012). Our project also contributed to improvement of methods for investigation of genetic markers.

According to our study and new publications compound haplotypes or genotypes seem to be more useful for explanation of relation between late tissue toxicity and genetic factors than single polymorphisms of candidate genes.

4 Úvod:

Zhoubná nádorová onemocnění jsou druhou nejčastější příčinou úmrtí v České republice a vzhledem ke své vzrůstající incidenci, představují vysokou společenskoekonomickou zátěž české populace. Z hlediska epidemiologie patří Česká republika k nejzatíženějším státům v Evropě i na celém světě. Ročně dle posledních údajů onemocní zhoubným nádorem přes 80 000 obyvatel a zemře více jak 27 000 nemocných.

Karcinom čípku děložního, na který je zaměřena tato práce, je třetím nejčastějším gynekologickým nádorovým onemocněním u žen v České republice. Ročně onemocní přibližně 1000 žen a asi 400 pacientek za rok v důsledku tohoto onemocnění umírá. Pro prognózu pacientek je důležitý především včasný záchyt onemocnění, protože pokročilá stádia již nelze řešit chirurgicky. Metodou volby se u takových žen stává radikální radioterapie- zevní radioterapie v kombinaci s brachyterapií a konkomitantní chemoterapií. Tato léčba umožňuje sice dobrou kontrolu nad chorobou, ale přináší s sebou možný vznik pozdních postiradiačních komplikací. Tyto komplikace se vyskytují u 10-15% takto léčených žen a zvyšují morbiditu i mortalitu v poléčebném období. Prozatím nedokážeme předem předpovídat jejich výskyt, proto by nalezení vhodných prediktivních faktorů vyšší radiosenzitivity umožnilo u pacientek následně modulovat terapii tak, abychom těmto komplikacím předešli.

Dle dostupných údajů v literatuře za pozdní postiradiační reakce může vyšší radiosenzitivita tkání. Jako její příčina byla a je zkoumána celá řada mutací genů, které zodpovídají především za reparační procesy poškozené DNA ionizujícím zářením, nebo jsou zapojeny do proliferace buněk. Vzhledem ke složitosti těchto procesů, nelze prozatím z dostupných vědeckých publikací přesně určit mutaci jediného genu, či mutace skupiny genů, které by byly zodpovědné za zvýšenou tkáňovou sesitivitu k ionizujícímu záření.

V rámci této práce jsme se v teoretické oblasti zaměřili na epidemiologii, diagnostiku a léčbu karcinomu děložního čípku. V další části jsou uvedeny radiobiologické údaje, základní teorie o radiosenzitivitě a radiorezistenci tkání a pojednání o genech *ATM* a *TGFβ1* s důrazem na jejich funkci a význam jejich polymorfismů v rozvoji pozdní reakce tkání na poškození ionizujícím zářením.

Vlastní výzkumná část práce je zaměřena na analýzu vztahu mezi jednotlivými polymorfismy genů *ATM* a *TGFβ1* a pozdními postiradiačními komplikacemi vzniklými u pacientek léčených pro pokročilý karcinom děložního čípku na našem pracovišti.

5 Karcinom děložního čípku:

5.1 Epidemiologie

Karcinom děložního hrdla, je dle posledních údajů v České republice třetí nejčastěji se vyskytující nádorové onemocnění ženských pohlavních orgánů. Se svojí incidencí 19,1/ 100 000 obyvatel se Česká republika řadí v evropském měřítku mezi země s největším výskytem tohoto onemocnění.

Mortalita činí u nádorů děložního hrdla 7,5 případů/ 100 000 obyvatel ročně a její tendence má dle posledních údajů mírně vzestupný charakter. Ve srovnání s dalšími evropskými státy je mortalita v ČR spíše na střední úrovni, v celosvětovém měřítku potom patříme k zemím s nižší mortalitou.

Bohužel dlouhodobě přetrvává ještě vysoké procento pacientek, u kterých je diagnostikováno onemocnění v pokročilém stadiu. Toto procento činí přes 50% všech diagnostikovaných invazivních karcinomů děložního hrdla. Tyto alarmující hodnoty svědčí o pozdní diagnostice, která se odvíjí od absence dobře organizovaného screeningu, nekvalitních cytologických laboratoří, nedostatku testování HPV a neexistence zpětné vazby ve smyslu kontroly pracovišť (Cibula et al. 2009).

5.2 Rizikové a prognostické faktory

Hlavním rizikovým faktorem je infekce lidským papilomavirem s vysokým rizikem - HR HPV (high risk human papilloma virus). Jde již v podstatě o faktor etiologický, protože jeho pozitivitu vykazuje 99,7 % případů karcinomu čípku děložního. Nejvyšší riziko vzniku maligní transformace u buněk sliznice děložního čípku představují především HR typy 16 a 18, které se podílejí na vzniku přibližně 70% karcinomů. Promořenost naší populace tímto virem je zhruba 80% a svého maxima výskytu dosahuje před 25. rokem u sexuálně aktivních žen.

Mezi další rizikové faktory patří- časný začátek pohlavního života, větší počet sexuálních partnerů (10 a více), kouření (oslabuje slizniční imunitu), multiparita, nízký socioekonomický status, imunodeficitní onemocnění, nedostatečný příjem vitamínů, jistě rodinná zátěž ze strany matky a užívání hormonální kontracepce, která podporuje transkripci a perzistenci viru v kombinaci s dalšími rizikovými faktory. Jedním z velmi důležitých rizikových faktorů je také zanedbávání pravidelného každoročního cytologického screeningu s expertní kolposkopií. Bohužel screening není v České republice prozatím dobře organizován a výsledkem je tak přetrvávající vysoká incidence karcinomu cervixu.

Většina hlavních prognostických faktorů je zahrnuta v samotném stagingu onemocnění a vyjádřena pomocí TNM a FIGO klasifikace. Jako prognosticky negativní se jeví tumory většího rozsahu (T), pozitivní postižení lymfatických uzlin (pokud se zjistí peroperačně, klesá šance na pětileté přežití z 90 na 30%), větší velikost primárního tumoru (u pacientek s tumorem větším než 4 cm je snižené 10 leté přežití na pouhých 13% (Mouková et al. 2013) a jako velmi silný negativní prediktivní faktor se jeví bilaterální postižení parametrií oproti unilaterálnímu (Siuhami et al., G C de Toit et al. 1997). Mezi další negativní prognostické faktory patří – šíření tumoru do oblasti děložního isthmusu a děložního těla, invaze do krevních a lymfatických cév (prognosticky horší je angioinvaze), intraperitoneální šíření, histopatologický grading, který má prognostický význam především u adenokarcinomů, u časných stádií spinocelulárního karcinomu je to hodnota SCCA markeru před léčbou. Prognózu také významně ovlivňuje adekvátní radikalita operačního výkonu a kvalitně provedená radioterapie, proto je nutné péči o tyto pacienty přenechat do specializovaných onkologických center, kde je zajištěna komplexní terapie.

5.3 Diagnostika, histopatologie a staging

5.3.1 Diagnostika

V rámci preventivního screeningového programu karcinomu děložního čípku je pacientce jednou ročně provedeno gynekologické vyšetření pomocí prebiptických metod (kolposkopie, cytologický stěr a nepovinně testace na HR HPV subtypy) doplněné pohmatovým vyšetřením, vyšetřením zevních rodidel a gynekologickým ultrazvukem. Pokud některé z těchto vyšetření ukáže podezření na prekancerózu či karcinom, následuje cílená biopsie, kterou v případě pozitivního výsledku následují standardní stagingová vyšetření, která jsou uvedena v tabulce č. 1.

Tabulka č. 1: Standardně užívaná obligatorní a fakultativní stagingová vyšetření

<i>Obligatorní vyšetření</i>	<i>Fakultativní vyšetření</i>
Anamnéza, fyzikální vyšetření	Cysto- rektoskopie ev. koloskopie
Komplexní gynekologické vyšetření + biopsie	Expertní UZ vaginální sondou
Laboratorní vyšetření- KO+diff, biochemie séra a moči	UZ ledvin a jater
Odběr bHCG a markeru SCCA	Scintigrafie ledvin
Rentgenový snímek hrudníku od st.IB2	Laparoskopický staging uzlin
MRI pánve od st. IB2	Peroperační vyšetření SLN
PET/CT, nebo CT břicha a pánve od st.IB2	

Dle výsledků výše popsaných vyšetřovacích metod je určeno stádium zhoubného procesu. O následující terapii by měl vždy rozhodovat tým skládající se z gynekologa, klinického a radiačního onkologa, patologa a event. radiodiagnostika, jelikož, kvalitně provedený a určený staging s následně dobře zvolenou terapií patří k důležitým prognostickým faktorům.

5.3.2 Histopatologie:

Převážná většina diagnostikovaných primárních tumorů hrdla děložního jsou tumory epitelové s převahou dlaždicobuněčného karcinomu, který tvoří 60-80% všech karcinomů této oblasti. Další 10-15% tvoří adenokarcinomy různých typů a zbytek pak představují vzácné tumory např. adenosquamózní karcinomy, adenoidně cystické karcinomy, nádory s neuroendokrinní sekrecí atd. Zajímavostí je, že v zemích, kde se vzhledem ke kvalitnímu screeningu snižuje incidence karcinomu hrdla děložního, klesá podíl karcinomů dlaždicobuněčných, ale zvyšuje se výskyt adenokarcinomů (Cibula et al. 2009). Závěr každého histopatologického vyšetření biotického vzorku by měl vždy uvádět histologický typ nádoru, stupeň diferenciací (grade), hloubku invaze do stromatu a vyjádření o lymfangioinvasi. U stádií Ia1 a Ia2 je nutno dodat rozměr léze. Pokud šlo o konizát, potom popis okrajů preparátu a to jak laterálních, tak proximálního okraje v kanále hrdla děložního.

5.3.3 Staging:

K určení stádia karcinomu děložního čípku používáme dvě hlavní klasifikace- TNM a FIGO. Zohledňuje se v nich především velikost tumoru, postižení okolních orgánů, lymfatických uzlin a výskyt vzdálených metastáz. Prozatím o stádiu onemocnění nerozhoduje v TNM klasifikaci uvedená stromální invaze, dále stádium neovlivňuje ani lymfangioinvaze, stupeň postižení parametrií, poměr velikosti tumorózní léze k objemu cervixu či rozlišení stupně postižení stěny rekta a močového měchýře. TNM klasifikace hodnotí velikost primární léze, postižení regionálních mízních uzlin a výskyt vzdáleným metastáz. Klasifikace FIGO je založena na klinických vyšetřeních, ačkoliv je v poslední revizi zřejmý posun ke klasifikaci na základě histopatologického vyšetření preparátů získaných chirurgickým stagingem. Podrobnější rozdělení jednotlivých stádií uvedeno v tabulce č. 2.

