

Artykuły przeglądowe • Review articles**Znaczenie cech biologicznych guza
dla jednoczesnej chemioradioterapii nowotworów złośliwych**

Beata Biesaga, Agnieszka Adamczyk

Jednoczesna chemioradioterapia znalazła zastosowanie w leczeniu wielu typów nowotworów złośliwych. Obecnie coraz częściej, oprócz uznanych klinicznych czynników rokowniczych, próbuje się wykorzystywać parametry biologiczne nowotworu dla oceny skuteczności leczenia. Intensywnie badane czynniki związane są z hipoksją, tempem proliferacji komórek nowotworowych i procesem apoptozy. W przypadku hipoksji najczęściej stosowanymi metodami są: bezpośredni pomiar stężenia tlenu w tkance i immunohistochemiczne oznaczanie białek, ulegających ekspresji w przypadku niedotlenienia komórek. Badania dotyczące proliferacji komórek nowotworowych koncentrują się na analizie wartości predykcyjnej indeksu wiązania bromodeoksyurydyny, potencjalnego czasu podwojenia guza, a także na oznaczaniu ekspresji białek związanych z cyklem komórkowym, takich jak Ki-67 i PCNA. Częstym przedmiotem badań jest także białko P53, odpowiedzialne za regulację cyklu komórkowego i apoptozy. W przypadku apoptozy analizowane są także: indeks apoptotyczny oraz ekspresja takich białek kontrolujących ten proces, jak Bax i Bcl-2. Wśród innych parametrów biologicznych predykcyjną wartość posiadać może ekspresja enzymów: cyklooksygenazy-2, topoizomerazy II i endonukleazy HAP1. Najbardziej jednoznaczne wyniki dotyczą wartości predykcyjnej poziomu hipoksji oraz indeksu apoptozy i wskazują, że wysoki poziom hipoksji i niski apoptozy wiążą się z krótszymi przeżyciami chorych oraz brakiem odpowiedzi nowotworów po jednoczesnej chemioradioterapii.

**The significance of tumour biological parameters
for concurrent chemoradiotherapy of malignancies carcinomas**

Concomitant chemoradiotherapy is a popular form of treatment in case of many malignancies. At present, not only well known clinical prognostic factors but also the biological parameters of the tumours are studied in order to predict treatment results. The parameters describing hypoxia, the proliferative rate of tumour cells and apoptosis are being investigated in detail. In case of hypoxia, the methods used most frequently consist of direct measurement of the oxygen level in the tissues and immunohistochemical evaluation of proteins expressed in hypoxic cells. Studies concerning the proliferation rate of tumour cells mainly investigate the predictive power of the bromodeoxyuridine labelling index, the potential doubling time of the tumour, and the expression of proteins involved in the cell cycle, such as Ki-67 and PCNA. Many studies investigate the P53 protein, which controls cell cycle and apoptosis. Apoptosis is usually measured by the apoptotic index. Evaluation of the expression of proteins controlling this process, mainly Bax and Bcl-2, is also used. Among other biological parameters, the expression of such enzymes as cyclooxygenase 2, topoisomerase II and endonuclease HAP1, might have a predictive potential. At present the apoptotic index and the level of hypoxia are considered the most promising parameters. Study results suggest that a high level of hypoxia and a low level of apoptosis correlate with poor patient survival and lack of tumour response to chemoradiotherapy.

Słowa kluczowe: nowotwory złośliwe, jednoczesna chemioradioterapia, hipoksja, proliferacja, angiogeneza, apoptoza
Key words: malignant tumours, concurrent chemoradiotherapy, hypoxia, proliferation, angiogenesis, apoptosis

Wprowadzenie

Prawdopodobieństwo wyleczenia nowotworów złośliwych o wysokim stopniu zaawansowania klinicznego jest niskie. Poprawę wyników leczenia bardziej zaawansowanych guzów wiąże się z zastosowaniem połączonego leczenia promieniowaniem jonizującym i lekami przeciwnowotworowymi. W ciągu ostatnich dziesięcioleci skojarzone leczenie z udziałem chemio- i radioterapii stało się w wielu typach nowotworów postępowaniem standardowym [1]. Opracowano kilka schematów łączenia chemioradioterapii (CRT): neoadiuwantową, jednoczesną, adiuwantową i sekwencyjną. Wyniki wielu randomizowanych badań klinicznych [2-8] i meta analiz [9-11], dotyczących zaawansowanego raka płaskonabłonkowego (SCC) narządów głowy i szyi, a także randomizowanych badań klinicznych nad rakiem przełyku [12-14], niedrobnokomórkowym rakiem płuc [15-17], rakiem szyjki macicy [18-21] oraz odbytu [22, 23] wykazują, że stosowanie jednoczesnego napromieniania i leczenia chemicznego poprawia skuteczność tego leczenia, w porównaniu do samodzielnej radioterapii (RT) i innych schematów leczenia skojarzonego (Tab. I). Istnieje kilka biologicznych mechanizmów przemawiających na korzyść jednoczesnego stosowania

