

Ewa Sierko^{1,2}, Marek Wojtukiewicz^{1,2}

¹Klinika Onkologii Uniwersytetu Medycznego w Białymstoku

²Białostockie Centrum Onkologii

Patofizjologiczne podstawy kojarzenia radioterapii z leczeniem ukierunkowanym na hamowanie funkcji receptora czynnika wzrostu naskórka (EGFR)

Pathophysiological basis of combination of radiotherapy and therapy directed to EGFR inhibition

Adres do korespondencji:

Dr med. Ewa Sierko
Klinika Onkologii, Uniwersytet Medyczny
w Białymstoku
Białostockie Centrum Onkologii
ul. Ogrodowa 12, 15-027 Białystok
Tel.: +48 (85) 664 67 34
Faks: +48 (85) 664 67 83
e-mail: ewa.sierko@iq.pl,
mzwojtukiewicz@gmail.com

STRESZCZENIE

Radioterapia odgrywa ważną rolę w leczeniu chorych na nowotwory. Niejednokrotnie jednak obserwuje się niepowodzenia leczenia pod postacią progresji miejscowej i/lub regionalnej. Nadmierna aktywność szlaku przekąźnictwa wewnątrzkomórkowego zależnego od funkcji receptora czynnika wzrostu naskórka (EGFR) przyspiesza progresję nowotworu i przyczynia się do oporności na działanie promieniowania jonizującego. Strategie terapeutyczne polegające na interferowaniu z funkcją EGFR stanowią atrakcyjną perspektywę w kontekście zwiększenia wrażliwości komórek nowotworowych na cytotoksyczne działanie promieniowania jonizującego. W licznych badaniach eksperymentalnych zidentyfikowano różne mechanizmy leżące u podstaw poprawy miejscowej kontroli nowotworu po zastosowaniu radioterapii w skojarzeniu z terapią anti-EGFR, między innymi bezpośredni efekt toksyczny inhibitorów EGFR w stosunku do nowotworowych komórek macierzystych, efekt radiouczulający poprzez zmodyfikowanie przekąźnictwa wewnątrzkomórkowego, zahamowanie naprawy uszkodzeń DNA wywołanych działaniem energii jonizującej, zmniejszenie repopulacji komórek nowotworowych czy poprawę ich utleniania pod wpływem radioterapii frakcjonowanej. Efekty kliniczne kojarzenia radioterapii i leczenia interferującego z aktywnością EGFR są różnicowane w zależności między innymi od typu histopatologicznego nowotworu, rodzaju zastosowanego leku, jego dawki oraz sekwencji leczenia. Dotychczas w pełni nie poznano mechanizmów tych odrębności. Brakuje też czynników predykcyjnych odpowiedzi na wymienione leczenie. Istnieje potrzeba przeprowadzenia dalszych badań nad skutecznością tej terapii skojarzonej, w których punktem końcowym byłaby miejscowa kontrola nowotworu. Ponadto ważne jest pełne poznanie mechanizmów interferowania obu metod leczenia oraz potencjalnej toksyczności tej terapii w stosunku do prawidłowych tkanek.

Słowa kluczowe: EGFR, radioterapia, naprawa DNA

ABSTRACT

Radiotherapy plays an important role in the treatment of cancer patients. Frequently failure of the treatment (locoregional progression) is observed. Overactivity of EGFR-dependent intracellular signaling contributes to tumor progression and radioresistance. Therapeutic strategies aimed at inhibition EGFR activity are an attractive perspective in terms of increasing radiosensitivity of neoplastic cells. Numerous experimental studies allowed for identification of several mechanisms underlying local tumor control after combina-

tion of radiotherapy and therapy directed to EGFR inhibition, including: direct kill of cancer stem cells by EGFR inhibitors, cellular radiosensitization through modified signal transduction, inhibition of radiation induced-DNA damage repair, reduced repopulation or improved reoxygenation of tumor cells during fractionated radiotherapy. Clinical effects of the combined treatment are heterogeneous and depend among others on histopathological type of cancer, type of administered EGFR inhibitor, its dosage, and treatment sequence. To date, mechanism underlying these variations are not well understood. Predictive factors of such combined treatment are scant. Additional studies aimed at better understanding of efficacy and mechanisms of activity of radiotherapy combined with EGFR inhibitors with local control as an endpoint are warranted. Potential toxicity towards normal tissues of such treatment should be also assessed.

Key words: EGFR, radiation therapy, DNA repair

Onkol. Prak. Klin. 2010; 6, 5: 255–263

Wstęp

Radioterapia jest metodą z wyboru w radykalnym leczeniu chorych na różne nowotwory złośliwe, stosuje się ją także w leczeniu paliatywnym chorych w IV stadium choroby nowotworowej. Niestety, w przypadku wielu nowotworów, szczególnie rozpoznawanych w zaawansowanym stadium, wyniki leczenia chorych nie są zadowalające. W związku z tym poszukuje się sposobów zwiększenia skuteczności radioterapii. Skojarzenie jej z zastosowaniem leków cytotoksycznych poprawiło wyniki leczenia u części chorych (m.in. na nowotwory złośliwe okolicy głowy i szyi, raka szyjki macicy, niedrobnokomórkowego i drobnokomórkowego raka płuca, glejaka wielopostaciowego). Od 1962 roku, kiedy to zidentyfikowano receptor czynnika wzrostu naskórka (EGFR, *epidermal growth factor receptor*), trwają intensywne badania nad poznaniem jego roli w rozwoju nowotworów, oporności na zastosowane leczenie konwencjonalne i możliwości interferowania z jego aktywnością w celu poprawy wyników leczenia chorych na nowotwory. W 2006 roku Bonner i wsp. [1] w wielośrodowym badaniu III fazy udokumentowali skuteczność kliniczną dołączenia przeciwciała monoklonalnego skierowanego przeciwko EGFR (cetuksymabu) do frakcjonowanej radioterapii u chorych na zaawansowane miejscowo i/lub regionalnie nowotwory okolicy głowy i szyi. Zachęcające wyniki tego przełomowego badania sprawiły, że podjęto kolejne, liczne próby interferowania z aktywnością EGFR w skojarzeniu z radioterapią lub radiochemioterapią. Jednak badania I i II fazy nie dostarczyły spójnych informacji co do zasadności takiego połączenia metod leczenia. W badaniu II fazy po dodaniu cetuksymabu do standardowej radiochemioterapii opartej na cisplatynie u chorych na nowotwory okolicy głowy i szyi uzyskano wprawdzie obiecujące wyniki — poprawę przeżycia całkowitego (76%) i kontrolę miejscową (71%) w okresie 3 lat, przy czym 2 przypadki zgonów odnotowane w trakcie jego realizacji (1 z powodu zapalenia płuc, 2 z nieznanych przyczyn) stały się powodem przedwczesnego zakończe-