Tabulka č. 2: Souhrn klasifikací TNM a FIGO (Cibula et al. 2009)

TNM	FIGO	
TX	-	Primární nádor (TU) se nedá posoudit
-	0	Dysplasie nebo cervikální invazivní neoplazie (CIN)
Tis	0	Karcinom in situ (CIN III)
T1	stádium I	TU ohraničený na děložní hrdlo (prorůstání do děložního hrdla se nebere v potaz)
<i>T1</i>	<i>IA</i>	Invazivní karcinom identifikovatelný jen mikroskopicky
<i>T1</i>	<i>IA1</i>	Stromální invaze do hloubky a maximálně 3 mm a do šířky maximálně 7 mm
<i>T1</i>	<i>IA2</i>	Stromální invaze do hloubky a maximálně 5 mm a do šířky maximálně 7 mm
<i>T1</i>	<i>IB</i>	Stromální invaze do hloubky větší než 5 mm nebo do šířky větší než 7 mm, nebo klinicky identifikovatelný tumor ohraničený na děložní hrdlo
<i>T1</i>	<i>IB1</i>	Klinicky identifikovatelný tumor menší než 4 cm
<i>T1</i>	<i>IB2</i>	Klinicky identifikovatelný tumor větší než 4 cm
T2	stádium II	Nádor šířící se mimo děložní hrdlo nebo nepostihující boční stěny pánve nebo dolní třetinu pochvy
<i>T2</i>	<i>IIA</i>	TU infiltruje stěnu pochvy, ale ne její dolní třetinu
<i>T2</i>	<i>IIB</i>	TU infiltruje parametria
T3 a/nebo N1	stádium III	Šíření TU do dolní třetiny pochvy nebo se šíří na pánevní stěnu, či způsobuje hydronefrózu
<i>T3aN0</i>	<i>IIIA</i>	TU postihuje dolní třetinu pochvy
<i>T1-3bN1</i>	<i>IIIB</i>	TU se šíří na boční stěnu pánve nebo způsobuje hydronefrózu či afunkční ledvinu
	stádium IV	
<i>T4</i>	<i>IVA</i>	TU infiltruje stěnu močového měchýře nebo konečníku, nebo se šíří mimo malou pánev
<i>M1</i>	<i>IVB</i>	TU má vzdálené metastázy

5.4 Terapie karcinomu děložního čípku

Chirurgický výkon je považován za dominantní léčebnou modalitu především u časných stádií karcinomu hrdla děložního (tedy do stádia IIA). V posledních letech je kladen důraz především na redukci pooperační morbidity a to pomocí modifikace radikality

výkonů s ohledem na prognostické faktory a přání pacientky ohledně zachování fertility. Alternativou v těchto stádiích k chirurgickému výkonu je radikální radioterapie. Indikována je v případech, kdy se pacientka z jakéhokoli důvodu nemůže podrobit operačnímu výkonu, nebo jde o její výslovné přání. Jako metoda volby se nepoužívá především kvůli postiradiačním komplikacím, které nemocným zhoršují kvalitu především sexuálního života a také kvůli ozáření ovarií. Nicméně vzhledem ke zlepšujícím se ozařovacím technikám se radioterapie dostává dle posledních studií, do popředí již od stádia IB2.

Metodou volby od stádia IIB, kdy nádor přerůstá pericervikální fascii a postihuje parametria je radikální chemoradioterapie. V posledních letech však není úplně jednotný názor na operabilitu tohoto stádia. V některých centrech, pokud nejsou potvrzeny vzdálené metastázy či invaze do okolních orgánů, se operují i stádia s invazí do parametrií. Vzhledem k tomu, že ještě není dostatek studií, které by srovnávaly prognózu a morbiditu pacientek léčených chirurgicky a léčených radioterapií, nelze stoprocentně říci, která z metod je metodou volby. Nicméně standardem v České republice zůstává radikální chemoradioterapie a k tomuto způsobu léčby se přiklání i NCCN doporučení.

5.5 Poléčebné sledování, komplikace a prognóza

5.5.1 Poléčebné sledování (follow up)

Cílem poléčebného sledování pacientek je včasné zachycení možné recidivy onemocnění, dalším cílem je eventuální výskyt sekundárních tumorů ve sledované oblasti a včasná diagnostika poléčebných komplikací. Nejčastěji se objevují recidivy do dvou let od prodělané léčby, nicméně až 11% případů se manifestuje i po 5. roce od ukončení terapie (Cibula et al. 2009). V prvním roce by měla být pacientka vyšetřena nejprve po čtyřech týdnech od ukončení terapie a následně docházet na kontroly každé tři měsíce. V rámci této kontroly je jí provedeno fyzikální a gynekologické vyšetření, fakultativně provedeny odběry markerů SCCA (u spinocelulárních karcinomů), nebo CA 125 a CEA (u adenokarcinomů). Ultrazvuk pánve a ledvin v prvních dvou letech je indikován každé 3-6 měsíce, poté jen 1x ročně. Ze zobrazovacích vyšetření se provádí RTG srdce a plic 1x ročně a fakultativně CT břicha a pánve, MRI pánve, nebo PET/CT.

5.5.2 Prognóza

Včasné zachycení karcinomu děložního čípku, dává pacientkám velkou naději na úplné vyléčení. S pokročilostí choroby se však jejich prognóza zhoršuje. Nejvýznamnějším a prognózu nejvíce zhoršujícím faktorem je samotná velikost primárního tumoru a hlavně postižení lymfatických uzlin. Důležitým faktorem je také správně zvolená a hlavně kvalitně provedena terapie a v neposlední řadě závisí prognóza na agresivitě samotného tumoru, celkovém stavu pacientky a její spolupráci.

5.5.3 Poléčebné komplikace

Vznik nežádoucích reakcí po léčbě závisí u pacientek s karcinomem děložního čípku především na pokročilosti onemocnění, užití vhodné léčebné metody a hlavně na celkovém stavu pacientky před léčbou. Vzhledem k tomu, že u časných stádií dáváme přednost léčbě chirurgické a u stádií pokročilejších zase převládá chemoradioterapie, dělíme poléčebné komplikace na chirurgické, postiradiační a postchemoterapeutické. Dle vzniku od ukončení léčby, můžeme dělit komplikace také na časně a pozdní. Kvůli zaměření disertační práce zde budou více rozebrány nežádoucí reakce po onkologické léčbě.

Rozvoj chirurgických komplikací závisí především na rozsahu výkonu (na radikalitě), na komorbiditách pacientky a hlavně na erudici centra provádějícího operační léčbu. Nejčastější peroperační komplikací, a to hlavně při radikální hysterektomii, je krevní ztráta. Postihuje asi

5% pacientek a v dnešní době je mortalita z této příčiny již vzácná. V časném pooperačním období se nejčastěji vyskytují urologické komplikace, jako je hypotonie močového měchýře s nutností ponechání Foleyova katétru (15-76%). V pozdním pooperačním období se objevují komplikace předně v souvislosti s provedeným výkonem v pánvi a v souvislosti s provedenou lymfadenektomií. Ty nejčastěji se vyskytující jsou: 1) urologické – přetrvávající hypotonie močového měchýře, tvorba píštělí, inkontinence moči, 2) intestinální- subileózní a ileózní stavy, 3) lymfovaskulární - nejčastější jsou lymfedémy dolních končetin, trombembolické příhody z pánevních žil a 4) komplikace spojené s hojením sutury- hematomy, abscesy ve stěně břišní, hernie. Velmi důležité pozdní komplikace ovlivňující kvalitu života žen po chirurgické léčbě jsou sexuální dysfunkce. V pooperačním období udává potíže se sexuální dysfunkcí 75% žen a přibližně 15% pacientek svůj sexuální život po léčbě úplně ukončí (Cibula et al. 2009).

Onkologická terapie, vzhledem ke svému širokému spektru, způsobuje celou řadu nežádoucích reakcí. Netýká se totiž pouze tkání postižených tumorem, ale často ovlivňuje celou řadu pochodů, které se dříve, nebo později projeví na zdravých tkáních jak v přímém okolí tumoru, tak i na tkáních vzdálených. Již při plánování radioterapie musí radiční onkolog dle hodnot tolerančních dávek zdravých tkání rozhodnout o dávce, která bude aplikována do cílového objemu s minimálním zasažením kritických orgánů. U karcinomu děložního čípku jsou hlavními kritickými orgány močový měchýř, rektum a tenké střevo. Pokud je nutné ozařované pole rozšířit a ozařovat oblast paraaortálních uzlin přidává se k nim ještě mícha a ledviny.

Komplikace po prodělané radioterapii můžeme rozdělit dle místa vzniku na lokální a systémové. *Lokální reakce* jsou omezeny na ozařovaný objem. Bývají jimi postiženy tkáně vystavené přímému svazku ionizujícího záření, což u karcinomu děložního čípku jsou především kůže v ozařovaném poli, rektum, močový měchýř, pochva a pánevní kosti. *Systémové reakce* po aktinoterapii jsou nespecifického rázu. Vyskytují se zejména u pacientek, u kterých byl velký ozařovací objem v oblasti břicha. Patří mezi ně únava, malátnost, nauzea, zvracení a jako systémovou reakci lze označit i útlum kostní dřeně.

Dalším a prakticky nejvyužívanějším dělením postiradiačních reakcí je rozdělení dle rychlosti jejich nástupu- na časná a pozdní. Toto dělení ale nezávisí tak na době vzniku, jako na patofyziologickém mechanismu účinku ionizujícího záření na určité typy tkání.

Časné poostiradiační reakce se týkají především tkání s rychlou obměnou buněk. Jde tedy především o sliznice, kůži a kostní dřeň. U pacientek s karcinomem děložního čípku nejčastěji pozorujeme lokální časná účinky v podobě postradiační dermatitidy v oblasti tříslel, perinea a crena ani. Další často se vyskytující jsou reakce na sliznici pochvy v podobě edému a epitelolýzy s fibrinovými nálety (tzv. špekovitá reakce). Mezi velmi frekventované symptomy časných reakcí patří urologické obtíže - dysurie, hematurie, nykturie a z gastrointestinálních to jsou především průjemy, nadýmání, tenezmy, bolesti břicha, rektorhagie a při ozařování v oblasti horního břicha pak nechutenství, nauzea a zvracení. K dalším již systémovým časným reakcím řadíme hematologické reakce. Tyto se zvláště vyskytují u pacientek léčených kombinací chemoterapie a radioterapie. Proto je během léčby nutné u pacientek sledovat pravidelně hodnoty krevního obrazu (KO) s diferenciálním počtem leukocytů. Pozorované poklesy se týkají především erytrocytů, leukocytů a trombocytů. Závažnost reakcí se posuzuje podle pětistupňové škály nejčastěji dle RTOG, RTOG/EORTC kritérií, nebo LENT-SOMA skórovacího systému.