leków przeciwnowotworowych i promieniowania jonizującego. Jednymi z najważniejszych są: hamowanie naprawy uszkodzeń subletalnych pod wpływem cytostatyku oraz wzrost promieniowrażliwości komórek nowotworowych po zadziałaniu leku. Przy tym sposobie leczenia występuje też zmniejszone ryzyko powstania oporności krzyżowej, czyli selekcji pod wpływem jednego czynnika, klonów opornych również na działanie drugiego czynnika. Jednoczesna CRT nie wiąże się także z ryzykiem wywołania przyspieszonej repopulacji komórek nowotworowych, spowodowanym wydłużeniem całkowitego czasu leczenia. Jednak wadą tego schematu leczenia jest wzrost toksyczności.

Chorzy są kierowani do jednoczesnej CRT na podstawie parametrów klinicznych nowotworu, przy czym decydujące znaczenie ma wysoki stopień zaawansowania klinicznego. Obecnie, a zwłaszcza w ciągu ostatniego roku, obserwuje się wzrost liczby badań radiobiologicznych, dotyczących predykcyjnego znaczenia cech biologicznych nowotworu dla równoczesnej CRT.

Parametry biologiczne mogłyby być przydatne przy doborze schematu leczenia dla indywidualnego chorego [24-28]. W przypadku nowotworów wrażliwych na działanie leków przeciwnowotworowych byłoby wskazane za-

Tab. I. Jednoczesna chemioradioterapia nowotworów złośliwych w różnych lokalizacjach
Table I. Concurrent chemoradiotherapy of malignant tumours in varies localization

Typ nowotworu [pozycja piśmiennictwa]	Rodzaj chemioterapii	Zysk terapeutyczny
Nowotwory SCC narządów głowy i szyi [1, 9–11, 69]	Pochodne platyny	Poprawa przeżyć całkowitych o około 8–12%
Rak SCC przełyku [12-14]	Pochodne platyny Mitomycyna-C 5-fluorouracyl	Poprawa przeżyć całkowitych o około 1–10%
Niedrobnokomórkowy rak płuc [15-17]	Pochodne platyny Mitomycyna-C Winblastyna Windezyna	Poprawa 5-letnich przeżyć całkowitych o około 7-17% Poprawa wyleczalności miejscowej o około 20%
Rak płaskonabłonkowy (SCC) szyjki macicy [18-21]	Pochodne platyny 5-fluorouracyl hydroksymocznik	Poprawa 5-letnich przeżyć całkowitych o około 9–17%
Rak SCC odbytu [22, 23]	5-fluorouracyl mitomycyna-C	Poprawa wyleczalności miejscowej o około 15%

Tab. II. Potencjalne biologiczne czynniki predykcyjne dla jednoczesnej chemioradioterapii nowotworów złośliwych
Table II. Potential predictive biological factors for concurrent chemoradiotherapy of malignant tumours

Proliferacja	Apoptoza	Hipoksja
		Na poziomie tkankowym
		Bezpośredni pomiar utlenowania w guzie histografem Eppendorfa VEGF – czynnik wzrostu śródbłonna naczyń
		Na poziomie komórkowym
IM, IW _{BrdUrd} , T _{pot} , MIB1, Ki-67, PCNA, cyklina D1	IA	Anhidraza węglanowa 9
		Na poziomie regulacji w komórce
Oznaczanie ekspresji białek kontrolujących cykl komórkowy P53, P21, PRb, Mdm2	Oznaczanie ekspresji białek kontrolujących apoptozę P53, Bcl2, Bax, Fas	Oznaczanie ekspresji czynników transkrypcyjnych, aktywnych w stanie hipoksji HIF1 α , HIF2 α

stosowanie jednoczesnej CRT [1], natomiast dla guzów bardziej opornych na cytostatyki należałoby rozważyć zastosowanie innych sposobów uwrażliwiania na promieniowanie jonizujące. Ze względu na nasiloną toksyczność połączonego sposobu leczenia przydatne byłoby też oznaczenie wrażliwości tkanek prawidłowych na stosowane leki i radioterapię.

Potencjalne biologiczne parametry predykcyjne dla jednoczesnej CRT, będące obecnie przedmiotem intensywnych badań, można generalnie podzielić na czynniki związane z poziomem niedotlenowania tkanki nowotworowej, czyli hipoksją komórek, tempem proliferacji komórek nowotworowych i procesem apoptozy (Tab. II). Czynniki te badane są na poziomie tkanki, komórki oraz na poziomie regulacji procesów zachodzących w komórce.