nia badania [2]. Późniejsze analizy obserwowanej toksyczności wykazały, że nie wynikała ona jednoznacznie z dołączenia cetuksymabu do radiochemioterapii, stąd nadal trwają badania dotyczące tego zagadnienia. Niemniej jednak zwrócono uwagę, że ostateczne efekty takiego skojarzenia metod leczniczych mogą nie przynosić korzyści chorym z powodu potencjalnego „nakładania się” działań (*overlapping effects*) lub ich wzajemnego „znoszenia” (*counteracting effects*) oraz pojawiania się nieakceptowalnych działań niepożądanych. Podobne sytuacje kliniczne obserwowano już w przypadku kojarzenia terapii anty-EGFR z leczeniem cytotoksycznym. Monoterapia inhibitorami kinazy tyrozynowej EGFR (erlotynib, gefitynib) u chorych na niedrobnokomórkowego raka płuca prowadziła do zwiększenia odsetka odpowiedzi na leczenie i wydłużenia przeżycia całkowitego [3], zaś dołączenie tych leków ukierunkowanych na cele molekularne do chemioterapii opartej na cisplatynie, gemcytabinie czy paklitakselu w tej populacji chorych nie poprawiło wyników leczenia w porównaniu z wyłączną chemioterapią [4–7]. Podobnie w badaniach I/II fazy dołączenie cetuksymabu do radiochemioterapii przedoperacyjnej opartej na kapecytabinie i oksaliplatynie [8] czy kapecytabinie [9] wiązało się z pogorszeniem wyników odpowiedzi patologicznej w porównaniu z rezultatami badań historycznych w przypadku leczenia neoadiuwantowego bez użycia cetuksymabu [10]. Na uwagę zasługuje też problem właściwej sekwencji zastosowanego leczenia skojarzonego. Aktualnie podejmuje się liczne próby łączenia chemioterapii, radioterapii i terapii interferującej z funkcją EGFR. Radioterapia stosowana jednocześnie z cetuksymabem po chemioterapii indukcyjnej opartej na docetakselu i cisplatynie u chorych na niedrobnokomórkowego raka płuca w III stadium zaawansowania choroby wiązała się z uzyskaniem zachęcających wyników w badaniu II fazy [11]. Podejmuje się też próby oceny efektywności inhibitorów EGFR w terapii podtrzymującej po zakończeniu radioterapii lub radiochemioterapii [12, 13].

Wnikliwe poznanie patofizjologicznych mechanizmów leżących u podstaw kojarzenia leczenia interfe-

rującego z aktywnością EGFR z radioterapią lub radiochemioterapią jest więc warunkiem niezbędnym dla optymalnej terapii chorych na nowotwory, której celem z jednej strony jest poprawa wyników leczenia, z drugiej zaś — ochrona prawidłowych tkanek. Należy również zwrócić uwagę na fakt, że wyniki leczenia z zastosowaniem terapii anty-EGFR zależą od typu nowotworu i od rodzaju stosowanego leku interferującego z aktywnością EGFR. Aktualnie trwają badania z wykorzystaniem przeciwciał skierowanych przeciwko EGFR (cetuksymab, nimotuzumab), drobnocząsteczkowych inhibitorów kinazy tyrozynowej EGFR (erlotynib, gefitynib) oraz inhibitorów wielu kinaz (lapatynib, desyтынib) [11, 12, 14–19]. Ponadto poszukuje się czynników predykcyjnych na stosowane leczenie skojarzone [14].

Skuteczność radioterapii

Guz nowotworowy zbudowany jest z nowotworowych komórek macierzystych, charakteryzujących się zdolnością do nieograniczonego rozplemu i tworzenia heterogennych szeregów komórek potomnych oraz komórek nowotworowych, które co prawda tworzą masę guza, ale nie przejawiają potencjału proliferacyjnego [20–22]. Nowotworowe komórki macierzyste stanowią nie tylko odrębną subpopulację komórek w obrębie guza nowotworowego, ale są prawdopodobnie bardziej odporne na działanie leków czy promieniowania jonizującego [20–22]. Zgodnie z założeniami radioterapii radykalnej należy dążyć do eliminacji wszystkich nowotworowych komórek macierzystych, co jest warunkiem niezbędnym uzyskania trwałej miejscowej kontroli nowotworu (LC, *local control*). Należy pamiętać, że nawet jedna przetrwała nowotworowa komórka macierzysta stanie się w przyszłości przyczyną wznowy miejscowej. Kontrola miejscowa jest więc podstawowym parametrem, który powinno się oceniać w badaniach nad skutecznością radioterapii i ewentualnym kojarzeniem jej z innymi metodami leczenia. Mniej ważny jest wpływ radioterapii i ewentualnego leczenia skojarzonego na ogólną masę guza nowotworowego, co w badaniach eksperymentalnych ocenia się za pomocą takich parametrów, jak regresja guza (*tumor regression*) czy opóźnienie wzrostu nowotworu (*tumor growth delay*). Nie odzwierciedla to bowiem inaktywacji wszystkich nowotworowych komórek macierzystych. Przykładem mogą być próby zastosowania inhibitorów kinazy tyrozynowej EGFR przed frakcjonowaną radioterapią, w jej trakcie i po niej, które wykazywały opóźnienie wzrostu guza, jednak nie uzyskiwano kontroli miejscowej nowotworu [23–25]. Z wielką ostrożnością należy również interpretować wyniki badań *in vitro*. Oceniają one potencjał klonogeny komórek nowotworowych, czyli ich zdolność do tworzenia komórek potomnych (zdolność tworzenia

kolonii komórkowych), co w warunkach *in vivo* odpowiadałoby wznowie miejscowej. O ile wydawałoby się, że inaktywacja komórek klonogennych w warunkach *in vitro* odpowiada inaktywacji nowotworowych komórek macierzystych w warunkach *in vivo*, to jednak nie odzwierciedla zawartości nowotworowych komórek macierzystych w guzie ani ich przetrwania w warunkach *in vivo* [26]. Dlatego też badania *in vitro* wykorzystuje się jedynie do wyjściowej oceny możliwości zastosowania leków ukierunkowanych na cele molekularne w połączeniu z radioterapią. Zarówno budowa, jak i fizjologiczne uwarunkowania aktywności EGFR wyczerpująco opisano w innym artykule w bieżącym wydaniu *Onkologii w Praktyce Klinicznej* [27].

Bezpośredni efekt toksyczny interferowania z aktywnością EGFR w skojarzeniu z radioterapią w stosunku do nowotworowych komórek macierzystych

Przyczyną wznowy miejscowej po radykalnej radioterapii frakcjonowanej są przetrwałe nowotworowe komórki macierzyste [26, 28]. Dlatego próby zniszczenia dodatkowo nawet niewielkiej liczby tych komórek mogą poprawić wyniki leczenia chorych. Wykazano, że hamowanie aktywności EGFR w warunkach *in vitro* i *in vivo* prowadziło do apoptozy komórek nowotworowych [23, 29–33]. Jednak udział tego procesu w ostatecznym efekcie po zastosowaniu radioterapii jest wciąż kontrowersyjny. W badaniach przeprowadzonych *in vitro* nie stwierdzono bezpośredniego efektu uszkadzającego komórki klonogenne pod wpływem cetuksymabu [34]. Jednak w badaniach *in vivo* nad nowotworami wywodzącymi się z komórek linii A431 w warunkach prawidłowego utlenowania podanie tego przeciwciała przed zastosowaniem pojedynczej frakcji promieniowania prowadziło do nieznacznej poprawy kontroli miejscowej, zaś kontynuacja podawania tego leku istotnie poprawiała ten parametr [35]. Ponadto stosowanie cetuksymabu w trakcie frakcjonowanej radioterapii oraz po jej zakończeniu zwiększa kontrolę miejscową nowotworu w porównaniu z wyłączną radioterapią czy podawaniem tego leku jedynie podczas radioterapii [36]. Również zastosowanie cetuksymabu przed napromienianiem pojedynczą dawką komórek raka płaskonabłonkowego w warunkach niedotlenowania prowadziło do poprawy kontroli miejscowej, przy czym nie obserwowano tego efektu w przypadku kontynuacji podawania cetuksymabu po radioterapii [28]. Wyniki badań przeprowadzonych *in vivo* sugerują bezpośredni addytywny efekt cytotoksyczny skojarzenia radioterapii z przeciwciałami skierowanymi przeciwko EGFR w stosunku do nowotworowych komórek

macierzystych. Z kolei w odniesieniu do inhibitorów kinazy tyrozynowej istnieje niewiele danych, zaś dostępne informacje nie potwierdzają, by bezpośredni efekt cytotoksyczny tej grupy leków poprawiał kontrolę miejscową po zastosowaniu radioterapii [23, 24, 37].