Pozdní nežádoucí efekty radioterapie postihují tkáně, jejichž buňky mají dlouhý buněčný cyklus a reagují tedy s větším zpožděním na poškození ionizujícím zářením. Bohužel buňky těchto tkání mají také nízkou schopnost regenerace, a proto změny v dané tkáni bývají

většinou ireverzibilní. Toto je hlavní limitující faktor aplikace radioterapie. Frekvence výskytu pozdních komplikací po radioterapii se u pacientek s karcinomem děložního čípku pohybuje mezi 10-15%. Pozdní nežádoucí reakce se manifestují v intervalu od 6 měsíců až po několik let od ukončené terapie. Po radioterapii karcinomu cervixu bývá nejčastěji postiženo rektum, močový měchýř a uretra, vagina a tenké střevo. Riziko se zvyšuje se zvyšující se dávkou, s velikostí ozařovaného objemu a závisí také na použité technice a dávkovém schématu. Z biologických faktorů rozvoj pozdních účinků radioterapie ovlivňuje především tkáňová hypoxie, sekundární zánětlivá reakce a fibroprodukce a v neposlední řadě molekulárně biologické faktory (např. mutace genů zodpovědných za správný průběh buněčného cyklu a za buněčnou proliferaci). Právě mutace genů ovlivňujících buněčné pochody jsou v současné době studovány jako jedna z příčin vyšší senzitivity tkání k ionizujícímu záření. K objektivizaci pozdních komplikací používáme mezinárodní klasifikace podobně jakou akutních nežádoucích reakcí. Pacientky po léčbě cervikálního karcinomu postihují nejčastěji stenóza pochvy nebo poševního pahýlu, postiradiační proktitida a cystitida, fibróza podkoží a lymfedém dolních končetin. Závažnější nežádoucí, nicméně vzácné reakce jsou osteonekróza kostí v pánevním kruhu a lumbosakrální plexopatie. Léčba těchto komplikací bývá dlouhodobá a ve většině případů jde spíše o zmírňování obtíží. U těžších případů je nutné i operační řešení (např. derivační stomie, epicystostomie, nebo chirurgická úprava vaginálních stenóz). Cílem radiační onkologie je proto co nejvíce šetřit zdravé tkáň úpravou technik plánování a aplikace ionizujícího záření. Cílem současného výzkumu v této oblasti je nalézt vhodné prediktivní faktory vyšší radiosenzitivity, které by nám umožnily lépe individualizovat léčbu s cílem dobré kontroly samotného nádoru při maximálním šetřením zdravých tkání.

Postchemoterapeutické nežádoucí účinky zahrnují velké množství akutních i pozdních komplikací a jejich podrobnější popis jistě přesahuje rámec tohoto textu. Vzhledem k tomu, že u pacientek léčených pro karcinom děložního čípku jsou v radikální léčbě nejčastěji užívány platinové deriváty, vyskytují se u nich především tyto nežádoucí reakce – 1) alopecie, která bývá pouze dočasná, 2) nauzea a zvracení, které ale již v dnešní době většinou dobře zvládneme pomocí kombinované antiemetické terapie, 3) hematologická toxicita- anémie, neutropénie a trombocytopenie, které dle stupně závažnosti řešíme suplementací krevních derivátů či růstovými faktory a poslední velmi významná je 4) nefrotoxicita, která u těžších případů může skončit trvalým poškozením až selháním ledvin, proto je nutné pravidelně kontrolovat ledvinné funkce a zajistit dostatečnou hydrataci.

6 Radiobiologické aspekty

6.1 Buněčný cyklus, jeho regulace a význam jednotlivých fází

Buněčný cyklus je u nenádorových zdravých buněk přesně a citlivě regulovaný děj, na jehož správném průběhu se podílí celá řada genů a jejich produktů. Dělí se na 4 fáze: G1, S, G2, M, přičemž každá fáze má svá specifika a u různých druhů buněk trvá i jinak dlouhou dobu.

Fáze G1 (Gap1)- je první fází po dělení buňky a probíhají v ní běžné fyziologické procesy. Trvá většinou nejdéle a v jejím průběhu má buňka možnost vstoupit do klidové G0 fáze, kdy je nulová proliferační aktivita a probíhají bazální procesy uvnitř buňky. Pokud buňka nevstoupí do G0 fáze následuje *fáze S (syntéza)*- v jejím průběhu dochází ke zdvojení (replikaci) genetického materiálu buňky v rámci přípravy na buněčné dělení. Replikace DNA je mnohastupňově kontrolovaný proces, který může při špatné funkci kontrolních či reparačních mechanismů vést k závažným genetickým změnám (mutacím). Po fázi syntézy

následuje *fáze G2 (Gap2)* při níž se zdvojují organely a produkují proteiny nutné k následnému rozdělení buňky na dvě buňky dceřiné. Samotná fáze dělení se nazývá *fáze M (Mitotická)* na jejímž konci vzniknou dvě buňky s identickou genetickou výbavou, které vstupují ve svých cyklech opět do fáze G1.

Regulace takto složitého procesu je nezbytná pro udržení homeostázy v organismu a její poškození vede buď k buněčné smrti, nebo k nádorové transformaci. Kontrolu zajišťují proteiny cykliny a cyklindependentní kinázy, jejichž funkce je na cyklinech závislá. Buněčný cyklus má prozatím popsány 4 kontrolní body (checkpointy), z nichž pro radiobiologii nejvýznamnější je regulační bod G1 a G2 (Felzl, Cvek 2008). Checkpoint G1 se nachází mezi G1 a S fází a před jeho překonáním prodělá buňka komplexní kontrolu integrity DNA. Při nalezení chyby průběhu kontroly, dojde k zastavení buněčného cyklu a ke spuštění reparačních mechanismů. Pokud se defekt opravit nedá, přejde buňka do programované buněčné smrti, pokud jej opraví, může pokračovat dále v procesu dělení. Klíčovou roli v detekci poškozené DNA hraje DNA dependentní kináza ATM, o které bude pojednáno v samostatné kapitole níže. Druhým checkpointem je G2, který se nachází mezi G2-M fází. Jeho hlavní význam spočívá v kontrole jak integrity DNA, tak dalších částí replikované buňky před rozdělením do dceřiných buněk. Tyto dva velmi důležité kontrolní body buněčného cyklu se podílejí na udržení genomové stability a jejich poškození se významně podílí na rozvoji nádorové buněčné transformace.

Z radiobiologického hlediska je buňka nejcitlivější k poškození ionizujícím zářením v pozdní G1 a G2 fázi, tedy před vstupem buňky do checkpointu. Pokud došlo k poškození DNA před checkpointem je větší pravděpodobnost jeho odhalení, ale i větší pravděpodobnost buněčné smrti. Zatímco pokud je DNA poškozena až za checkpointem je větší riziko, že poškození nebude opraveno a přežije tak buňka s poškozeným genomem (Felzl, Cvek 2008).

6.2 Reakce buněk na poškození ionizujícím zářením

Poškození molekuly DNA způsobuje celá řada faktorů, nicméně vzhledem k zaměření této práce bude dále pojednáno především o vlivu ionizujícího záření na molekulu DNA.

Interakce ionizujícího záření s molekulou DNA můžeme rozdělit na přímé a nepřímé. Základním procesem, který způsobuje samotné poškození DNA je ionizace. Ionizace může být buď **přímá** (všeobecně jí s větší pravděpodobností způsobuje záření s těžkými částicemi- alfa záření) - vede přímo k výraznému poškození většinou obou vláken DNA, nebo **ionizace nepřímá** (takto poškozuje molekulu DNA záření s lehkými částicemi- záření X)- ta způsobí nejdříve ionizaci vody s následným vznikem volných radikálů kyslíku, které reagují s DNA a poškozují její fosfosacharidovou složku, nebo poškozují baze. Tímto způsobem je poškozeno až 70% buněk vystavených ionizujícímu záření (Šlampa, Petera et al. 2007). Nejdůležitějším inzultem způsobeným ionizujícím zářením je tvorba zlomů DNA molekuly. Zlomy mohou postihnout buď jedno, nebo obě vlákna DNA a dle toho je také dělíme na jednovláčkové zlomy (single- strand breaks SSB) a dvouvláčkové zlomy (double strand breaks – DSB) SSB vznikají narušením vazby mezi jednotlivými nukleotidy na jednom vlákně DNA molekuly. Jsou snadněji reparaovatelné, protože druhé nepoškozené vlákno slouží jako vzor pro reparační mechanismy. DSB jsou nejvýznamnějším poškozením DNA. Jejich reparace je podstatně složitější a zatížená velkým výskytem chyb (chromozomální aberace, mutace). Takto poškozená genetická informace může vést k neregulovanému dělení buněk a ke spuštění tumorogeneze.

Odpověď buňky na poškození DNA je vysoce složitý proces, zahrnující regulaci genové exprese ve všech jejích stupních, vedoucí k expresi tisíců genů (Missirian et al. 2014). Prvním krokem odpovědi na poškození DNA je rozpoznání zlomů této molekuly. Klíčovým enzymem této aktivační reakce je ATM kináza a ATR (ATM and RAD3 related) kináza, které následně

spustí kaskádu dějů vedoucích k zastavení buněčného cyklu a k reparaci, nebo k buněčné smrti (Davis et al. 2013). Dva nejdůležitější mechanismy sloužící k opravě DSB zlomů DNA jsou homologní rekombinace (HR) a nehomologní rekombinace (HNEJ).

Homologní rekombinace je vysoce přesný reparační proces využívající nepoškozeného vlákna DNA. Probíhá spíše u jednodušších organismů a uplatňuje se především v pozdní S fázi a fázích G2 a M, protože jsou zde přítomny sesterské chromatidy sloužící jako předloha (Reliene et al. 2007).

Nehomologní rekombinace je v kombinaci s dalšími reparačními procesy nejdůležitějším mechanismem opravy genomu u lidí (Burma et al. 2006). Dochází při ní k přímému spojování konců poškozeného řetězce DNA molekuly (bez ohledu na kompatibilitu). Na rozdíl od HR, není potřeba homologního vlákna DNA k reparaci léze řetězce. Tento typ opravy genomu je ale spojen s velkým rizikem vzniku genomových změn (mutací), které mohou být spouštěčem kancerogeneze.

6.3 Radiosenzitivita a radiorezistence

Vnímavost buněk k účinkům ionizujícího záření je ovlivněná celou řadou faktorů. Jedním ze základních je fáze buněčného cyklu v jaké se dané buňky při ozáření tkáně nacházejí. Bylo prokázáno, že buňky, které se nacházejí v pozdní G1 a G2 fázi, tedy před kontrolními body cyklu, nebo u nich probíhá mitotická fáze, jsou více radiosenzitivnější (Sinclair et al. 1963). Na tomto podkladě lze následně rozdělit tkáně na radiosenzitivní a radiorezistentní, protože tkáně, jejichž buňky mají krátký buněčný cyklus s rychlým proliferačním potenciálem, budou více vnímavé k ozáření. Rychle dělící se buňky mají totiž omezenou reparační kapacitu a po jejich ozáření dochází k rychlé buněčné smrti (sliznice, epidermis aj.). Naopak je tomu u tkání radiorezistentních, jejichž buňky se buď dělí pomalu, nebo vůbec (vazivo, svalová tkáň, nebo buňky CNS). Na vnímavost buněk k ionizujícímu záření má vliv i dostatečné okysličení, přičemž hypoxie způsobuje vyšší radiorezistenci buněk. Buněčná radiosenzitivita má ale jistě, dle posledního výzkumu, podklad v genetické výbavě jedince. Tyto genetické rysy společně s vlivem prostředí způsobují velkou interindividuální variabilitu reakce organismu na ionizující záření (Roberts et al. 1999) a jsou v posledních letech významným středem zájmu vědeckých prací, zkoumajících vhodné prediktivní faktory vyšší tkáňové citlivosti k ozáření. Vzhledem k výše popsané reakci buněk na ozáření se jako vhodné genetické faktory nabízejí právě geny zodpovědné za detekci a reparaci poškozené DNA.