Hipoksja

Występowanie hipoksji w tkance nowotworowej jest jednym z najważniejszych czynników determinujących odpowiedź na promieniowanie jonizujące. W przypadku badań określających wartość predykcyjną dla jednoczesnej CRT, jest to jedyny czynnik badany na poziomie tkankowym. Vanselow i in. [29] wykazali dla 27 raków SCC nosowej i krtaniowej części gardła, w oparciu o metodę bezpośredniego pomiaru stężenia tlenu histografem Eppendorfa w przerzutowych węzłach chłonnych, że wysoki poziom utlenowania przed rozpoczęciem jednoczesnej CRT jest istotnie związany z regresją przerzutów w węzłach chłonnych po leczeniu. Natomiast Hironaka i in. [30] oznaczyli pośrednio stopień utlenowania raka SCC przełyku przed rozpoczęciem leczenia poprzez pomiar gęstości unaczynienia guzów metodą immunohistochemiczną. Autorzy ci, w oparciu o analizę Kaplana-Meiera, stwierdzili, że chorzy z guzami o wysokiej gęstości unaczynienia charakteryzowali się dłuższym czasem 3-letnich przeżyć całkowitych, w porównaniu do chorych, których guzy wykazywały niższą gęstość unaczynienia. Pośrednią metodą wnioskowania o stopniu niedotlenienia tkanek jest także oznaczanie poziomu hemoglobiny (Hb) w krwi obwodowej. W badaniu Glasera i in. [31], przeprowadzonym w grupie 191 chorych na raki SCC narządów głowy i szyi leczonych przedoperacyjnie jednoczesną CRT, zbadano wartość predykcyjną poziomu Hb w krwi obwodowej. Autorzy wykazali u chorych z poziomem Hb $\geq 14,5$ g/dL istotnie wyższy odsetek wyleczalności miejscowej w porównaniu do chorych z niższym poziomem Hb. Natomiast Koukourakis i in. [32] w grupie 75 chorych na raka SCC narządów głowy i szyi, u których zastosowano równocześnie chemio- i radioterapię, oznaczyli immunohistochemicznie gęstość unaczynienia guzów (MVD) i ekspresję anhidrazy węglanowej 9 (CA9) w komórkach nowotworowych. Anhidraza ta jest enzymem uczestniczącym w metabolizmie tlenowym, którego poziom wzrasta w komórkach niedotlenowanych. Wspomniani autorzy wykazali, że grupa guzów z silną ekspresją anhidrazy w komórkach nowotworowych charakteryzuje się istotnie niższym odsetkiem wyleczalności miejscowej w odniesieniu do guzów o niskiej ekspresji tego enzymu. Także dla chorych z gęsto-

unaczynionymi nowotworami wykazano krótszy czas przeżyć całkowitych i niższy odsetek wyleczeń miejscowych po jednoczesnej CRT. Na podstawie gęstości unaczynienia guzów i ekspresji anhidrazy w komórkach nowotworowych autorzy podzielili badane nowotwory na trzy grupy: hipoksyczne (wykazujące ekspresję CA9) niezależnie od MVD, utlenowane (CA9 negatywne) o wysokiej gęstości unaczynienia i utlenowane (CA9 negatywne) o niskiej lub średniej MVD. Fakt występowania guzów o wysokiej MVD i CA9 pozytywnych badacze tłumaczą poprzez możliwość występowania komórek hipoksycznych niezależnie od gęstości unaczynienia nowotworu. Może to wynikać z następujących faktów: (a) zróżnicowania poziomu metabolizmu i zapotrzebowania na tlen w komórkach nowotworowych, (b) zamykania się naczyń krwionośnych w tkance nowotworowej, co zmniejsza przepływ krwi w guzie, a nie wpływa na gęstość jego unaczynienia, (c) zależności między ekspresją CA9 i szlakiem metabolicznym białka HIF 1, którego wysoki poziom w komórkach nowotworowych może być skutkiem mutacji genetycznych. W omawianej pracy autorzy wykazali w nowotworach hipoksycznych i w guzach utlenowanych o wysokiej gęstości unaczynienia istotnie krótszy czas wolny od nawrotu choroby i niższy odsetek przeżyć całkowitych chorych, w porównaniu do guzów utlenowanych o przeciętnej lub niskiej MVD.

Na poziomie regulacji procesów, które zachodzą w komórkach hipoksycznych, badania dotyczące równoczesnego leczenia cytostatykami i napromienianiem skoncentrowały się na oznaczaniu ekspresji białek HIF. Białka HIF są to białka jądrowe, aktywowane w komórce w warunkach niedoboru tlenu i pełniące rolę czynników transkrypcyjnych. Wpływają one na syntezę naczyniowo-śródbłonkowego czynnika wzrostu (VEGF), a także stymulują produkcję erytropoetyny i syntazy tlenu azotu – białek biorących udział w procesie erythropoezy. Koukourakis i in. [33] wykazali dla 75 raków SCC narządów głowy i szyi leczonych jednoczesną CRT, że silna ekspresja białek HIF w komórkach nowotworowych (ocena immunohistochemiczna przed leczeniem) jest związana z brakiem całkowitej regresji guzów po leczeniu oraz, że nadekspresja białka HIF 1 α jest skorelowana z krótszym czasem wolnym od nawrotu choroby.