Interferowanie z aktywnością EGFR a radiowrażliwość

Przyłączenie ligandu do EGFR prowadzi do dime-ryzacji receptorów, autofosforylacji kinazy tyrozynowej i aktywacji szlaków przekazywania sygnału wewnątrzkomórkowego, które regulują proliferację komórkową, przeżycie komórki, adhezję, migrację i różnicowanie komórek [38]. Do aktywacji EGFR dochodzi również po zadziałaniu promieniowania jonizującego i dzieje się to bez udziału liganda [27, 39]. Konsekwencją powyższego zjawiska w komórkach nowotworowych charakteryzujących się nadmierną ekspresją EGFR jest aktywacja sygnałów przeżycia, proliferacji i radiooporności [38].

Wyniki niektórych badań wskazują, że interferowanie z aktywnością EGFR prowadzi do zahamowania progresji komórek w cyklu komórkowym i co się z tym wiąże — zahamowania proliferacji [39]. Inne dane sugerują pobudzenie apoptozy i upośledzenie mechanizmów odpowiedzialnych za przeżycie komórek [40, 41]. Wyniki ostatnio przeprowadzonych badań wskazują, że w mechanizmie zwiększania radiowrażliwości komórek nowotworowych pod wpływem blokowania funkcji EGFR hamowanie proliferacji i nasilenie apoptozy nie odgrywa tak istotnej roli, jak uprzednio sądzono [42, 43]. Podnosi się zaś rolę mutacji EGFR jako czynnika indukującego radiowrażliwość komórek. Między innymi wykazano, że komórki nowotworowe charakteryzujące się nadmierną ekspresją EGFR i zmutowaną formą białka K-RAS, poddane działaniu inhibitora kinazy tyrozynowej EGFR (BIB1382BS), są bardziej wrażliwe na działanie promieniowania jonizującego [44, 45]. Ponadto mutacja genów odpowiedzialnych za syntezę domeny o aktywności kinazy tyrozynowej EGFR prowadzi do większej radiowrażliwości komórek nowotworowych [46]. Natomiast występowanie mutacji typu EGFRvIII odpowiada za promieniooporność [47, 48]. Ma to szczególne znaczenie w przypadku obecności tej zmutowanej formy EGFR w jądrach komórek nowotworowych, np. w glejakach [47, 48].

W ciągu ostatnich lat uwagę badaczy zwróciła rola EGFR w naprawie uszkodzeń popromiennych w komórce nowotworowej, zaś interferowanie z tą funkcją receptora wydaje się aktualnie główną składową ostatecznego efektu uwrażliwiającego komórkę na działanie promieniowania jonizującego.

Interferowanie z aktywnością EGFR a naprawa DNA

Zastosowanie promieniowania jonizującego prowadzi do powstania wysokoenergetycznych rodników, które chemicznie reagują z DNA, co powoduje jego uszkodzenie [uszkodzenie zasad; uszkodzenie pojedynczej nici DNA (SSB, *single-strand break*); uszkodzenia podwójnej nici DNA (DSB, *double-strand break*)] [49]. Mimo że najczęściej dochodzi do uszkodzenia zasad i SSD, nie doprowadzają one zazwyczaj do skutku letalnego, ponieważ są efektywnie i szybko naprawiane [50]. Pod względem efektywności radioterapii najważniejsze są DSB, które naprawiane są powoli, a skutkują powstaniem delecji, translokacji i dezorganizacji materiału chromosomalnego w komórce nowotworowej, a w konsekwencji zatrzymaniem cyklu komórkowego, apoptozy komórek nowotworowych, inaktywacji genów i stałą utratą zdolności do nieograniczonego rozplemu [51]. Istnieją dwa odrębne mechanizmy naprawy DSB, mianowicie: rekombinacja homologiczna (*homologous recombination*) i niehomologiczne łączenie końców (NHEJ, *nonhomologous end-joining*), z których ten ostatni jest dominującym sposobem naprawy DSB po zastosowaniu radioterapii [52]. Niehomologiczne łączenie końców katalizowane jest przez cztery białka: kinazy białkowe zależne od DNA (DNA-PK), XRCC4, ligazę DNA IV i ARTEMIS (prowadzące do fizycznego połączenia obu końców). DNA-PK składa się z trzech podjednostek: podjednostki katalitycznej (DNA-PKcs, *catalytic subunit*) i dwóch podjednostek regulatorowych — Ku70 i Ku80 [52]. Powstanie DSB prowadzi do aktywacji (poprzez fosforylację) DNA-PKcs, która — łącznie z podjednostkami regulatorowymi (Ku70 i Ku80) — stabilizuje DNA w miejscu przerwania, zaś pozostałe wymienione białka łączą przerwane końce DNA. Co ważne, już niewielkiego stopnia zmniejszenie aktywności DNA-PK prowadzi do ograniczenia zdolności naprawczej komórek, zaś zmniejszenie tej zdolności zaledwie o kilka procent istotnie zwiększa radiowrażliwość komórki [53].

Ważnym białkiem biorącym udział w procesach naprawy uszkodzeń DNA jest również ATM (*ataxia telangiectasia mutated*) [54]. Reguluje ono zatrzymanie cyklu komórkowego w tak zwanych punktach kontrolnych (*check points*) w efekcie uszkodzenia DNA. Powstanie DSB prowadzi bowiem do dimeryzacji ATM i jego autofosforylacji, a w konsekwencji do fosforylacji licznych białek biorących udział w NHEJ, homologicznej rekombinacji i w aktywności sygnałowej odpowiedzialnej za naprawę DNA w punktach kontrolnych (m.in. histonów H2AX). Białko ATM bezpośrednio lub pośrednio bierze też udział w fosforylacji innych białek uczestniczących w naprawie uszkodzeń DNA, czyli Rad51 i BRCA1 [52].

W licznych badaniach przeprowadzonych na przestrzeni ostatnich 15 lat wykazano, że EGFR w odpowiedzi na różne czynniki (m.in. na promieniowanie jonizujące, przyłączenie ligandu prowadzącego do aktywacji receptora, działania cisplatyny) nie podlega zinternalizowaniu i degradacji, ale przedostaje się do jądra komórkowego [przegląd piśmiennictwa w 52]. Jądrowy EGFR jest nieuszkodzony, ufosforylowany i zazwyczaj związany z ligandem [52]. Okazuje się, że EGFR jest obecny nie tylko w błonie komórkowej, ale też po wewnętrznej stronie błony jądrowej [55]. Promieniowanie jonizujące prowadzi do przemieszczenia się EGFR do kariolimfy (*nukleoplasma*) [43, 56]. Istnieją też doniesienia o stałym występowaniu EGFR w jądrze komórkowym [52]. Ponadto zaobserwowano obecność zmutowanego, stale aktywnego EGFR (wariant III mutacji, EGFRvIII) w jądrach komórek glejaków mózgu i glejaków wielopostaciowych [47]. Co ważne, w jądrze komórkowym jądrowy EGFR łączy się zarówno z DNA-PKcs, jak i obiema podjednostkami regulatorowymi (Ku70 i Ku80), sprzyjając naprawie DSB w DNA, w konsekwencji zwiększając oporność komórek nowotworowych na działanie promieniowania jonizującego [43, 56]. Z kolei zastosowanie cetuksymabu prowadziło do 75-procentowego zmniejszenia aktywności DNA-PK w jądrze komórkowym [57], natomiast skojarzone zastosowanie tego przeciwciała monoklonalnego i radioterapii prowadziło do redystrybucji DNA-PKcs z jądra komórkowego do cytoplazmy [58]. Ponieważ aktywność DNA-PKcs jest kluczowa dla naprawy DSB, zmniejszenie zawartości tego białka w jądrze może wskazywać na radiouwrażliwiający efekt cetuksymabu. Co ciekawe, zastosowanie tego przeciwciała przed radioterapią hamowało transport EGFR do jądra komórkowego i zmniejszało aktywność DNA-PK [43]. Ponadto należy wspomnieć, że jądrowa obecność EGFR w komórkach nowotworowych jest odpowiedzialna za ich oporność na związek alkilujący DNA — cisplatynę, którą często stosuje się w skojarzeniu z radioterapią (np. u chorych na nowotwory okolicy głowy i szyi, nowotwory szyjki macicy, nowotwory płuc) [59].