7 Gen *ATM* – Ataxia- teleangiectasia mutated

7.1 Lokalizace genu, zařazení do proteinové rodiny a funkce

Gen *ATM*, byl lokalizován na dlouhém raménku 11. chromozómu (11q22-q23) již v roce 1991 (Foroud et al. 1991). Kóduje důležitou checkpointkinázu, která je členem PI3/PI4-kinázové rodiny. *ATM* serine/threoninová kináza je důležitý enzym, který patří mezi hlavní regulátory signálních cest buněčného cyklu zodpovědných za odpověď na poškození DNA molekuly (Chistakov et al. 2008). Po své aktivaci spouští kaskádu dějů, při které jsou aktivovány další proteiny zahrnující- tumor supresory p53 a BRCA1, checkpoint kinázu CHK2, checkpoint proteiny RAD 17 a RAD 9 a DNA reparační proteiny NBS1 a SMC1.

Hlavním procesem, který vede k aktivaci *ATM*, je remodelace chromatinové formace, vznikající po zasažení DNA molekuly fyzikálními či chemickými noxami, na jejichž podkladě vznikají SSB a DSB zlomy DNA. Aktivace *ATM* je jedním z prvních kroků směřujících k odpovědi na poškození DNA (Lavin et al. 1997). Po iradiaci dochází k fosforylaci serinové části *ATM* kinázy, což vyvolá disociaci neaktivního dimeru a *ATM* se tak stává aktivní. K tomuto procesu je nutná přítomnost komplexu MRN, který se skládá

z proteinů Mre11, Rad50 a Nbs1 (Uziel et al. 2003). MRN komplex je spojen s chromatinem, když rozpozná DSB zlom DNA, vyšle signál neaktivní ATM kináze. Jde o hlavní senzor vzniklých zlomů DNA molekuly po iradiaci (Mirzoeva et al. 2003).

ATM kináza po své aktivaci fosforyluje velké množství substrátů. Reguluje především 3 nejdůležitější checkpointy buněčného cyklu a je tak zapojena do DNA reparace a také do regulace apoptózy (Khanna et al. 2001).

7.2 Mutace a polymorfismy genu *ATM* a buněčná radiosenzitivita

Název samotné ATM kinázy je odvozen od vzácného neurodegenerativního onemocnění Ataxia teleangiectázia, které se dědí autozomálně recesivně (Border et al. 1995; Lavin et al. 2008). Jedinci, kteří jsou nosiči tohoto onemocnění, se rodí bez známek postižení, ale během prvních 2-3 let se u nich objeví první příznaky. Incidence této geneticky podmíněné poruchy je 1/ 100 000 živě narozených dětí na světě (Chun et al. 2004). Mezi hlavní projevy AT syndromu patří - poruchy koordinace pohybů (progresivní choreoatetóza), u dětí bývá opožděný vývoj chůze, ataxie a apraxie pohybu očí. Dále se objevují četné teleangiectázie v oblasti mozečku, kůže nosu, uší, očního bělma a nad lokty. Postižen je i mentální vývoj jedinců, který se zastavuje na úrovni 10-12 let. Často již během prvních měsíců života, se objevují příznaky imunodeficiency (opakované sinopulmonární infekce) a příznaky vyšší radiosenzitivity a to jak na UV záření, tak i na medicínální ozáření. Zaznamenán byl i zvýšený výskyt nádorových onemocnění, která vznikají již v mladém věku (Khanna et al. 2000).

Za příčinu tohoto vrozeného syndromu byla v minulosti označena řada mutací genu *ATM*. Pacienti s AT syndromem jsou homozygotní nositelé těchto mutací a mají plné projevy onemocnění, nicméně u heterozygotních nositelů mutací či polymorfismů genu *ATM* se žádné z těchto symptomů nevyskytují. Jistě jsou ale predisponováni k rozvoji malignit (Cavaciuti et al. 2005). Lze proto považovat heterozygotní mutace či polymorfismy tohoto genu za rizikový faktor rozvoje karcinogeneze a i za možnou příčinu vyšší radiosenzitivity (Weissberger et al. 1998). U pacientů s AT syndromem byly odhaleny desítky variant polymorfismů s neznámým biologickým významem (Sandoval et al. 1999). Jedním z často zkoumaných polymorfismů je jednonukleotidový polymorfismus genu *ATM* D1853N (5557G>A). Přítomnost této alelické varianty může u svých nositelů zvyšovat radiosenzitivitu a významně zvyšuje incidenci nežádoucích účinků po prodělané radioterapii (Cesaretti et al. 2004; Andreassen et al. 2006).

8 Gen *TGFβ1*- transforming growth factor β1 gen

8.1 Lokalizace genu, zařazení do proteinové rodiny a funkce

TGFβ1 gen je lokalizován na dlouhém raménku 19. chromozómu (19q13.1-2). Proteinovým produktem tohoto genu je člen transforming growth factor β cytokinové rodiny (která u savců zahrnuje 3 isoformy TGFB 1,2,3), jejíž multifunkční peptidy regulují proliferaci, diferenciaci, adhezi a migraci různých typů buněk (Massagué et al. 2000). Jejich signální cesty jsou velmi složité a začínají navázáním některého z TGFB cytokinu na TGFB receptor II, který je zabudován v buněčné membráně. Ten následně fosforyluje receptor TGFB I, který dále aktivuje různé typy SMAD molekul. Ty se potom hromadí v buněčném jádře a působí zde jako transkripční faktory cílových genů. Kromě výše popsaných dějů je tak tato cytokinová rodina zapojena i do embryogeneze, angiogeneze, imunitních reakcí (zánět, fibróza) a také do tumorigeneze (Derynck et al. 2007). První zmínka o genu *TGFβ1* pochází z roku 1985, kdy byl tento gen lokalizován pomocí in situ hybridizace (Fujii et al. 1985). V následujících letech proběhla celá řada studií, které se zabývaly funkcí tohoto genu a poukázaly na jeho úlohu při růstu a diferenciaci embryonálních tkání. Dále byl prokázán

význam TGFB cytokinů v tumorigenezi a progresi nádorového růstu. Jako nejvíce upregulovaný gen u nádorových buněk, byl popsán právě gen *TGFβ1*. Ten se pak v následujících letech stal předmětem řady studií zkoumajících jeho úlohu v rozvoji nádorových onemocnění. Samotné poškození signálních cest TGFB cytokinů, může vést u buněk k získání hlavních znaků malignity- selhání odpovědi k inhibitorům buněčného růstu, proliferace s absencí exogenních signálů, invazivita, metastatický potenciál, immortalita, ztráta apoptózy, angiogeneze a schopnost vyhnout se kontrole imunitního systému (Elliot et al. 2005).

Důležitou úlohu v normálních tkáních hrají cytokiny TGFB především při hojení jejich poškození. Opět hlavní úlohu v těchto procesech hraje TGFB1. Tento cytokin je produkován v biologicky inertní formě a většinou je spojen s peptidem v malý latentní komplex, který je vylučován buňkami do cytoplazmy. K aktivaci tohoto komplexu může dojít různými cestami zahrnujícími expozici proteázám, integrinům a volným radikálům (Lawrence et al. 1991). Nejvyšší koncentrace tohoto cytokinu je v krevních destičkách, které jej v hojném množství secernují do okolí v místě poraněné tkáně. Mezi jeho hlavní aktivity v hojivém procesu patří nalákání makrofágů a monocytů do místa poškození, inhibice proliferace epiteliálních buněk, posílení maturace fibroblastů ve fibrocyty, což zvyšuje produkci fibrotické tkáně. Dále posiluje angiogenezi a inhibuje rozpadání extracelulární matrix (Hakenjos et al. 2000). Vzhledem k této hojivé funkci, která vede v konečném výsledku k zahojení rány fibrózní jizvou, může nadměrná sekrece tohoto cytokinu vést k rozvoji fibrotizace tkání. Potvrzeno to bylo u celé řady chronických onemocnění charakterizovaných excesivní fibrózou- chronické hepatitidy či glomerulosklerózy. V takto postižených orgánech byla odhalena zvýšená exprese *TGFβ1* genu (Thsushima et al. 1999).

Podobně jako je tomu po mechanickém poškození tkáně, dochází k vyvolání stejného procesu hojení i po poškození ionizujícím zářením. Zvýšená exprese *TGFβ1* byla prokázána na krysích modelech ve tkáních, které byly vystaveny ionizujícímu záření (Ansher et al. 1990). Zároveň byla popsána, v závislosti na dávce ionizujícího záření, zvýšená exprese a aktivace *TGFβ1* signálních cest vedoucí k rozvoji fibroprodukce v ozářených tkáních (Franko et al. 1997). Vzhledem k těmto popsaným asociacím zvýšené tkáňové exprese *TGFβ1* s poléčebně vzniklou fibrózou, lze říci že TGFB1 hraje dominantní roli v rozvoji poléčebných komplikací ve smyslu fibrotických změn, které jsou podkladem zhoršené funkce těchto orgánů. Mutace vedoucí ke ztrátě funkce *TGFβ1* genu jsou u zvířat prokazatelně letální, nicméně pokud dojde k poškození pouze jedné molekuly v TGFB signální cestě, je tato genetická modifikace slučitelná se životem a v některých případech může mít za následek i radioresistenci tkání vůči poškození ionizujícím zářením (Flander et al. 2002). U lidí bylo zase odhaleno, že u nich existuje velká interindividuální variabilita v nositelství jednonukleotidových polymorfismů genu *TGFβ1*, které jsou asociovány se zvýšeným rizikem rozvoje tkáňového poškození ionizujícím zářením i jinými faktory (Peters et al. 2008)

8.2 Polymorfismy genu *TGFβ1* a postiradiční nežádoucí reakce

Radioterapie zůstává stále základním kamenem managementu léčby více jak poloviny zjištěných solidních tumorů. Bohužel i přes své možnosti, radiací indukované poškození okolních zdravých tkání je limitujícím faktorem. V průběhu poslední dekády udělala věda v oblasti radiobiologie významný pokrok při hledání vhodných analýz v predikci pozdních účinků radioterapie na zdravé tkáně. Je zde rostoucí podezření, že riziko poškození zdravých tkání po prodělané radioterapii, je ovlivňováno nejčastěji se vyskytující genetickou odchylkou – jednonukleotidovými polymorfismy (SNPs- single nucleotide polymorphisms) různých genů. Mezi nejvíce studované polymorfismy, ve vztahu k pozdním komplikacím po radioterapii, jsou právě SNPs genu *TGFβ1*. Některé polymorfismy genu *TGFβ1* byly shledány jako příčina zvýšené hladiny cirkulujícího TGFB1 cytokinu v plasmě, což vedlo u

zkoumaných skupin pacientů ke zvýšenému riziku rozvoje poradiační fibrózy. K nejvíce zkoumaným patří především polymorfismy- 509 T>C, Arg25Pro a Pro10Leu. Jsou tak logickými kandidáty k prozkoumání jejich významu v rozvoji pozdních účinků radioterapie. Prozatím proběhlé studie, ale podávají sporné výsledky, a to hlavně kvůli malému počtu vyšetřovaných pacientů.