Podsumowując omawiane badania wydaje się, że poziom hipoksji w tkance nowotworowej posiada wartość predykcyjną dla jednoczesnej chemioradioterapii oraz, że niski stopień utlenowania jest związany z brakiem regresji nowotworów po tym leczeniu.

Angiogeneza

Nieco odmiennym zagadnieniem, aczkolwiek pośrednio związanym z hipoksją w tkance nowotworowej, jest problem angiogenezy, czyli powstawania nowych naczyń krwionośnych w guzie. Jednym z najważniejszych czynników wzrostowych w procesie angiogenezy jest VEGF. Działa on na drodze parakrynej poprzez receptory zlokalizowane w komórkach śródbłonka naczyń. Shimada i in. [34] wykazali predykcyjne znaczenie poziomu VEGF, oce-

nianego metodą immunoenzymatyczną w surowicy krwi 96 chorych na raka SCC przełyku leczonych równoczesną CRT. Badacze ci wykazali, że niższy poziom VEGF w surowicy wskazuje na częściową lub całkowitą regresję guzów, a także na wyższy odsetek 3-letnich przeżyć całkowitych. W badaniach tych samych autorów [35], obejmujących grupę 52 chorych na zaawansowanego płaskonabłonkowego raka przełyku, leczonych jednoczesną CRT, oznaczono w komórkach nowotworowych, metodą immunohistochemiczną, ekspresję VEGF i fosforylasy tyminy (TP), innego enzymu także zaangażowanego w proces angiogenezy. Badacze wykazali, że niska ekspresja VEGF i TP, wykazana przed leczeniem jest istotnie skorelowana z całkowitą lub częściową regresją guzów po leczeniu. Natomiast w analizie Coxa tylko ekspresja VEGF okazała się być niezależnym czynnikiem predykcyjnym dla przeżyć chorych. Autorzy tłumaczą otrzymane wyniki hipotezą, która głosi, że VEGF i TP obecne w komórkach nowotworowych w podwyższonym poziomie, chronią naczynia krwionośne guza przed skutkami promieniowania, co pociąga za sobą wzrost promieniooporności nowotworu. Hipoteza ta znajduje oparcie w badaniach Gorskiego i in. [36], którzy w doświadczeniach na myszach wykazali zmniejszenie objętości nowotworów płuc po podaniu w trakcie napromieniania przeciwciał skierowanych przeciwko mysiemu VEGF. Jednak badania Shimady i in. [34, 35] nie znalazły dotychczas potwierdzenia w pracach innych autorów, w których wykazano brak zależności między wynikami leczenia jednoczesną CRT 44 raków przełyku [37] i 31 raków odbytu [38], a poziomem VEGF mierzonym w surowicy i plazmie krwi pozyskanej od chorych. Być może rozbieżności te wynikają z różnych sposobów pomiaru poziomu VEGF zastosowanych w omawianych publikacjach. Pomiar stężenia VEGF w surowicy i plazmie krwi może bowiem dawać różne wartości, zależne od sposobu pobierania materiału, izolacji surowicy i plazmy oraz zastosowanych metod analizy [39].

Proliferacja

Badania na poziomie komórkowym dotyczące proliferacji komórek nowotworowych, koncentrują się na oznaczeniu wartości predykcyjnej takich wskaźników szybkości podziałów komórkowych, jak: indeks wiązania bromodeoksyurydyny (IW_{BrdUrd}), potencjalny czas podwojenia nowotworu (T_{pot}). Dotyczą także oznaczania ekspresji białek obecnych w błonie jądrowej komórek krążących w cyklu, takich jak Ki-67 i PCNA. Jednak prace te nie przyniosły do tej pory jednoznacznych wyników. Corvo i in. [40], w grupie 72 raków SCC narządów głowy i szyi, oznaczyli cytofluorymetrycznie dwa wskaźniki proliferacji komórek nowotworowych: IW_{BrdUrd} i T_{pot} (BrdUrd podana *in vivo* przed rozpoczęciem leczenia). Tylko IW_{BrdUrd} posiadał potencjał predykcyjny. Mianowicie szybciej proliferujące guzy, dla których IW_{BrdUrd} był wyższy lub równy 8%, charakteryzowały się wyższym prawdopodobieństwem wyleczalności miejscowej po jednoczesnej CRT, w porównaniu do nowotworów o szybkim tempie podziałów komórek, u których zastosowano konwencjonalną radioterapię.