Obecność mutacji genów kodujących domenę kinazy tyrozynowej EGFR w rakach niedrobnokomórkowych płuca wiąże się ze spektakularnym zwiększeniem wrażliwości komórek nowotworowych na działanie promieniowania jonizującego w hodowlach komórkowych w porównaniu z komórkami zawierającymi prawidłową formę tego receptora [46]. Co ciekawe, wykazano, że obecność tej mutacji uniemożliwia translokację EGFR do jądra komórkowego, co może sprzyjać opisywanej radiouwrażliwości komórek nowotworowych [60].

Dotychczasowe dane dotyczące potencjalnego uwrażliwienia komórek nowotworowych na działanie promieniowania jonizującego pod wpływem stosowania inhibitorów kinazy tyrozynowej EGFR są sprzeczne.

W przeciwieństwie do cetuksymabu tyrfostin A9 nie wpłynął na interakcje pomiędzy EGFR a DNA-PK [56]. Z kolei Friedman i wsp. [61] zaobserwowali zmniejszenie zawartości DNA-PK w jądrze komórek raka piersi wrażliwych w hodowlach komórkowych po zastosowaniu gefitynibu w wysokim stężeniu. Natomiast w hodowlach płaskonabłonkowego raka pochodzącego z okolicy głowy i szyi i modelach tego nowotworu *in vivo* 10-krotnie mniejsze dawki gefitynibu prowadziły do zmniejszenia w jądrach komórkowych zawartości DNA-PK, Ku70 i Ku80 po radioterapii [62]. To samo stężenie gefitynibu nie miało jednak wpływu na zawartość DNA-PK w jądrach komórek raka niedrobnokomórkowego w warunkach *in vitro* [63]. Wydaje się więc, że efekt ten może zależeć od typu komórek poddanych działaniu inhibitora kinazy tyrozynowej, rodzaju użytego inhibitora i jego stężenia.

Aktywność poszczególnych białek uczestniczących w szlakach przekazywania sygnałów wewnątrzkomórkowego PI3K/AKT i Ras/Raf/MEK/ERK zależnych od funkcji EGFR może oddziaływać na wrażliwość komórek nowotworowych na promieniowanie jonizujące poprzez wpływ na transkrypcję genów kodujących białka zaangażowane w procesy naprawy DNA. Wykazano między innymi, że promieniowanie jonizujące prowadzi do zwiększonej aktywności MEK i zwiększonej ekspresji białka biorącego udział w naprawie DNA — XRCC1 [64]. Białko to odgrywa rolę w naprawie DNA polegającej na usunięciu uszkodzonej zasady (*base excision repair*) i łączeniu przerwanej pojedynczego łańcucha DNA (SSB). Chociaż SSB nie prowadzi bezpośrednio do efektu letalnego, to akumulacja tych uszkodzeń może przyczynić się do powstania DSB. Zahamowanie szlaku Ras/Raf/MEK/ERK przez inhibitory EGFR prowadziło do braku ekspresji XRCC1 po zadziałaniu promieniowania jonizującego [65]. Co ciekawe, wykazano, że ten ostatni szlak przekazywania sygnałów wewnątrzkomórkowego odpowiada za zwiększenie aktywności XRCC1 indukowanej radioterapią, natomiast szlak PI3K/AKT odpowiada za podstawowe stężenie tego białka naprawiającego DNA [66].

Zaobserwowano, że EGFR kontroluje również aktywację białek naprawy DNA wywołaną działaniem promieniowania jonizującego. Białka, takie jak DNA-PKcs, ATM, H2AX, muszą zostać ufosforylowane w specyficznych miejscach w celu ich aktywacji. Otóż zastosowanie inhibitora kinazy tyrozynowej (BIBX), inhibitora PI3K (LY294002) czy też inhibitora AKT (API-59CJ-oh) prowadziło do zahamowania fosforylacji DNA-PKcs stymulowanej działaniem energii jonizującej i zwiększenia wrażliwości komórek nowotworowych na działanie promieniowania jonizującego w warunkach *in vitro* [45, 67]. Efekt ten widoczny był tylko w komórkach ze zmutowanym genem *K-Ras*, nie obserwowano go w komórkach, w których nie stwierdzono mutacji tego genu [45, 67]. W hodowlach glejaków charakteryzują-

cych się obecnością zmutowanej formy EGFR (stałe aktywnej — EGFRvIII) obserwowano stymulowanie zarówno rekombinacji homologicznej, jak i NHEJ, zaś zastosowanie inhibitorów AKT i ERK hamowało NHEJ [68, 69].

Powyższe obserwacje wskazują na wielopoziomowy wpływ białek szlaku aktywowanego stymulacją EGFR. Ponadto pobudzenie naprawy DSB przez EGFRvIII może, przynajmniej częściowo, wyjaśniać oporność glejaków na działanie energii jonizującej w przypadku nosicielstwa tej mutacji.

Warto podkreślić, że nie tylko aktywacja EGFR prowadzi do pobudzenia wewnątrzkomórkowych szlaków sygnałowych PI3K/AKT i Ras/Raf/MEK/ERK. Mianowicie, inne receptory o aktywności kinazy tyrozynowej, np. IGF1R czy c-MET, aktywują te szlaki. Interferowanie z aktywnością tych receptorów prowadziło do zwiększenia wrażliwości komórek nowotworowych w warunkach *in vitro* oraz hamowania aktywności białek biorących udział w naprawie DNA (m.in. ATM, Rad51) [70 — przegląd piśmiennictwa].

Interferowanie z aktywnością EGFR a redystrybucja komórek nowotworowych w cyklu komórkowym

Zarówno inhibitory kinazy tyrozynowej EGFR, jak i przeciwciała monoklonalne skierowane przeciwko temu receptorowi zatrzymują komórki nowotworowe w fazie G0/G1 cyklu komórkowego [30, 31, 58, 71]. Wskutek skojarzonego działania inhibitorów EGFR i radioterapii dochodzi do zahamowania cyklu komórkowego w fazie G2 (indukowanego działaniem promieniowania jonizującego), co w konsekwencji zmniejsza liczbę komórek znajdujących się w promienioopornej fazie S [30, 58]. Dotychczas jednoznacznie nie określono ostatecznego efektu biologicznego takiego skojarzenia metod terapeutycznych. Teoretycznie może dochodzić do zmniejszenia repopulacji komórek nowotworowych oraz uwrażliwienia nowotworu na działanie promieniowania jonizującego (zmniejszenie frakcji komórek będących w radioopornej fazie S). Jednak nie można pominąć ewentualnego wpływu zmniejszającego wrażliwość guza na napromienianie, ponieważ komórki nowotworowe znajdujące się w fazie G1 są średnio wrażliwe na napromienianie [72]. Co ciekawe, wykazano, że w hodowlach komórek nowotworowych charakteryzujących się nadmierną ekspresją EGFR zastosowanie radioterapii i hamowania funkcji EGFR odmiennie wpływa na komórki będące w spoczynku w porównaniu z komórkami proliferującymi, zaś wypadkowy efekt biologiczny zależy od warunków hodowli oraz zastosowanego inhibitora EGFR [73].