9 Cíle disertační práce

- 1) Nalezení vhodných molekulárně biologických metod k vyšetření přítomnosti jednotlivých polymorfismů genu *ATM* a *TGFβ1*
- 2) Prokázat asociaci mezi výskytem pozdních účinků po prodělané radioterapii u pacientek s pokročilým tumorem děložního čípku a přítomností polymorfismu genu *ATM* D1853N (5557G>A)
- 3) Prokázat asociaci mezi výskytem pozdních účinků po prodělané radioterapii u pacientek s pokročilým tumorem děložního čípku a přítomností polymorfismů -1552del AGG, -800G>A, -509c>T a L10P *TGFβ1* genu

10 Soubor nemocných, vyšetřovací metody

10.1 Pacienti

Naše studie zahrnovala 55 pacientek s lokálně pokročilým karcinomem děložního čípku (tedy od stádia FIGO IIB a vyšším). Tyto pacientky byly v letech 2001-2010 léčeny chemoradioterapií na Klinice Onkologie a Radioterapie ve Fakultní nemocnici Hradec Králové. Vstupních kritéria pro zařazení byla- 1) diagnóza karcinom děložního čípku, klinické stádium FIGO IIB a výše; 2) absolvovaná léčba chemoradioterapií; 3) follow up delší než 6 měsíců. Shrnutí dalších důležitých charakteristik je popsáno v tabulce č. 3. Zařazovány byly pacientky tak, jak přicházely na ambulantní kontroly. Každá pacientka podepsala informovaný souhlas s odběrem krve, s vyšetřením a následným uchováním jejich DNA. Studie byla schválena etickou komisí.

Tabulka č. 3: Základní charakteristiky studované skupiny pacientek

Proměnné		Proměnné	Počet (n)
Věk (mean)	47 let (31; 74)	RT dávka na pánev	
Follow up (mean)	6 let (1; 10)	46/48.6 Gy	14
PS WHO	Počet (n)	50 Gy	41
0	35	RT dávka na parametria	
1	17	14 Gy	28
2	1	9 Gy	12
3	2	RT paraaortálních uzlin	28

Histopatologie		BRT dávky	
Spinocelulární karcinom	53	24 Gy	41
Adenocarcinom	2	28/30 Gy	14
Grading		Chemoterapie	55
1	8	Cisplatina	45
2	32	Paclitaxel	10
3	15		
FIGO IIB	26		
FIGO IIIB	29		

10.2 Léčba a sledování

Všechny pacientky podstoupily léčbu chemoradioterapii, která zahrnovala kombinaci zevní radioterapie, brachyterapie a konkomitantní chemoterapii. Zevní radioterapie byla aplikována na pánev BOX technikou (ozařování pánve ze 4 polí) s parametriálním boostem, v některých případech byly zahrnuty do ozařovaného pole i společné ilické uzliny a paraaortální uzliny. V průběhu zevní radioterapie, nebo po jejím skončení pacientky podstoupily intrauterinní brachyterapii pomocí Fletcherova tříkanálového aplikátoru. Dávka záření byla aplikována do bodu A a dávky na body v rektu a močovém měchýři byly plánovány dle International Commission of Radiation Units and Measurements (ICRU) 38. U většiny pacientek (45) probíhala konkomitantní chemoterapie, weekly cisplatinou v dávce 40mg/m², současně se zevní radioterapií. U pacientek s nevyhovujícími renálními parametry byla cisplatina zaměněna za weekly paclitaxel v dávce 50mg/m². Vzhledem k individuálnímu celkovému stavu každé pacientky (věk, renální parametry) a vzhledem ke změnám protokolu léčby, ne všechny pacientky dostaly stejnou dávku při radioterapii a stejný typ chemoterapie (viz. tabulka č. 3). Léčebné parametry byly zahrnuty do statistického hodnocení.

V prvních dvou letech od ukončení terapie byly všechny pacientky sledovány v 3 měsíčních intervalech, následně v intervalech 6 měsíčních do 5. roku od ukončení léčby a poté již jen jednou za rok. Při každé kontrole bylo u pacientky provedeno gynekologické vyšetření, CT vyšetření břicha 1x za 6 měsíců a po uplynutí 5 let pouze 1x za rok a RTG hrudníku 1x ročně. Pokud se vyskytly komplikace, byly potom návštěvy v ambulanci četnější.

U pacientek, u kterých došlo k rozvoji pozdních nežádoucích účinků po radioterapii, jsme stanovili jejich stupeň dle Radiation Therapy Oncology group/European Organisation for Research and Treatment of Cancer (RTOG/EORTC) kritérií. Následně jsme pacientky rozdělily do tří skupin: skupina bez komplikací (skupina 1, n=13), skupina s komplikacemi grade I-II (skupina 2, n=20) a skupina s komplikacemi grade III-IV (skupina 3, n=22). Jako komplikace grade I-II byly považovány proktitida a cystitida, za komplikace grade III-IV potom významné krvácení, střevní obstrukce, vytvoření rektovaginální či vezikovaginální píštěle, nebo střevní perforace.

10.3 Vyšetřovací metody- DNA analýza jednotlivých polymorfismů

Od každé pacientky byly v rámci vstupní návštěvy odebrány 2 zkumavky nesrážlivé venózní krve (EDTA). Následně byla z 200 µl této krve extrahována DNA z periferních lymfocytů pomocí micrcolumn procedury (QIAamp Blood Mini Kit, Qiagen, Germany). Následně po odběrech od prvních 20 pacientek a 100 zdravých dobrovolníků bylo provedeno ověření vhodných molekulárně biologických vyšetřovacích metod, které byly dále použity k analýze zbylých 55 vzorků.

Po izolaci DNA následovaly PCR reakce v oblasti genu *ATM* a *TGFβ1*, které byly vykonány pomocí přístroje thermocycler ABI 2720 (Applied Biosystems, USA). Nepřítomnost 5557G>A alely byla potvrzena DNA sekvenováním. Následkem toho byla odhalena cílová mutace v oblasti codonu 1853. Tento třístupňový proces zahrnuje dvě nezávislé amplifikační reakce (PCR I a PCR II) při kterých je vložen adenin namísto guaninu do kódujícího řetězce a tymin do nekódující části řetězce DNA. Poslední PCR (PCR III) nakonec spojí oba semi-produkty dohromady. Nukleotidové sekvence ve finálním produktu byly detekovány pomocí DNA sekvenování.

PCR- RFLP (restriction fragment length polymorphism analysis) byla užita především k analýze polymorfního místa 5557G>A *ATM* genu, dále polymorfismů -800G>A a -509C>T genu *TGFβ1*. Teplotní profil a skladba reakční směsi pro PCR byla podobná jako u výše popsaných PCR reakcí s výjimkou sekvencí primerů, které se lišily dle typu polymorfismu.

Proces DNA sekvenování byl zahájen tak, že byly purifikovány PCR produkty pomocí QIAquick PCR Purification KIT (Qiagen) a jejich nukleotidové sekvence byly určeny v obou směrech pomocí BigDye Terminator v 3.1. Cycle Sequencing Kit in Genetic Analyser 3130 (Applied Biosystems) dle instrukcí výrobce. Polymorfismus -1552del AGG v oblasti promotoru *TGFβ1* genu byl vyšetřen fragmentační analýzou na ABI 3130 genetickém analyzátoru (Applied Biosystems, USA). K analýze polymorfismu L10P TGFβ1 genu, bylo užito přímé sekvenování ampliconů.

10.4 Statistická analýza

Statistické zpracování dat proběhlo na Institutu Biostatistiky a Analýz Masarykovy univerzity v Brně. Základní popisná statistika byla užita k analýze mediánu, průměru a 95% interval spolehlivosti pro spojitá data a absolutní a relativní frekvence pro kategorická data. K porovnání rozdílů mezi definovanými skupinami pacientek podle výskytu komplikací po prodělané radioterapii, bylo užito- Mann-Whitney U test (spojité parametry), Fisher's exact test (binární proměnné) a exact Monte Carlo test (multinominální proměnné)- ten byl užit pro kategorické parametry.

Odds ratio s 95% limity spolehlivosti bylo užito k popisu vztahu mezi výskytem jednotlivých genetických markerů a stupněm komplikací. Bonferroniho korekce pro mnohočetná srovnání byla použita v těch případech, kde to bylo vhodné. P- hodnoty byly znásobeny 7krát (to je počet analyzovaných genetických markerů), p-hodnota u TRIPLE *TGFβ1* markeru byla znásobena 3krát, protože obsahoval 3 genetické markery.

Logistická regrese byla použita k analýze vztahu mezi základními charakteristikami u pacientek, nebo pro analýzu vztahu genetických markerů k výskytu jednotlivých stupňů pozdních komplikací. Modely byly počítány oba- jak univarietní pro všechny prediktory (markery), tak multivarietní pro vyselektované markery, které dosáhly $p < 0,05$ v univarietní analýze.

Odchyly genotypové distribuce v populaci od Hardy-Weinbergovy rovnováhy byly testovány na skupině zdravých dobrovolníků (kteří sloužili již k validaci molekulárně biologických metod) pomocí exact testu na softwaru Plink 1.07. Skupina zdravých dobrovolníků koresponduje s Hardy- Weinbergovou rovnováhou ve všech zjišťovaných markerech. Analýzy byly prováděny v SPSS Statistics 19 (IBM, USA).

11 Výsledky

Univarietní a multivarietní analýza s užitím logistického regresního modelu viz.tab. č. 4

Po provedení univariétní analýzy, která porovnávala základní charakteristiky a genetické markery s výskytem pozdních komplikací, se jako statisticky signifikantní v předpovědi chronické toxicity III-IV stupně jeví tyto parametry: 1) zevní radioterapie pánve v dávce 50/60Gy s $p=0,003$; 2) zevní radioterapie parametří v dávce 14Gy s $p=0,002$; 3) zevní radioterapie paraaortálních lymfatických uzlin s hraniční hodnotou $p=0,044$; z genetických markerů je to 4) nositelství homozygotní varianty polymorfismu -1552 genu *TGFβ1* s $p=0,020$; 5) nositelství homozygotní varianty polymorfismu -L10P genu *TGFβ1* s $p=0,037$ a poslední 6) homozygotní nositelství kombinovaného genotypu TRIPLE *TGFβ1* genu s $p=0,10$.