Autorzy nie znaleźli takiej zależności dla guzów wolno proliferujących ($IW_{BrdUrd} < 8\%$). Najprawdopodobniej istnieje kilka mechanizmów, na podstawie których można tłumaczyć zwiększoną efektywność jednoczesnej CRT dla nowotworów o szybkim tempie podziałów komórkowych, w porównaniu do konwencjonalnego leczenia. Zahamowanie przyspieszonej repopulacji komórek nowotworowych, zwiększone prawdopodobieństwo zabięcia chemioopornych klonów komórek oraz lepsza rekrutacja komórek z przedziału spoczynkowego do cyklu komórkowego to najbardziej prawdopodobne przyczyny większej efektywności tego sposobu leczenia w przypadku szybko proliferujących nowotworów. Jednak Dobrowsky i in. [41], w grupie 62 chorych na raka SCC narządów głowy i szyi, nie wykazali wartości predykcyjnej IW_{BrdUrd} i T_{pot} (ocenianych przed rozpoczęciem terapii, po podaniu *in vivo* BrdUrd, metodą cytofluorymetrii przepływowej) dla następujących sposobów leczenia: konwencjonalnej RT (70 Gy/35 frakcji), przyspieszonej ciągłej hiperfrakcjacji (CHART: 55,3 Gy/2 dawki frakcyjne dziennie/1,65 Gy) i CHART połączonego z jednoczesną CRT (mitomycyna C). W oparciu o przedstawione wyniki wydaje się, że potrzebne są dalsze badania, obejmujące duże, jednorodnie grupy nowotworów, dla zbadania przydatności predykcyjnej tych parametrów dla jednoczesnej CRT.

Także badania immunohistochemiczne nad wartością predykcyjną ekspresji białek Ki-67 i PCNA nie przyniosły do tej pory jednoznacznych wyników. Lavertu i in. [42] w badaniach obejmujących nowotwory SCC narządów głowy i szyi wykazali w analizie wieloczynnikowej, że raki wykazujące pozytywne barwienie Ki-67 (za guzy Ki-67 pozytywne przyjęto takie, w których znaleziono choć jedną wybarwioną komórkę) charakteryzują się istotnie niższym całkowitym czasem przeżycia po zakończeniu jednoczesnej CRT. Także Zhang i in. [43] dla raka SCC przełyku wykazali, że wyższy IWMIB-1 (MIB-1 – monoklonalne przeciwciało wykrywające antygen Ki-67) wskazuje na niższy odsetek przeżyć całkowitych chorych oraz wyższe prawdopodobieństwo występowania przerzutów w węzłach chłonnych. Podobnie, Hickey i in. [44] w grupie 14 raków SCC przełyku leczonych jednoczesną CRT wykazali, że chorzy u których nie wykryto nadekspresji PCNA, charakteryzowali się istotnie dłuższym czasem przeżycia. Z kolei, dla gruczolakoraków odbytu leczonych przedoperacyjnie jednoczesną CRT, Nasierowska-Guttmejer [45] wykazała, że niski IWMIB1 w materiale biopsyjnym był skorelowany z całkowitą regresją guzów po leczeniu. Jednak przeciwne wyniki uzyskali Kitamura i in. [46] w grupie 95 nowotworów SCC przełyku oraz Kim i in. [47] dla 23 raków SCC odbytu, leczonych przedoperacyjnie jednocześnie cytostatykami i promieniowaniem jonizującym. Stwierdzili istotnie wyższy odsetek wyleczalności miejscowej w grupie nowotworów o wysokim $IWKi-67$. Z drugiej strony, wyniki wielu badań przeczą przydatności tych parametrów proliferacji jako czynników predykcyjnych. Homma i in. [48] dla raka SCC krtani, Rees i in. [49], Hironaka i in. [50] dla raka SCC przełyku oraz Rodel i in. [51] w raku SCC odbytu nie wykazali istotnego związku między poziomem proliferacji komórek nowotworowych a przeżyciami.

wych, określanym na podstawie takich markerów proliferacji, jak: IWMIB1, IWKi-67, (ocena immunohistochemiczna przed rozpoczęciem leczenia), a odpowiedzią guzów na jednoczesną CRT, jak i czasem przeżyć całkowitych. Wydaje się, że opisywane rozbieżności można tłumaczyć tym, że badane białka nie wykazują ekspresji we wszystkich komórkach nowotworowych krążących w cyklu, a więc ich analiza może wskazywać tylko na możliwości proliferacyjne guza, ale nie dostarcza informacji o dokładnej szybkości podziałów. Ponadto na różnice w opisywanych wynikach wpływ mogą mieć także: niejednorodność badanych grup chorych oraz ich mała liczebność.