Interferowanie z aktywnością EGFR a repopulacja komórek nowotworowych

W wielu badaniach eksperymentalnych udowodniono, że zarówno przeciwciała monoklonalne skierowane przeciwko EGFR, jak i inhibitory kinazy tyrozynowej tych receptorów hamują proliferację komórek nowotworowych [27], co w praktyce klinicznej może oznaczać zahamowanie rozwoju nowotworu i osiągnięcia jedynie efektu paliatywnego terapii. W kontekście frakcjonowanej radioterapii radykalnej (której celem jest całkowite zniszczenie nowotworu) istotny jest wpływ leczenia molekularnego na potencjalne zahamowanie repopulacji nowotworowych komórek macierzystych, będącej wypadkową ich namnażania i ubytku. Wydłużenie czasu radioterapii wiąże się z większą repopulacją macierzystych komórek nowotworowych i wpływa niekorzystnie na wyniki leczenia, szczególnie w rakach płaskonabłonkowych [27]. Skrócenie całkowitego czasu radioterapii ogranicza czas, w którym dochodzi do namnażania nowotworowych komórek macierzystych, co poprawia kontrolę miejscową nowotworu [27, 74]. Wyniki badań przedklinicznych wskazują, że repopulacja w części guzów nowotworowych zależy od nasilenia ekspresji EGFR w komórkach nowotworowych [75, 76]. Również dane z badań klinicznych u chorych na nowotwory okolicy głowy i szyi wskazują, że nasiloną ekspresją EGFR w komórkach nowotworowych wiąże się z pogorszeniem kontroli miejscowej w przypadku dłuższego całkowitego czasu napromieniania [77, 78]. Powyższe dane sugerują, że EGFR może brać udział w przyspieszonej repopulacji komórek macierzystych nowotworu, zaś hamowanie funkcji EGFR może przyczyniać się do zniesienia tego efektu prowadzącego do oporności na radioterapię. W badaniach eksperymentalnych wykazano, że jednoczasowe zastosowanie cetuksymabu i radioterapii (30 frakcji/6 tygodni) poprawiało kontrolę miejscową ludzkiego raka płaskonabłonkowego w porównaniu z wyłączną radioterapią [79]. Efekt ten wynikał z zahamowania repopulacji, ale nie zaobserwowano całkowitego wyeliminowania tego zjawiska [24]. Należy dodać, że dotychczas nie prowadzono takich badań z inhibitorami kinazy tyrozynowej EGFR.

Interferowanie z aktywnością EGFR a utlenianie

Komórki nowotworowe utlenowane są bardziej wrażliwe na działanie energii jonizującej niż znajdujące się w stanie niedotlenienia. W latach 80. ubiegłego stulecia zaobserwowano, że w warunkach hipoksji dochodzi do uwrażliwienia fibroblastów na mitogenny wpływ surowicy krwi [80]. Efekt ten tłumaczono nasiloną syn-

też DNA w odpowiedzi na działanie czynnika wzrostu naskórka (EGF, *epidermal growth factor*) oraz brakiem hamowania wiązania EGF przez EGFR [81]. To ostatnie wynikało z kolei z braku zmniejszania ekspresji EGFR obserwowanego w warunkach niedotlenowania [81]. W niektórych badaniach wykazano zwiększoną syntezę EGFR w komórkach niedotlenowanych [82], przy czym w innych nie potwierdzono tej obserwacji [83].

Na uwagę zasługuje potencjalny wpływ EGFR na proces angiogenezy. Wykazano, że zastosowanie czynników interferujących z aktywnością tego receptora prowadzi do hamowania angiogenezy w warunkach eksperymentalnych [84]. W warunkach *in vitro* podanie cetuksymabu czy też gefitynibu prowadziło do zmniejszenia syntezy najważniejszego czynnika stymulującego angiogenezę — czynnika wzrostu śródbłonna naczyń (VEGF, *vascular endothelial growth factor*) [przegląd piśmiennictwa w 27]. W warunkach *in vivo* zaobserwowano zmniejszenie gęstości naczyń krwionośnych zaopatrujących guz nowotworowy po podaniu przeciwciała monoklonalnego przeciwko EGFR lub inhibitora kinazy tyrozynowej tego receptora [27, 58, 84]. Powyższy efekt utrzymywał się po skojarzeniu blokowania funkcji EGFR i radioterapii [58]. Ponieważ działanie antyangiogenne może nasilić lub zmniejszyć utlenowanie nowotworu i efekt radioterapii [przegląd piśmiennictwa w 84], konieczne jest przeprowadzenie dalszych badań w celu opracowania optymalnego skojarzenia tych metod postępowania.

Wpływ na tkanki prawidłowe

Białka z rodziny EGFR odgrywają ważną rolę w rozwoju organizmu, wpływając na morfogenezę i różnicowanie tkanek [37]. U osób dorosłych do końca nie poznano roli EGFR w prawidłowych tkankach. W tkankach odnawiających się (naskórek, nabłonek wyściełający ścianę przewodu pokarmowego) EGFR jest istotny w regulacji proliferacji komórek [85]. Tkanki te charakteryzują się stałą ekspresją EGFR [85]. W badaniach przedklinicznych i obserwacjach klinicznych nad efektem stosowania leków interferujących z aktywnością EGFR stwierdzono powstawanie toksyczności skórnej i działań niepożądanych ze strony jelit [1, 86]. W warunkach *in vitro* promieniowanie jonizujące prowadzi do aktywacji EGFR w fibroblastach [87]. Zaobserwowano również zwiększenie ekspresji EGFR w komórkach błony śluzowej jamy ustnej po zadziałaniu promieniowania jonizującego [88], przy czym w trakcie frakcjonowanego napromieniania dochodziło do zmniejszenia mRNA odpowiedzialnego za syntezę tego receptora (RT-PCR), co wskazuje na stabilizację ekspresji EGFR w trakcie radioterapii [88]. Można domniemywać, że EGFR wpływa na proliferację komórek prawidłowych, a tym samym na tolerancję w trakcie frakcjonowanej radioterapii

[88]. Jednak w badaniach z zastosowaniem inhibitora kinazy tyrozynowej nie potwierdzono obecności takiego mechanizmu [89].

Co ciekawe, ekspresję jądrowego EGFR uwidoczniło w keratynocytach [90]. W przeciwieństwie do negatywnego wpływu EGFR na komórki nowotworowe obecność tego receptora w komórkach prawidłowych może sprzyjać ochronie tkanek prawidłowych (np. poprzez naprawę uszkodzeń DNA) przed toksycznym działaniem promieniowania jonizującego lub ultrafioletowego. Wykazano bowiem, że w ludzkich keratynocytach promienie ultrafioletowe indukują translokację EGFR do jądra komórkowego [91]. Dotychczas nie poznano mechanizmów naprawy DNA zależnych od EGFR jądrowego w prawidłowych komórkach. Niemniej jednak wykazano, że białko to wiąże się z p53 i białkiem MDC1, którego rola jest istotna w naprawie DNA po zastosowaniu promieniowania i czynnika radioprotekcyjnego [92].