Podobně je tomu i v predikci pozdní toxicity kteréhokoli stupně (grade I-IV) zde jako statisticky signifikantní vychází tyto parametry: 1) zevní radioterapie pánve v dávce 50/60Gy s $p=0,002$; 2) zevní radioterapie parametří v dávce 14Gy s $p=0,002$; 3) zevní radioterapie paraaortálních lymfatických uzlin s hodnotou $p=0,029$; z genetických markerů je to 4) nositelství homozygotní varianty polymorfismu -1552 genu *TGFβ1* s $p=0,012$; a poslední 5) homozygotní nositelství kombinovaného genotypu TRIPLE *TGFβ1* genu s $p=0,12$. Statistická významnost asociace mezi polymorfismy a pozdní toxicitou radioterapie byla také potvrzena vypočtením ϕ -koeficientu (ϕ).

V multivariétní analýze z klinických charakteristik obstálo pouze ozáření parametří v dávce 14Gy jako statisticky významný faktor v rozvoji pozdních postiradiačních komplikací jak stupně III-IV ($p=0,006$), tak stupně I-IV ($p=0,004$). Z genetických markerů multivariétní analýzou prošel, jako statisticky významný rizikový faktor pouze homozygotní genotyp TRIPLE *TGFβ1* genu a to jak v předpovědi komplikací III-IV stupně ($p=0,021$), tak v předpovědi komplikací kteréhokoli stupně ($p=0,12$).

Tabulka č. 4. Predikce pozdních komplikací – univariétní a multivariétní logistický regresní model

	Grade III–IV komplikace vs. bez komplikací ¹			Grade I-IVkomplikace vs. bez komplikací ¹		
	OR (95% CI)	<i>p</i> uni	multi	OR (95% CI)	<i>p</i> uni	<i>p</i> multi
Věk při léčbě (roky)	1.018 (0.944;1.099)	0.643		0.993 (0.929;1.060)	0.826	
Věková kategorie 41–50 ²	1.350 (0.211;8.617)	0.751		0.700 (0.138;3.558)	0.667	
Věková kategorie >50 ²	1.350 (0.211;8.617)	0.751		0.800 (0.159;4.023)	0.787	
BMI	1.014 (0.876;1.172)	0.856		0.988 (0.874;1.117)	0.848	
BMI kategorie ≤24.9 ³	1.806 (0.391;8.348)	0.449		1.970 (0.495;7.832)	0.336	
BMI kategorie >29.9 ³	1.250 (0.146;10.699)	0.839		1.136 (0.162;7.995)	0.898	
EBRT pánve 50/60 Gy ⁴	33.600 (3.381;333.885)	0.003		9.600 (2.338;39.423)	0.002	
EBRT parametria 14 Gy ⁵	14.250 (2.619;77.542)	0.002	0.006	9.562 (2.341;39.060)	0.002	0.004
EBRT PALU	4.815 (1.027;22.571)	0.046		4.902 (1.173;20.479)	0.029	
CHT CDDP	0.833 (0.068;10.202)	0.887		1.667 (0.139;20.014)	0.687	

CHT paclitaxel	1.618 (0.266;9.852)	0.602		1.294 (0.238;7.028)	0.765	
TGFβ1 -1552⁷ homozygot⁸	5.988 (1.332;27.027)	0.020		5.618 (1.451;21.739) (φ = 0.356; p=0.008)	0.012	
TGFβ1 10 homozygot⁸	4.831 (1.096;21.277)	0.037		3.650 (0.964;13.889) (φ = 0.266; p=0.049)	0.056	
TGFβ1 TRIPLE⁹ homozygot⁸	7.634 (1.634;35.714)	0.010	0.021	7.194 (1.821;28.571) (φ = 0.406; p=0.003)	0.005	0.012

¹Odds ratio (OR, zastoupeno 95% intervalem spolehlivosti) pro univariální (p uni) model založený na logistické regresi; multivariální (p multi) regrese založená na zpětném postupně selektujícím algoritmu.

²Referenční kategorie je ≤40 let.

³Referenční kategorie je BMI 25–29.9.

⁴Referenční kategorie je 46/48.6 Gy; EBRT pánve 50/60 Gy is identická s BRT 18/24 Gy s referenční kategorií BRT 28/30 Gy (pacientky které podstoupily EBRT pánve 50/60 Gy take podstoupily BRT 18/24 Gy).

⁵Referenční kategorie je 9 Gy EBRT na parametria.

⁷TGFβ1 -1552 je stejné jako TGFβ1 -509 polymorphism .

⁸Referenční kategorie jsou uskupení heterozygotů.

⁹TGFβ1 triple je stejné jako TGFβ1 double genotypes.

BMI = body mass index

CHT = chemoterapie

EBRT- externa beam radiotherapy (zevní radioterapie)

PALU – EBRT paraaortálních lymfatických uzlin

12 Diskuze a závěr

Reakce zdravých tkání na ozáření je velmi podobná hojení např. po mechanickém poškození, jak je uvedeno výše. Avšak v případě iradiace vstupují tkáně do cyklu dějů zahrnujících hypoxii, angiogenezi, buněčnou smrt, proliferaci a infiltraci makrofágy. Ve výsledku vede tento proces k totální přestavbě původní tkáně, přičemž tato je nahrazena převážně kolagenem s pozůstatkem pouze několika buněčných elementů (Asher et al. 2005). U gynekologických nádorových onemocnění po prodělané radioterapii bývá rektum a močový měchýř, pro svou těsnou komunikaci s gynekologickými orgány, nejvíce poškozenou oblastí. Nejčastěji se vyskytující pozdní komplikace zahrnují zvýšenou frekvenci močení a stolice, drobné i silnější krvácení, částečnou inkontinenci moči či stolice. Fibróza a ischemie v oblasti submukózy a muscularis mucosae jsou převážně zodpovědné za tyto pozdní účinky ve spolupráci s dalšími vaskulárními abnormalitami, kolagenovou depozicí a abnormálními fibroblasty (Stone et al. 2003, Coia et al. 1995). Jak vyplývá z dříve publikovaného, zdá se být cytokin TGFB1 hlavním mediátorem procesu fibrogenese a počtu dalších patogenetických procesů, které se podílejí na tkáňové odpovědi na ozáření. Nicméně jak můžeme vidět z výsledků předchozích prací i z výsledků práce naší, nelze pouze tento cytokin ani mutace jeho kódujícího genu označit za jedinou příčinu rozvoje pozdních nežádoucích účinků po prodělané léčbě RT. V rámci naší studie byl také vyšetřen nejvíce v souvislosti s vyšší radiosenzitivitou publikovaný polymorfismus genu *ATM* 5557G>A. Mutace tohoto genu jsou příčinou insuficientní funkce jeho genového produktu (*ATM* kinázy), což vede ke genomové nestabilitě, ztrátě schopnosti reparability DSB zlomů DNA a zvýšené radiosenzitivě (Gatti et al. 2001).

V rámci naší studie jsme se pokusili prokázat možnou asociaci klinických parametrů (dávky ionizujícího záření, věk, BMI, typ chemoterapie) a kandidátských polymorfismů genů (*ATM* -5557G>A; - 1552del AGG, - 509C>T, - 800G>A a L10P polymorfismus genu *TGFβ1*) s rizikem vzniku pozdních komplikací na přežívající skupině pacientek léčených radikální chemoradioterapií pro inoperabilní stadium karcinomu děložního čípku. Kvůli nízkému

výskytu alelických variant polymorfismu -800G>A *TGFβ1* genu (šest heterozygotů, žádný homozygot) ve zkoumaném souboru pacientek, jsme se rozhodli jej vynechat ve statistické analýze.

I přesto, že chemoterapie samotná indukuje objemné poškození DNA následované aktivací tkáňové odpovědi, ve které hrají *ATM* i *TGFβ1* významnou roli (Woods et al. 2013) a zároveň se předpokládá, že zvyšuje radiosenzitivitu tkání mutagenním účinkem na geny zodpovědné za reparaci ionizujícím zářením poškozené DNA, se nám nepodařilo prokázat její statisticky signifikantní vliv na rozvoj pozdních komplikací.

Jak bylo výše uvedeno, polymorfismus genu *ATM* 5557G>A byl předmětem již řady studií, které zkoumaly jeho význam v rozvoji pozdních komplikací po prodělané radioterapii. Nicméně výsledky těchto prací jsou rozporuplné. Studie Andreassena et al. roku 2006, prokázala signifikantní asociaci mezi hetero- i homozygotním nositelstvím tohoto polymorfismu a rozvojem podkožní fibrózy po radioterapii u pacientek s karcinomem prsu. Naopak negativní výsledky, co se genu *ATM* týká, publikoval v roce 2006 Damarju et al., který do své studie zahrnul 83 pacientů léčených radioterapií pro karcinom prostaty. Také v našem projektu se nepovedlo prokázat, že polymorfismus 5557G>A je signifikantním prediktivním faktorem chronické toxicity radioterapie.

Z předchozího textu vyplývá, že fibróza hraje důležitou úlohu v rozvoji pozdních komplikací po radioterapii. Četné studie zabývající se tímto procesem shledávají TGFB1 cytokin za klíčový mediátor v odpovědi na poškození tkání ionizujícím zářením. Celá řada prací zabývající se asociací mezi zvýšenými plazmatickými hladinami TGFB1 cytokinu u pacientů s nádorovým onemocněním a rozvojem závažné radioterapií indukované fibrózy také demonstrovala účast *TGFβ1* genu a jeho polymorfismů na klinické radiosenzitivitě.

Polymorfismy genu *TGFβ1* a jejich významem v rozvoji pozdních komplikací po léčbě se, u 78 pacientek léčených radioterapií pro karcinom děložního čípku a děložního těla, zabýval i De Ruyck et al., ve své práci z roku 2006. Důvodem k testování polymorfismů tohoto genu byl jejich možný vliv na genetickou kontrolu plazmatických hladin TGFB1 cytokinu.

Polymorfismy – 1552del AGG, - 509C>T, a – 800G>A jsou umístěny na 5' konci promotorové oblasti *TGFβ1* genu a mohou mít tak vliv na produkci cytokinu. Dále oba polymorfismy L10P, R25P jsou lokalizovány v signální sekvenci, která je zodpovědná za export nově syntetizovaného proteinu skrze membránu endoplazmatického retikula. Polymorfismus T263I je zase pravděpodobně zahrnut do stability a aktivity proteinu. Tato studie poukazuje na to, že homozygotní nosiči SNPs – 509C>T, - 1552delAGG a L10P mohou mít zvýšené riziko rozvoje pozdních komplikací po RT pánve. Vyskytovalo se u nich 2,4 krát vyšší riziko střední závažné reakce po radioterapii ($p=0,347$) a 3,6 krát vyšší riziko rozvoje závažných reakcí ($p=0,260$). Nicméně ač slibné, jsou tyto výsledky statisticky nevýznamné.