Białko P53

Znaczna część badań dotyczących regulacji tempa podziałów komórek nowotworowych dotyczy oznaczania obecności w komórkach nowotworowych zmutowanej formy białka P53. Prawidłowe białko P53 w formie aktywnej działa jako czynnik transkrypcyjny, uruchamiając produkcję białka P21, które hamuje cykl komórkowy. Białko P53 uczestniczy także w procesie regulacji apoptozy, poprzez pobudzanie syntezy białka Bax i hamowanie produkcji białka Bcl-2. We wszystkich omawianych w tym przeglądzie pracach obecność zmutowanej postaci białka P53 wykrywano w komórkach nowotworowych dzięki zastosowaniu techniki immunohistochemicznej. Niestety, wyniki tych badań nie są jednoznaczne. W przypadku nowotworów SCC narządów głowy i szyi publikacje Lavertu i in. [42], Bandoh i in. [52], Tatemoto i in. [53] wykazały, że obecność zmutowanej formy białka P53 w komórkach nowotworowych jest związana z krótszym czasem do nawrotu choroby oraz z krótszym czasem przeżyć chorych. Również Kishi i in. [54] oraz Michel i in. [55] w badaniach nad rakiem SCC przełyku stwierdzili istotny związek między obecnością zmutowanego białka P53, a brakiem całkowitej regresji guzów po jednoczesnej CRT. Także dla gruczolakoraków przełyku, leczonych jednocześnie cytostatykami i promieniowaniem jonizującym, Yang i in. [56] zaobserwowali, że występowanie zmutowanej formy białka P53 jest istotnie związane z obniżeniem odsetka pozytywnych odpowiedzi na indukcyjną chemioradioterapię. Z kolei, na podstawie materiału operacyjnego gruczolakoraka odbytu, uzyskiwanego już po zakończeniu jednoczesnej CRT, Nasierowska-Guttmejer [45] wykazała korelację między obecnością zmutowanego białka P53 i brakiem całkowitej regresji guzów po leczeniu. Odwrotne wyniki uzyskali Giatromanolaki i in. [57] dla 76 guzów SCC narządów głowy i szyi, stwierdzając, że obecność zmutowanej formy białka P53 jest istotnie związana z wyższym odsetkiem wyleczalności miejscowej. Jednak w szeregu publikacji dotyczących raka SCC krtani [48], raka SCC przełyku [56, 58-61] oraz raka SCC odbytu [47, 51] nie wykazano istotnego związku między występowaniem zmutowanej postaci białka P53 (oznaczanej immunohistochemicznie przed rozpoczęciem leczenia), a wynikami jednoczesnej CRT. Opisywane rozbieżności w ocenie predykcyjnej wartości występowania zmutowanej postaci białka P53 można tłumaczyć ograniczeniami metody im-

munohistochemicznej, zastosowanej do oceny obecności zmutowanej formy białka P53. U podstaw tej metody leży założenie, że zmutowana postać P53 charakteryzuje się znacznie dłuższym czasem półtrwania (kilka godzin), w porównaniu do prawidłowej formy tego białka (20 minut) [62]. Co za tym idzie, nieprawidłowe białko P53 wybarwia się swoistymi przeciwciałami monoklonalnymi, podczas gdy prawidłowe białko bardzo szybko rozkłada się w komórce i nie jest wykrywane. Nadekspresja P53 może być związana nie tylko z uszkodzeniami genetycznymi, a wynikać także z oddziaływań prawidłowego białka P53 z antygenem T wirusa SV40 i białkiem E6, pochodzącym z wirusa HPV [62], czy też zaburzeń procesu degradacji P53 w systemie ubikwityny [63]. Także negatywna reakcja immunohistochemiczna nie musi oznaczać, że białko to występuje w prawidłowej formie. Wykazano mianowicie, że występowanie wielu mutacji typu „zmiany sensu” w białku P53, wykryte na podstawie analizy molekularnej, nie było związane z dodatnią reakcją immunologiczną [63]. Ocenia się, że tego typu mutacje stanowią około 15% wszystkich mutacji wykrywanych w białku P53 [63]. Wydaje się więc, że immunohistochemiczna metoda oceny występowania zmutowanego białka P53 nie pozwala na wyciąganie jednoznacznych wniosków i konieczne jest wprowadzenie technik biologii molekularnej, pozwalających na dokładne określenie lokalizacji i typu mutacji.

Apoptoza

Badania wartości predykcyjnej poziomu apoptozy dla jednoczesnej CRT koncentrują się na oznaczeniach na poziomie komórkowym i molekularnym. Na poziomie komórkowym dotyczą one indeksu apoptotycznego (IA), czyli odsetka komórek ulegających apoptozie w tkance nowotworowej. Bandoh i in. [52] dla 57 raków SCC zatoki szczękowej (metoda immunohistochemiczna z zastosowaniem przeciwciała przeciwko jednoniciowemu DNA) oraz Shears i in. [64] dla 46 raków SCC przełyku (metoda tunelowa) i Rodel i in. [51] dla 44 raków odbytu (metoda tunelowa) wykazali, że niski poziom IA, oceniany przed rozpoczęciem CRT, jest istotnie skorelowany z krótszym czasem wolnym od nawrotu choroby oraz z brakiem całkowitej lub częściowej regresji guza, ocenianym po leczeniu. Jednak Rees i in. [49] dla 58 raków SCC przełyku wykazali brak związku między IA, ocenianym metodą tunelową przed rozpoczęciem równoczesnej chemo- i radioterapii, a odpowiedzią guzów na leczenie. Większość przedstawionych powyżej wyników, choć uzyskanych w oparciu o małe grupy chorych, sugeruje, że indeks apoptotyczny może posiadać pewien potencjał predykcyjny dla jednoczesnej CRT, jednak w celu ostatecznego zweryfikowania wartości tego parametru konieczne są dalsze badania, prowadzone w dużych grupach chorych.