Piśmiennictwo

1. Bonner J.A., Harari P.M., Giralt J. i wsp. Radiotherapy plus cetuximab for squamous-cell carcinoma of the head and neck. *N. Engl. J. Med.* 2006; 354: 567–578.
2. Pfister D.G., Su Y.B., Kraus D.H. i wsp. Concurrent cetuximab, cisplatin, and concomitant boost radiotherapy for locoregionally advanced, squamous cell head and neck cancer: a pilot phase II study of a new combined-modality paradigm. *J. Clin. Oncol.* 2006; 24: 1072–1078.
3. Shepherd F.A., Rodrigues Pereira J., Ciuleanu T. i wsp. Erlotinib in previously treated non-small-cell lung cancer. *N. Engl. J. Med.* 2005; 353: 123–132.
4. Gatzemeier U., Pluzanska A., Szczesna A. i wsp. Phase III study of erlotinib in combination with cisplatin and gemcitabine in advanced non-small-cell lung cancer: the Tarceva Lung Cancer Investigation Trial. *J. Clin. Oncol.* 2007; 25: 1545–1552.
5. Giaccone G., Herbst R.S., Manegold C. i wsp. Gefitinib in combination with gemcitabine and cisplatin in advanced non-small-cell lung cancer: a phase III trial — INTACT 1. *J. Clin. Oncol.* 2004; 22: 777–784.
6. Herbst R.S., Giaccone G., Schiller J.H. i wsp. Gefitinib in combination with paclitaxel and carboplatin in advanced non-small-cell lung cancer: a phase III trial — INTACT 2. *J. Clin. Oncol.* 2004; 22: 785–794.
7. Herbst R.S., Prager D., Hermann R. i wsp. TRIBUTE: a phase III trial of erlotinib hydrochloride (OSI-774) combined with carboplatin and paclitaxel chemotherapy in advanced non-small-cell lung cancer. *J. Clin. Oncol.* 2005; 23: 5892–5899.
8. Collins A.T., Berry P.A., Hyde C. i wsp. Prospective identification of tumorigenic prostate cancer stem cells. *Cancer Res.* 2005; 65: 10946–10951.
9. Machiels J.P., Sempoux C., Scalliet P. i wsp. Phase I/II study of preoperative cetuximab, capecitabine, and external beam radiotherapy in patients with rectal cancer. *Ann. Oncol.* 2007; 18: 738–744.
10. Rodel C., Grabenbauer C.G., Papadopoulos T. i wsp. Phase I/II trial of capecitabine, oxaliplatin, and radiation for rectal cancer. *J. Clin. Oncol.* 2003; 21: 3098–3104.
11. Hallqvist A., Wagenius G., Rylander H. i wsp. Concurrent cetuximab and radiotherapy after docetaxel-cisplatin induction chemotherapy in stage III NSCLC: Satellite-A phase II study from the Swedish Lung Cancer Study Group. *Lung Cancer* 2010; Jun 10, Epub ahead of print.
12. Pueyo G., Mesia R., Figueras A. i wsp. Cetuximab may inhibit tumor growth and angiogenesis induced by ionizing radiation: a preclinical rationale for maintenance treatment after radiotherapy. *Oncologist* 2010; 15: 976–986.