V naší práci homozygotní nositelé polymorfismů - 509C>T, - 1552delAGG a L10P měli signifikantně vyšší riziko rozvoje komplikací III-IV stupně i jakéhokoli stupně v univariétní analýze, nicméně jako samostatné predikory neprošly multivariétní analýzou. Na druhé straně, složená homozygotní kombinace těchto polymorfismů Triple homozygot (- 509C>T, 1552delAGG a L10P) byla signifikantně asociována s vyšším výskytem pozdních komplikací III-IV stupně, tak I-IV stupně v univariétním tak multivariétním modelu logistické regrese. V naší studii je na rozdíl od studie De Ruycka (14%), větší procentuální zastoupení pacientek s komplikacemi po radioterapii (40%). Vysvětlením může být fakt, že pacientky s komplikacemi přicházejí na kontroly v častějších intervalech, proto byl do studie zařazen jejich větší počet.

Cílem naší studie bylo prokázat signifikantní vztah mezi výskytem polymorfismů genů *ATM* a *TGFβ1* a rozvojem pozdních komplikací po prodělané chemoradioterapii u 55

pacientek léčených pro pokročilý karcinom děložního čípku. Dalším cílem bylo validovat vhodné molekulárně biologické metody sloužící k rychlé analýze těchto polymorfismů.

Jak vyplývá z výše popsaných výsledků, nebyla prokázána statisticky významná asociace mezi jednotlivými námi testovanými polymorfismy a pozdní toxicitou chemoradioterapie a to jak v homozygotní formě, tak i předpokládané heterozygotní formě. Jakmile jsme ale seskupili polymorfismy genu *TGFβ1* do tzv. compound (složených) haplotypů, povedlo se nám prokázat statisticky signifikantní asociaci mezi složeným homozygotním haplotypem -1552delAGG/- 509C>T/L10P *TGFβ1* genu s pozdními postiradiačními komplikacemi jak III-IV stupně, tak jakéhokoli stupně. Zároveň se podařilo vyvinout a ověřit vhodné laboratorní metody ke stanovení jednotlivých polymorfismů genu *ATM* a *TGFβ1*.

Negativní výsledky naší práce stran korelace pozdní toxicity radioterapie s jednotlivými jednonukleotidovými polymorfismy jsou v souladu s recentními studiemi. Zjištěná asociace mezi složeným homozygotním haplotypem -1552delAGG/- 509C>T/L10P *TGFβ1* genu a pozdními komplikacemi po léčbě u pacientek s karcinomem děložního čípku je jedním z malých kroků kupředu v porozumění multifaktoriálnímu procesu rozvoje pozdních tkáňových změn po ozáření. Může být ale užitečným vodítkem pro budoucí výzkum vztahu mezi polymorfismy a tkáňovou radiosenzitivitou. Jak se dle našich výsledků zdá, bude užitečnější místo samotných polymorfismů testovat v tomto vztahu haplotypy či genotypy složené z polymorfismů vhodných kandidátských genů.

13 Použitá literatura:

ANDREASSEN, C. N., J. ALSNER, M. OVERGAARD, F. B. SØRENSEN a J. OVERGAARD. Risk of radiation-induced subcutaneous fibrosis in relation to single nucleotide polymorphisms in *TGFB1*, *SOD2*, *XRCC1*, *XRCC3*, *APEX* and *ATM*; a study based on DNA from formalin fixed paraffin embedded tissue samples. *International Journal of Radiation Biology*. 2006, vol. 82, issue 8, s. 577-586. DOI: 10.1080/09553000600876637.

ANSCHER MS, CROCKER IR a JIRTLE RL. Transforming growth factor-beta 1 expression in irradiated liver. *Radiat Res*. 1990;122:77-85.

ANSCHER, Mitchell S., Liguang CHEN, Zahid RABBANI, Song KANG, Nicole LARRIER, Hong HUANG, Thaddeus V. SAMULSKI, Mark W. DEWHIRST, David M. BRIZEL, Rodney J. FOLZ a Zeljko VUJASKOVIC. Recent progress in defining mechanisms and potential targets for prevention of normal tissue injury after radiation therapy. *International Journal of Radiation Oncology Biology Physics*. 2005, vol. 62, issue 1, s. 255-259. DOI: 10.1016/j.ijrobp.2005.01.040.

BERÁNEK M, DRASTÍKOVÁ M, PAULÍKOVÁ S, SIRÁK I, VOSMIK M a PETERA J. Analysis of D1853N *ATM* polymorphism in radiosensitive patients with cervical carcinoma. *Acta Medica (Hradec Kralove)*. 2011;54(3):111-6.

BODER E. Ataxia-telangiectasia: an overview. *Kroc Found Ser*. 1985;19:1-63.

BURMA, Sandeep, Benjamin P.C. CHEN a David J. CHEN. Role of non-homologous end joining (NHEJ) in maintaining genomic integrity. *DNA Repair*. 2006, vol. 5, 9-10, s. 1042-1048. DOI: 10.1016/j.dnarep.2006.05.026.

CAVACIUTI, E., A. LAUG, N. JANIN, K. OSSIAN, J. HALL, D. STOPPA-LYONNET a N. ANDRIEU. Cancer risk according to type and location of ATM mutation in ataxia-telangiectasia families. *Genes, Chromosomes and Cancer*. 2005, vol. 42, issue 1, s. 1-9. DOI: 10.1002/gcc.20101.

CESARETTI, J, R STOCK, D ATENCIO, J BERNSTEIN, N STONE, S WALLENSTEIN, G SHERYL, K LOEB, M KOLLMEIER a M SMITH. Atm sequence variants are predictive of adverse radiotherapy response among patients treated for prostate cancer. *International Journal of Radiation Oncology Biology Physics*. 2004, vol. 60, S325-S325. DOI: 10.1016/s0360-3016(04)01448-8.

CIBULA, D. - PETRUŽELKA, L. a KOLEKTIV. *Onkogynekologie*. Praha 2009, Grada Publishing. ISBN 978-80-247-2665-6.

COIA LR, R.J. MYERSON a J.E. TEPPER. Late effects of radiation therapy on the gastrointestinal tract. *Int J Radiat Oncol Biol Phys*. 1995 Mar 30;31(5):1213-36.

DAVIS, A. J. a D. J. CHEN. DNA double strand break repair via non-homologous end-joining. *Transl Cancer Res*. Jun 2013; 2(3): 130–143. doi: 10.3978/j.issn.2218-676X.2013.04.02.

DERYNCK, Rik a Rosemary J. AKHURST. Differentiation plasticity regulated by TGF- β family proteins in development and disease. *Nature Cell Biology*. 2007, vol. 9, issue 9, s. 1000-1004. DOI: 10.1038/ncb434.

ELLIOTT RL a BLOBE GC. Role of transforming growth factor Beta in human cancer. *J Clin Oncol*. 2005 Mar 20; 23(9):2078-93.

FELTL, D. a CVEK, J. *Klinická Radiobiologie*. Havlíčkův Brod 2008, Tobiáš nakladatelství. ISBN 978-80-7311-103-8.

FLANDERS, Kathleen C., Catherine D. SULLIVAN, Makiko FUJII, Anastasia SOWERS, Mario A. ANZANO, Alidad ARABSHAHI, Christopher MAJOR, Chuxia DENG, Angelo RUSSO, James B. MITCHELL a Anita B. ROBERTS. Mice Lacking Smad3 Are Protected Against Cutaneous Injury Induced by Ionizing Radiation. *The American Journal of Pathology*. 2002, vol. 160, issue 3, s. 1057-1068. DOI: 10.1016/s0002-9440(10)64926-7.

FOROUD, T, S WEI S, Y ZIV, E SOBEL, E LANGE, A CHAO, T GORADIA, Y HUO, A TOLUN, L CHESSA, P CHARMLEY, O SANAL, N SALMAN, C JULIER, P CONCANNON, C MCCONVILLE, AM TAYLOR, Y SHILOH, SK LANGE a RA GATTI. Localization of an ataxia-telangiectasia locus to a 3-cM interval on chromosome 11q23: linkage analysis of 111 families by an international consortium. *Am J Hum Genet*. 1991 Dec;49(6):1263-79.

FRANKO, Allan J., Janet SHARPLIN, Aziz GHAHARY a Mary Helen BARCELLOS-HOFF. Immunohistochemical Localization of Transforming Growth Factor β and Tumor Necrosis Factor α in the Lungs of Fibrosis-Prone and "Non-Fibrosing" Mice during the Latent Period and Early Phase after Irradiation. *Radiation Research*. 1997, vol. 147, issue 2. DOI: 10.2307/3579426.

FUJII, David, Jane E. BRISSENDEN, Rik DERYNCK a Uta FRANCKE. Transforming growth factor β gene maps to human chromosome 19 long arm and to mouse chromosome 7. *Somatic Cell and Molecular Genetics*. 1986, vol. 12, issue 3, s. 281-288. DOI: 10.1007/bf01570787.

GATTI, Richard A. The Inherited Basis of Human Radiosensitivity. *Acta Oncologica*. 2001, vol. 40, issue 6, s. 702-711. DOI: 10.1080/02841860152619115.

HAKENJOS, L., M. BAMBERG a H. P. RODEMAN. TGF-beta1-mediated alterations of rat lung fibroblast differentiation resulting in the radiation-induced fibrotic phenotype. *International Journal of Radiation Biology*. 2000, vol. 76, issue 4, s. 503-509. DOI: 10.1080/095530000138501.

CHISTIYAKOV, Dimitry A., Natalia V. VORONOVA, Pavel A. CHISTIYAKOV, Ravindran ANKATHIL, David MURRAY a Matthew PARLIAMENT. Genetic variations in DNA repair genes, radiosensitivity to cancer and susceptibility to acute tissue reactions in radiotherapy-treated cancer patients. *Acta Oncologica*. 2008, vol. 47, issue 5, s. 75-128. DOI: 10.1007/978-1-4614-4741-2_4.

CHUN, Helen H a Richard A GATTI. Ataxia-telangiectasia, an evolving phenotype. *DNA Repair*. 2004, vol. 3, 8-9, s. 1187-1196. DOI: 10.1007/springerreference_91703.

KHANNA, K. K. Cancer Risk and the ATM Gene: a Continuing Debate. *JNCI Journal of the National Cancer Institute*. 2000, vol. 92, issue 10, s. 795-802. DOI: 10.1093/jnci/92.10.795.

KHANNA, KK, MF LAVIN, SP JACKSON a TD MULHERN. ATM, a central controller of cellular responses to DNA damage. *Cell Death and Differentiation*. 2001, vol. 8, issue 11, s. 1052-1065. DOI: 10.1038/sj.cdd.4400874.

LAVIN MF. Ataxia-telangiectasia: from a rare disorder to a paradigm for cell signalling and cancer. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*. 2008;9(10):759-769.

LAVIN, MF a SHILOH Y. The genetic defect in ataxia-telangiectasia. *Annual Review of Immunology*. 1997;15:177-202.

LAWRENCE D. Identification and activation of latent transforming growth factor β . *Methods Enzymol*. 1991;198:327-336.