Badania wartości predykcyjnej ekspresji białek kontrolujących proces apoptozy w komórkach nowotworowych dotyczą najczęściej poziomu białek Bax i Bcl-2. O znaczeniu tych białek wspomniano już przy omawianiu roli białka P53. W cytowanych poniżej pracach wszyscy autorzy stosowali metodę immunohistochemiczną. Naj-

bardziej obiecujące wyniki dotyczą białka Bax. Mianowicie, Bando i in. [52] dla raka SCC zatoki szczękowej, Ikeguchi i in. [65] dla nowotworów SCC przełyku oraz Nasierowska-Guttmejer [45] dla gruczolakoraka odbytu, wykazali, że wysoki poziom tego białka w komórkach nowotworowych przed rozpoczęciem jednoczesnej CRT wskazuje na całkowitą regresję guza po zakończeniu leczenia i wyższy odsetek przeżyć całkowitych chorych. Natomiast tylko w jednym doniesieniu, dotyczącym 59 raków SCC krtani, autorzy stwierdzili istotny związek między ekspresją białka Bcl-2, a wyższym poziomem przeżyć całkowitych chorych po zakończeniu terapii [48]. Inne prace nie potwierdzają wartości predykcyjnej poziomu tego białka dla raka SCC przełyku [61] i odbytu [47, 51], dla leczenia cytotatykami i promieniowaniem jonizującym. Te sprzeczne wyniki można wytłumaczyć faktem istnienia w komórce, poza omawianymi białkami, co najmniej jeszcze jednej, niezależnej od nich, grupy regulatorów apoptozy. Należą do niej białka określane IAP, które hamują apoptozę [66].

Inne potencjalne czynniki predykcyjne

Wśród innych cech biologicznych charakteryzujących tkanki nowotworowe, predykcyjną wartością dla jednoczesnej CRT może posiadać ekspresja enzymów takich, jak: cyklooksygenaza-2 (COX-2), topoizomeraza II oraz endonukleaza HAP1. Cyklooksygenaza 2 jest enzymem uczestniczącym w procesie syntezy prostaglandyn, które są mediatorami reakcji zapalnych. Kim i in. [67] w grupie 75 raków SCC szyjki macicy wykazali, że nadekspresja COX-2 w komórkach nowotworowych, oceniana immunohistochemicznie przed rozpoczęciem leczenia, jest istotnie skorelowana z dłuższym czasem wolnym od nawrotu choroby. Natomiast topoizomeraza II jest enzymem odpowiedzialnym za zmiany w organizacji przestrzennej DNA podczas procesu replikacji. Rees i in. [49] w grupie 58 raków SCC przełyku wykazali, że silna ekspresja tego enzymu (oceniana immunohistochemicznie przed rozpoczęciem jednoczesnej CRT) jest istotnie związana z odpowiedzią guzów na leczenie. Z kolei endonukleaza HAP1 jest jedną z najważniejszych endonukleaz rozpoznających w łańcuchu DNA miejsca z brakującą zasadą (apurynowe/apirymidynowe) w procesie naprawy DNA. Ponadto ma ona wpływ na aktywność niektórych czynników transkrypcyjnych, między innymi C-fos, C-jun i P53. Koukourakis i in. [68] w grupie 95 chorych na miejscowo zaawansowane raki SCC narządów głowy i szyi leczonych różnymi schematami chemioradioterapii, wykazali, że wysoka ekspresja endonukleazy HAP1 (ocena immunohistochemiczna przed leczeniem) jest istotnie związana z brakiem całkowitej regresji guzów po leczeniu.

Podsumowanie

Podsumowując wyniki omawiane w tym przeglądzie należy stwierdzić, że wartość parametrów biologicznych, charakteryzujących tkanki nowotworowe dla jednoczesnej chemioradioterapii nowotworów złośliwych, jest obecnie

przedmiotem intensywnych badań. Ponieważ badania te nie przyniosły do tej pory jednoznacznych wyników, żaden z parametrów biologicznych nie został uwzględniony w doświadczeniach klinicznych. Rozbieżności we wnioskach opisywanych w tym przeglądzie prac mogą wynikać z szeregu przyczyn.

W większości publikacji badania obejmowały niewielkie liczebnie grupy chorych, co może prowadzić do otrzymania nieistotnych statystycznie różnic. Z drugiej strony, wyniki statystycznie istotne w nielicznych grupach mogą nie odzwierciedlać zależności występującej w rzeczywistości. Zwraca też uwagę niejednorodność analizowanych nowotworów. Dotyczy to badań nad grupami nowotworów, do których włączono guzy o różnej lokalizacji, na przykład w obrębie raka narządów głowy i szyi. Wydaje się, że spośród nowotworów głowy i szyi jednoczesna CRT jest najbardziej uzasadniona w przypadku nosowej części gardła [69], co może być związane ze względnie dużą chemioradiowrażliwością i znaczną skłonnością do rozsiewu tego nowotworu.

Następną trudnością jest porównywanie doniesień, w których stosowano różne schematy chemio- i radioterapii dla tych samych typów nowotworów. Wiele ośrodków różni się bowiem schematami radioterapii, dawkami cytotatyków i sposobem ich podawania w trakcie jednoczesnej CRT.