13. Ready N., Jänne P.A., Bogart J. i wsp. Chemoradiotherapy and gefitinib in stage III non-small cell lung cancer with epidermal growth factor receptor and KRAS mutation analysis: Cancer and Leukemia Group B (CALGB) 30106, a CALGB-stratified phase II trial. *J. Thorac. Oncol.* 2010; 5: 1382–1390.
14. Rodriguez M.O., Rivero T.C., del Castillo Bahi R. i wsp. Nimotuzumab plus radiotherapy for unresectable squamous-cell carcinoma of the head and neck. *Cancer Biol. Ther.* 2010; 9: 343–349.
15. Van Waes C., Allen C.T., Citrin D. i wsp. Molecular and clinical responses in a pilot study of gefitinib with paclitaxel and radiation in locally advanced head-and-neck cancer. *Int. J. Radiat. Oncol. Biol. Phys.* 2010; 77: 447–454.
16. Cohen E.E., Haraf D.J., Kunnavakkam R. i wsp. Epidermal growth factor receptor inhibitor gefitinib added to chemoradiotherapy in locally advanced head and neck cancer. *J. Clin. Oncol.* 2010; 28: 3336–3343.
17. Meira D.D., de Almeida V.H., Mororó J.S. i wsp. Combination of cetuximab with chemoradiation, transtuzumab or MAPK inhibitors: mechanisms of sensitization of cervical cancer cells. *Br. J. Cancer* 2009; 1010: 782–791.
18. Arnoletti J.P., Frolov A., Eloubeidi M. i wsp. A phase I study evaluating the role of the anti-epidermal growth factor receptor (EGFR) antibody cetuximab as a radiosensitizer with chemoradiation for locally advanced pancreatic cancer. *Cancer Chemother. Pharmacol.* 2010; Jun 30, Epub ahead of print.
19. Geyer J.R., Stewart C.F., Kocak M. i wsp. A phase I and biology study of gefitinib and radiation in children with newly diagnosed brain stem gliomas or supratentorial malignant gliomas. *Eur. J. Cancer* 2010; Aug 12, Epub ahead of print.
20. Clarke M.F., Dick J.E., Dirks P.B. i wsp. Cancer stem cells — perspectives on current status and future directions: AACR Workshop on Cancer Stem Cells. *Cancer Res* 2006; 66: 9339–9344.
21. Krause M., Prager J., Zhou X. i wsp. EGFR-inhibition before radiotherapy reduces tumour volume but does not improve local control: differential response of cancer stem cells and nontumorigenic cells? *Radiother. Oncol.* 2007; 83: 316–325.
22. Reya T., Morrison S.J., Clarke M.F. i wsp. Stem cells, cancer, and cancer stem cells. *Nature* 2001; 414: 105–111.
23. Baumann M., Krause M., Zips D. i wsp. Selective inhibition of the epidermal growth factor tyrosine kinase by BIBX1382BS improves growth delay but not local control after fractionated irradiation in human FaDu squamous cell carcinoma in nude mice. *Int. J. Radiat. Biol.* 2003; 79: 547–559.
24. Krause M., Hessel F., Zips D. i wsp. Adjuvant inhibition of the epidermal growth factor receptor after fractionated irradiation of FaDu human squamous cell carcinoma. *Radiother. Oncol.* 2004; 72: 95–101.
25. Krause M., Ostermann G., Petersers C. i wsp. Decreased repopulation as well as increased reoxygenation contribute to the improvement in the local control after targeting of the EGFR by C225 during fractionated irradiation. *Radiother. Oncol.* 2005; 76: 162–167.
26. Krause M., Zips D., Thames H.D. i wsp. Preclinical evaluation of molecular-targeted anticancer agents for radiotherapy. *Radiother. Oncol.* 2006; 80: 112–122.
27. Wojtukiewicz M.Z., Sierko E., Szambora P. Patofizjologiczne podstawy terapii ukierunkowanej na zahamowanie funkcji receptorów czynnika wzrostu naskórka (EGFR). *Onkol. Prakt. Klin.* 2010; 5: 217–227.
28. Baumann M., Krause M. Targeting the epidermal growth factor receptor in radiotherapy: radiobiological mechanisms, preclinical and clinical results. *Radiother. Oncol.* 2004; 72: 257–266.
29. Bonner J.A., Raisch K.P., Trummell H.Q. i wsp. Enhanced apoptosis with combination C225/radiation treatment serves as the impetus for clinical investigation in head and neck cancers. *J. Clin. Oncol.* 2000; 18: 47S–53S.
30. Buchsbaum D.J., Bonner J.A., Grizzle W.E. i wsp. Treatment of pancreatic cancer xenografts with Erbitux (IMC-C225) anti-EGFR antibody, gemcitabine, and radiation. *Int. J. Radiat. Oncol. Biol. Phys.* 2002; 54: 1180–1193.
31. Chinnaiyan P., Huang S., Vallabhaneni G. i wsp. Mechanism of enhanced radiation response following epidermal growth factor receptor signaling inhibition by erlotinib (Tarceva). *Cancer Res.* 2005; 65: 3328–3335.
32. Giocanti N., Hennequin C., Rouillard D. i wsp. Additive interaction of gefitinib ('Iressa', ZD1839) and ionizing radiation in human tumour cells in vitro. *Br. J. Cancer* 2004; 91: 2026–2033.
33. Maddineni S.B., Sangar V.K., Hendry J.H. i wsp. Differential radiosensitization by ZD1839 (Iressa), a highly selective epidermal growth factor receptor tyrosine kinase inhibitor in two related bladder cancer cell lines. *Br. J. Cancer* 2005; 92: 125–130.
34. Saleh M.N., Raisch K.P., Stackhouse M.A. i wsp. Combined modality therapy of A431 human epidermoid cancer using anti-EGFR antibody C225 and radiation. *Cancer Biother. Radiopharm.* 1999; 14: 451–430.
35. Nasu S., Ang K.K., Fan Z. i wsp. C225 anti-epidermal growth factor receptor antibody enhances tumor radiocurability. *Int. J. Radiat. Oncol. Biol. Phys.* 2001; 51: 474–477.
36. Milas L., Fang F.M., Mason K.A. i wsp. Importance of maintenance therapy in C225-induced enhancement of tumor control by fractionated radiation. *Int. J. Radiat. Oncol. Biol. Phys.* 2007; 67: 568–572.
37. Solomon B., Hegekyriakou J., Trivett M.K. i wsp. EGFR blockade with ZD1839 ('Iressa') potentiates the antitumor effects of single and multiple fractions of ionizing radiation in human A431 squamous cell carcinoma. *Int. J. Radiat. Oncol. Biol. Phys.* 2003; 55: 713–723.
38. Wojtukiewicz M.Z., Rybaltowski M., Sierko E. Podstawy biologicznej terapii ukierunkowanej na receptor czynnika wzrostu naskórka (EGFR). *Nowotwory J. Oncol.* 2008; 58: 260–271.
39. Schmidt-Ulrich R.K., Valerie K., Fogelman P.B. i wsp. Radiation-induced autophosphorylation of epidermal growth factor receptor in human malignant mammary and squamous epithelial cells. *Radiat. Res.* 1996; 145: 81–85.
40. Harari P.M., Huang S. Radiation combined with EGFR signal inhibitors: head and neck cancer focus. *Semin. Radiat. Oncol.* 2006; 16: 38–44.
41. Bianco C., Tortora G., Bianco R. i wsp. Enhancement of antitumor activity of ionizing radiation by combined treatment with selective epidermal growth factor receptor — tyrosine kinase inhibitor ZD1839 (Iressa). *Clin. Cancer Res.* 2002; 8: 3250–3258.
42. Nyati M., Morgan M., Feng F. i wsp. Integration of EGFR inhibitors with radiochemotherapy. *Nat. Rev. Cancer* 2006; 6: 867–885.
43. Dittmann K., Mayer C., Rodemann H.P. Inhibition of radiation-induced EGFR nuclear import by C225 (Cetuximab) suppresses DNA-PK activity. *Radiother. Oncol.* 2005; 76: 157–161.
44. Toulany M., Dittmann K., Baumann M. i wsp. Radiosensitization of Ras-mutated human tumor cells in vitro by the specific EGF receptor antagonist BIBX1382BS. *Radiother. Oncol.* 2005; 74: 117–129.
45. Toulany M., Kasten-Pisula U., Brammer I. i wsp. Blockage of epidermal growth factor receptor-phosphatidylinositol 3-kinase-AKT signaling increases radiosensitivity of K-RAS mutated human tumor cells in vitro by affecting DNA repair. *Clin. Cancer Res.* 2006; 12: 4119–4126.
46. Das A.K., Sato M., Story M.D. i wsp. Non-small-cell-lung cancers with kinase domain mutations in the epidermal growth factor receptor are sensitive to ionizing radiation. *Cancer Res.* 2006; 66: 9601–9608.
47. de la Iglesia N., Konopka G., Puram S.V. i wsp. Identification of a PTEN-regulated STAT3 brain tumor suppressor pathway. *Genes Dev.* 2008; 22: 449–462.
48. Mukherjee B., McEllin B., Camacho C.V. i wsp. EGFR-vIII and DNA double-strand break repair: a molecular mechanism for radioresistance in glioblastoma. *Cancer Res.* 2009; 69: 4252–4259.
49. Spitz D.R., Azzam E.I., Li J.J. i wsp. Metabolic oxidation/reduction reactions and cellular responses to ionizing radiation: a unifying concept in stress response biology. *Cancer Metastasis Rev.* 2004; 23: 311–322.
50. Carracedo A., Pandolfi P.P. The PTEN-P13K pathway: of feedbacks and cross-talks. *Oncogene* 2008; 27: 5527–5541.
51. Sancar A., Lindsey-Boltz L.A., Unsal-Kacmaz K. i wsp. Molecular mechanisms of mammalian DNA repair and the DNA damage checkpoints. *Annu. Rev. Biochem.* 2004; 73: 39–85.
52. Chen D.J., Nirodi C.S. The epidermal growth factor receptor: a role in repair of radiation-induced DNA damage. *Clin. Cancer Res.* 2007; 13: 6555–6560.
53. Kasten-Pisula U., Taastan H., Dikomey E. Huge differences in cellular radiosensitivity due to only small variations in double-strand repair capacity. *Int. J. Radiat. Biol.* 2005; 81: 409–419.
54. Khanna K.K., Jackson S.P. DNA-double strand break: signaling, repair and the cancer connection. *Nat. Genet.* 2001; 27: 247–254.
55. Klein C., Gensburger C., Freyermuth S. i wsp. A 120 kDa nuclear phospholipase Cgamma1 protein fragment is stimulated in vivo by EGF signal phosphorylating nuclear membrane EGFR. *Biochemistry* 2004; 43: 15873–15883.
56. Dittmann K., Mayer C., Fehrenbacher B. i wsp. Radiation-induced epidermal growth factor receptor nuclear import is linked to ac-