MASSAGUÉ, Joan, Stacy W BLAIN, Roger S LO, Jason B. WHEELER, John S. IKONOMIDIS a Jeffrey A. JONES. TGF β Signaling in Growth Control, Cancer, and Heritable Disorders: The Indomitable Role of Transforming Growth Factor-Beta Signaling. *Cell*. 2000, vol. 103, issue 2, s. 107-127. DOI: 10.1007/978-94-007-7893-1_8.

MIRZOEVA, O. K. a J. H. J. PETRINI. DNA Damage-Dependent Nuclear Dynamics of the Mre11 Complex. *Molecular and Cellular Biology*. 2001, vol. 21, issue 1, s. 281-288. DOI: 10.1128/mcb.21.1.281-288.2001.

MISSIRIAN, Victor, Phillip A. CONKLIN, Kevin M. CULLIGAN, Neil D. HUEFNER a Anne B. BRITT. High atomic weight, high-energy radiation (HZE) induces transcriptional responses shared with conventional stresses in addition to a core "DSB" response

specific to clastogenic treatments. *Frontiers in Plant Science* [online]. 2014, vol. 5 [cit. 2014-09-22]. DOI: 10.3389/fpls.2014.00364.

MOUKOVÁ L., NENUTIL R., FABIAN P. a CHOVANEC J. Prognostické faktory karcinomu děložního hrdla. *Klin onkol* 2013; 26(2): 83– 90.

PETERS, Christopher A., Richard G. STOCK, Jamie A. CESARETTI, David P. ATENCIO, Sheila PETERS, Ryan J. BURRI, Nelson N. STONE, Harry OSTRER a Barry S. ROSENSTEIN. TGFB1 Single Nucleotide Polymorphisms Are Associated With Adverse Quality of Life in Prostate Cancer Patients Treated With Radiotherapy. *International Journal of Radiation Oncology Biology Physics*. 2008, vol. 70, issue 3, s. 752-759. DOI: 10.1016/j.ijrobp.2007.05.023.

RELIENE R, BISHOP AJ a SCHIESTL RH. Involvement of homologous recombination in carcinogenesis. *Adv Genet*. 2007;58:67-87.

ROBERTS, S, A SPREADBOROUGH, B BULMAN, J BARBER, D EVANS a D SCOTT. Heritability of Cellular Radiosensitivity: A Marker of Low-Penetrance Predisposition Genes in Breast Cancer. *The American Journal of Human Genetics*. 1999, vol. 65, issue 3, s. 784-794. DOI: 10.1086/302544.

RUYCK, Kim De, Marc Van EIJKEREN, Kathleen CLAES, Klaus BACHER, Anne VRAL, Wilfried De NEVE a Hubert THIERENS. TGFβ1 polymorphisms and late clinical radiosensitivity in patients treated for gynecologic tumors. *International Journal of Radiation Oncology Biology Physics*. 2006, vol. 65, issue 4, s. 1240-1248. DOI: 10.1016/j.ijrobp.2006.03.047.

SANDOVAL N, PLATZER M, ROSENTHAL A, DÖRK T, BENDIX R, SKAWRAN B, STUHRMANN M, WEGNER RD, SPERLING K, BANIN S, SHILOH Y, BAUMER A, BERNTHALER U, SENNEFELDER H, BROHM M, WEBER BH, SCHINDLER D. Characterization of ATM gene mutations in 66 ataxia telangiectasia families. *Hum Mol Genet*. 1999 Jan;8(1):69-79.

SINCLAIR, W. K. a RICHARD A. MORTON. Variations in X-Ray Response during the Division Cycle of Partially Synchronized Chinese Hamster Cells in Culture. *Nature*. 1963, vol. 199, issue 4899, s. 1158-1160. DOI: 10.1038/1991158a0.

STONE HB,C.N. COLEMAN, M.S. ANSCHER a W.H. MCBRIDE. Effects of radiation on normal tissue: consequences and mechanisms. *Lancet Oncol*. 2003 Sep;4(9):529-36.

ŠLAMPA, P. – PETERA, L a KOLEKTIV. *Radiační onkologie*. Praha 2007, Galén nakladatelství. ISBN 978-80-7262-469-0.

TSUSHIMA, Hirofumi, Sumio KAWATA, Shinji TAMURA, Nobuyuki ITO, Yasuhiro SHIRAI, Shinichi KISO, Yoshinori DOI, Akira YAMADA, Osamu OSHIKAWA, Yuji MATSUZAWA, Nobuyuki ITO a Sumio KAWATA. Reduced plasma transforming growth factor-β1 levels in patients with chronic hepatitis C after interferon-α therapy: association with regression of hepatic fibrosis. *Journal of Hepatology*. 1999, vol. 30, issue 1, s. 364-366. DOI: 10.1007/978-4-431-67895-3_70.

UZIEL, T. a Stephen JACKSON. Requirement of the MRN complex for ATM activation by DNA damage. *The EMBO Journal*. 2003, vol. 22, issue 20, s. 5612-5621. DOI: 10.3410/f.1015924.199253.

WEISSBERG, Joseph B, Dong-Dong HUANG, Michael SWIFT>, Amos NORMAN a H. Rodney WITHERS. Radiosensitivity of normal tissues in ataxia-telangiectasia heterozygotes. *International Journal of Radiation Oncology Biology Physics*. 1998, vol. 42, issue 5, s. 137-140. DOI: 10.1007/978-3-642-78278-7_12.

WOODS , D. a J.J. TURCHI. Chemotherapy induced DNA damage response: convergence of drugs and pathways. *Cancer Biol Ther*. 2013 May;14(5):379-89. doi: 10.4161/cbt.23761. Epub 2013 Feb 4.

14 Přehled publikační činnosti autora:

Původní vědecké práce s impact faktorem:

PAULÍKOVÁ, S.- PETERA, J.- SIRÁK, I.- VOŠMIK, M.- DRASTÍKOVÁ, M.- DUŠEK, L.- CVANOVÁ, M.- SOUMAROVÁ, R.-, ŠPAČEK, J.- BERÁNEK, M. ATM and TGFB1 genes polymorphisms in prediction of late complication of chemoradiotherapy in patients with locally advanced cervical cancer. Neoplasma 2014, vol. 61, no. 1: s. 70-76. [IF= 1.574].

BERÁNEK, M.- DRASTÍKOVÁ, M.- SIRÁK, I.- PAULÍKOVÁ, S.- PETERA, J. Využití jednoduplicitárního obousměrného skenování pro genotypizaci TGFβ1 genu. Chemické listy 2013, vol. 107, s. 880-887. [IF= 0,45].

PAULÍKOVÁ, S.- CHMELAŘOVÁ, M.- PETERA, J.- PALIČKA, V.- PAULÍK, A. Hypermethylation of genes RAD51L3 and XRCC2 to predict late toxicity in chemoradiotherapy treated cervical cancer patients. Folia Biologica (Praha), 2013, vol. 59(6), s. 240-5. [IF= 1,219].

PETERA, J.- SIRÁK, I.- TUČEK, L.- HODEK, M.- PALUSKA, P.- KAŠAOVÁ, L.- PAULÍKOVÁ, S.- VOŠMIK, M.- DOLEŽALOVÁ, M.- CVANOVÁ, M.- HALAMKA, M.- LACO, J. Predicting factors for locoregional failure of high-dose-rate brachytherapy for early-stage oral cancer. Personalized Medicine, vol. 9, No. 8, s. 879-887. [IF= 1,132].

Původní práce bez impact faktoru:

BERÁNEK, M.- DRASTÍKOVÁ, M.- PAULÍKOVÁ, S.- SIRÁK, I.- VOŠMIK, M.- PETERA, J. D1853N ATM polymorphism in radiosensitive patients with cervical carcinoma. Acta Medica, 2011, vol. 54, s. 111-116.

Statě ve sbornících:

PAULÍKOVÁ, S.- PETERA, J.- SIRÁK, I.- VOŠMIK, M.- DRASTÍKOVÁ, M.- BERÁNEK, M. Genetická predikce radiosenzitivity a její význam v předpovědi chronické toxicity radioterapie u pacientek léčených pro pokročilý karcinom děložního čípku. Brněnské onkologické dny, Brno, 21-23.4.2011. Abstract In: Edukační sborník. Vydal: Masarykův onkologický ústav v Brně. 2011. s. 201-202. ISBN 978-80-86793-17-7.

PAULÍKOVÁ, S.- BERÁNEK, M.- SIRÁK, I.- DRASTÍKOVÁ, M.- VOŠMIK, M.- PETERA, J. Genetická predikce radiosenzitivity a její význam v předpovědi chronické toxicity radioterapie u pacientek léčených pro karcinom hrdla děložního. 8. konference Společnosti Radiační onkologie, Hradec Králové, 2-3.3.2012. Abstract In: Sborník příspěvků Radiační onkologie. Vydal: Fakultní nemocnice Hradec Králové. 2012. s. 64-66. ISBN 978-80-260-1314-3.

Přehledové práce s impact faktorem:

PETERA, J.- SIRÁK, I.- BERÁNEK, M.- VOŠMIK, M.- DRASTÍKOVÁ, M.- PAULÍKOVÁ, S. Molecular predictive factors of outcome of radiotherapy in cervical cancer. Neoplasma, 2011, vol. 58, s. 469-475. [IF= 1,45].

Přehledové práce bez impact faktoru v recenzovaných časopisech:

PAULÍKOVÁ, S.- PETERA, J.- PAULÍK, A. Metastatické postižení kostí. Postgraduální medicína, 2011, vol.13, no.7, s. 753-759.

PAULÍKOVÁ, S.- PETERA, J.- PAULÍK, A. Systémová léčba osteolýzy indukované nádorem. Acta Medicinæ, 2013, vol. 2, no. 2, s. 66-69.

Posterová sdělení na mezinárodních konferencích:

PAULÍKOVÁ, S.- PETERA, J.- SIRÁK, I.- VOŠMIK, M.- BERÁNEK, M.- DRASTÍKOVÁ, M.- CVANOVA, M.- DUSEK, L.- SOUMAROVA, R. The role of the ATM and TGFBI gene polymorphisms in late toxicity prediction in patient terated with chemoradiotherapy for cervical carcinoma. 14th Biennal Meeting of the International Gynecologic Cancer Society (IGCS), Vancouver, Canada, October 13-16, 2012

Odborné přednášky:

Brněnské onkologické dny, 22. 4. 2011, Brno. Genetická predikce radiosenzitivity a její význam v předpovědi chronické toxicity radioterapie u pacientek léčených pro pokročilý karcinom děložního čípku.

8. konference Společnosti Radiační onkologie, 3. 3. 2012, Hradec Králové. Genetická predikce radiosenzitivity a její význam v předpovědi chronické toxicity radioterapie u pacientek léčených pro karcinom hrdla děložního.

IX. ročník Sympóziium o radiační onkologii, 21. 9. 2012, Nový Jičín. Význam polymorfismů v genech ATM a TGFBI v předpovědi chronické toxicity radioterapie u pacientek léčených pro pokročilý karcinom děložního čípku.