- tivation of DNA-dependent protein kinase. *J. Biol. Chem.* 2005; 280: 31182–31189.
57. Bandyopadhyay D., Mandal M., Adam L. i wsp. Physical interaction between epidermal growth factor receptor and DNA-dependent protein kinase in mammalian cells. *J. Biol. Chem.* 1998; 273: 1568–1573.
58. Huang S.M., Harari P.M. Modulation of radiation response after epidermal growth factor receptor blockage in squamous cell carcinoma: inhibition of damage repair, cell cycle kinetics, and tumor angiogenesis. *Clin. Cancer Res.* 2000; 16: 38–44.
59. Hsu S.C., Miller S.A., Wang Y., Hung M.C. Nuclear EGFR is required for cisplatin resistance and DNA repair. *Am. J. Transl. Res.* 2009; 1: 249–258.
60. Das A.K., Chen B.P., Story M.D. i wsp. Somatic mutations in the tyrosine kinase domain of epidermal growth factor receptor (EGFR) abrogate EGFR-mediated radioprotection in non-small cell lung cancer cells by suppressing cellular DNA repair capacity. *Clin. Cancer Res.* 2008; 14: 1266–1273.
61. Friedmann B.J., Caplin M., Savic B. i wsp. Interaction of the epidermal growth factor receptor and the DNA-dependent protein kinase pathway following gefitinib treatment. *Mol. Cancer Ther.* 2006; 5: 209–218.
62. Shintani S., Li C., Mihara M. i wsp. Enhancement of tumor radio-response by combined treatment with gefitinib (Iressa, ZD1836), an epidermal growth factor receptor tyrosine kinase inhibitor, is accompanied by inhibition of DNA damage repair and cell growth in oral cancer. *Int. J. Cancer* 2003; 107: 1030–1037.
63. Tanaka T., Munshi A., Brooks C. i wsp. Gefitinib radiosensitizes non-small-cell lung cancer cells by suppressing cellular DNA repair capacity. *Clin. Cancer Res.* 2008; 14: 1266–1273.
64. Brem R., Hall J. XRCC1 is required for DNA single-strand break repair in human cells. *Nucleic Acid Res.* 2005; 33: 2512–2520.
65. Yacoub A., McKinstry R., Hinman D. i wsp. Epidermal growth factor and ionizing radiation up-regulate the DNA repair genes XRCC1 and ERCC1 in DU145 and LNCaP prostate carcinoma through MAPK signaling. *Radiat. Res.* 2003; 159: 439–452.
66. Toulany M., Dittmann K., Fehrenbacher B. i wsp. PI3K-Akt signaling regulates basal, but MAP-kinase signaling regulates radiation-induced XRCC1 expression in human tumor cells in vitro. *DNA repair (Amst)* 2008; 7: 1746–1756.
67. Toulany M., Kehlbach R., Florczak U. i wsp. Targeting of AKT1 enhances radiation toxicity of human tumor cells by inhibiting DNA-PKcs-dependent DNA double-strand break repair. *Mol. Cancer Ther.* 2008; 7: 1772–1781.
68. Golding S.E., Rosenberg E., Neill S. i wsp. Extracellular signal-related kinase positively regulates ataxia telangiectasia mutated, homologous recombination repair, and the DNA damage response. *Cancer Res.* 2007; 67: 1046–1053.
69. Golding S.E., Morgan R.N., Adams B.R. i wsp. Pro-survival AKT and ERK signaling from EGFR and mutant EGFRvIII enhances DNA double-strand break repair in human glioma cells. *Cancer Biol. Ther.* 2009; 8: 730–738.
70. Meyn R.E., Munshi A., Haymach J.V. i wsp. Receptor signaling as regulatory mechanism of DNA repair. *Radiother. Oncol.* 2009; 92: 316–333.
71. Bianco C., Bianco R., Tortora G. i wsp. Antitumor activity of combined treatment of human cancer cells with ionizing radiation and anti-epidermal growth factor receptor monoclonal antibody C225 plus type I protein kinase A antisense oligonucleotide. *Clin. Cancer Res.* 2000; 6: 4343–4350.
72. Pawlik T.M., Keyomarsi K. Role of cell cycle in mediating sensitivity to radiotherapy. *Int. J. Radiat. Oncol. Biol. Phys.* 2004; 59: 928–942.
73. Ahsan A., Hiniker S.M., Davis M.A. i wsp. Role of cell cycle in epidermal growth factor receptor inhibitor-mediated radiosensitization. *Cancer Res.* 2009; 69: 5108–5114.
74. Bourhis J., Overgaard J., Audry H. i wsp. Hyperfractionated or accelerated radiotherapy in head and neck cancer: a metaanalysis. *Lancet* 2006; 368: 843–854.
75. Eicheler W., Krause M., Hessel F. i wsp. Kinetics of EGFR expression during fractionated irradiation varies between different human squamous cell carcinoma lines in nude mice. *Radiother. Oncol.* 2005; 76: 151–156.
76. Petersen C., Eicheler W., Frommel A. i wsp. Proliferation and micromilieu during fractionated irradiation of human FaDu squamous cell carcinoma in nude mice. *Int. J. Radiat. Biol. Phys.* 2001; 51: 483–493.
77. Bentzen S.M., Atasoy B.M., Deley F.M. i wsp. Epidermal growth factor receptor expression in pretreatment biopsies from head and neck squamous cell carcinoma as a predictive factor for a benefit from accelerated radiation therapy in a randomized controlled trial. *J. Clin. Oncol.* 2005; 23: 5560–5567.
78. Eriksen J.G., Steiniche T., Overgaard J. The influence of epidermal growth factor receptor and tumor differentiation on the response to accelerated radiotherapy of squamous cell carcinomas of the head and neck in the randomized DAHANCA 6 and 7 study. *Radiother. Oncol.* 2005; 74: 93–100.
79. Krause M., Schütze C., Petersen C. i wsp. Different classes of EGFR inhibitors may play a different potential to improve local tumour control after fractionated irradiation: a study on C225 in FaDu SCC. *Radiother. Oncol.* 2005; 74: 109–115.
80. Storch T.G., Talley G.D. Oxygen concentration regulates the proliferative response of human fibroblasts to serum and growth factors. *Exp. Cell Res.* 1988; 175: 317–325.
81. Wing D.A., Talley G.D., Storch T.G. Oxygen concentration regulates EGF-induced proliferation and EGF-receptor downregulation. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 1988; 153: 952–958.
82. Laderoute K.R., Grant T.D., Murphy B.J. i wsp. Enhanced epidermal growth factor receptor synthesis in human squamous carcinoma cells exposed to low levels of oxygen. *Int. J. Cancer* 1992; 52: 428–432.
83. Sorensen B.S., Hao J., Overgaard J. i wsp. Influence of oxygen concentration and pH on expression of hypoxia induced genes. *Radiother. Oncol.* 2005; 76: 187–193.
84. Sierko E., Wojtukiewicz M.Z. Podstawy skojarzenia leczenia antyangiogenego z radioterapią. *Onkol. Prakt. Klin.* 2009; 5, Supl. A, A64–A70.
85. Alison M., Sarraf C. The role of growth factors in gastrointestinal cell proliferation. *Cell. Biol. Int.* 1994; 18: 1–10.
86. Wojtukiewicz M.Z., Sierko E. Leczenie ukierunkowane na cele molekularne u chorych na raka jelita grubego — stan obecny i perspektywy. *Nowotwory J. Oncol.* 2008; 58: 31–42.
87. Gueven N., Dittman K., Mayer C. i wsp. Bowman-Birk protease inhibitor reduces the radiation-induced activation of EGF receptor and induces tyrosine phosphatase activity. *Int. J. Radiat. Biol.* 1998; 73: 157–162.
88. Dorr W. Modulation of repopulation processes in oral mucosa: experimental results. *Int. J. Radiat. Biol.* 2003; 79: 531–537.
89. Fehrmann A., Dorr W. Effect of EGFR-inhibition on the radiation response of oral mucosa: experimental studies in mouse tongue epithelium. *Int. J. Radiat. Biol.* 2005; 81: 437–443.
90. Lo H.W., Hsu S.C., Ali-Sayed M. i wsp. Nuclear interaction of EGFR and STAT3 in the activation of iNOS/NO pathway. *Cancer Cell* 2005; 7: 575–589.
91. Xu Y.R., Shao Y., Zhou J., Voorhees J.J. i wsp. Ultraviolet irradiation-induces epidermal growth factor receptor (EGFR) nuclear translocation in human keratinocytes. *J. Cell Biochem.* 2009; 107: 873–880.
92. Dittmann K., Mayer C., Kehlbach R., Rodemann H.P. The radio-protector Bowman-Birk proteinase inhibitor stimulates DNA repair via epidermal growth factor receptor phosphorylation and nuclear transport. *Radiother. Oncol.* 2008; 86: 375–382.