Odrębnym problemem jest brak standaryzacji metod stosowanych w opisywanych doświadczeniach. W większości badań dotyczących ekspresji białek wykorzystano metody immunohistochemii, które z różnych przyczyn mogą dawać niejednoznaczne wyniki. W niektórych przypadkach obecność tego samego białka wykrywano za pomocą różnych przeciwciał o odmiennych czułości i specyficzności. Przykładem są tutaj przeciwciała stosowane do oznaczenia białka Ki-67. Także przy ocenie tego samego barwienia immunohistochemicznego badacze stosują różne metody i kryteria ocen. Nie zawsze też wynik tego barwienia odzwierciedla stan rzeczywisty w komórce. Mutacje punktowe mogą bowiem zmienić funkcję białka, nie wpływając na jego strukturę, a w związku z tym na jego zdolność do wiązania się z przeciwciałem.

Przy oznaczaniu wartości predykcyjnej parametrów biologicznych dla jednoczesnej CRT należy też uwzględnić fakt, że chemiopromieniowrażliwość komórek ma charakter złożony i wieloczynnikowy. Molekularne podstawy chemio- i promieniowrażliwości nie są w pełni poznane. Chemio- i promieniowrażliwość najprawdopodobniej zależy od stanu genomu komórek tkanek eksponowanych na leczenie, na którą znaczny wpływ mają mutacje w wielu genach, łącznie z onkogenami, genami supresorowymi oraz genami poreplikacyjnej naprawy DNA [70, 71]. Na poziomie komórkowym mutacje te prowadzą do spadku szybkości akumulacji cytotatyku w komórce (gen *mdr1*), zaburzeń mechanizmów naprawczych DNA (geny *p53*, *rb*, *c-fos*, oraz geny rodziny *ras* kodujące białko P21) oraz zaburzeń w sygnałach aktywujących proces apoptozy (geny *p53*, *bcl-2*) [72, 73]. Podatność komórek nowotworowych na chemioradioterapię może także zależeć od ilości leku w organizmie, a zwłaszcza od dystrybucji i wyda-

lania cytostatyku, związanych z unaczynieniem tkanki nowotworowej. Wydaje się więc, że dla określenia chemio- i promieniowrażliwości komórek niezbędna jest charakterystyka ekspresji wielu genów, odpowiedzialnych za zjawiska proliferacji, apoptozy, naprawy uszkodzeń DNA i angiogenezy. Zastosowanie mogłaby znaleźć tutaj metoda „płytek genowych” pozwalająca na jednoczesne określenie ekspresji wielu tysięcy genów.

W pojawiających się do tej pory publikacjach nie badano wartości predykcyjnej chemiopromieniowrażliwości tkanek prawidłowych dla jednoczesnej CRT. Ten sposób leczenia jest związany z wysoką wczesną toksycznością, często utrudniającą czy też uniemożliwiającą zakończenie planowanej terapii. Istnieje też ryzyko nasilenia późnych odczynów popromiennych. Zachodzi więc pilna potrzeba opracowania testów oznaczających toksyczność jednoczesnej CRT dla tkanek prawidłowych.

Wielu badaczy zwraca uwagę, że oznaczanie jednego parametru może nie być wystarczające do uzyskania istotności statystycznej w analizie korelacji między chemiopromieniowrażliwością komórek nowotworowych i prawidłowych, a danymi klinicznymi. Dlatego upatrują oni w równoczesnej ocenie wielu cech biologicznych jeden z najważniejszych kierunków dalszych prac badawczych nad testami predykcyjnymi. W przyszłości może to doprowadzić do indywidualizacji jednoczesnej CRT, bowiem na podstawie takiej kompleksowej charakterystyki będzie można wyselekcjonować chorych odnoszących największe korzyści z tego typu leczenia.

Dr Beata Biesaga

Pracownia Radiobiologii Klinicznej
Centrum Onkologii – Instytut, Oddział w Krakowie
ul. Garncarska 11, 31-115 Kraków
e-mail: z5biesag@cyf-kr.edu.pl

Piśmiennictwo

- Bartelink H, Schellens JHM, Verheij M. The combined use of radiotherapy and chemotherapy in the treatment of solid tumours. *E J Cancer* 2000; 38; 2: 216-22.
- Brizel DM, Albers ME, Fisher SR i wsp. Hyperfractionated irradiation with or without concurrent chemotherapy for locally advanced head and neck cancer. *N Engl J Med* 1998; 8, 338: 1798-804.
- Calais G, Alfonsi M, Bardet E i wsp. Randomized trial of radiation therapy versus concomitant chemotherapy and radiation therapy for advanced-stage oropharynx carcinoma. *J Natl Cancer Inst* 1999; 5; 91: 2081-6.
- Wendt TG, Grabenbauer GG, Rodel CM i wsp. Simultaneous radiochemotherapy versus radiotherapy alone in advanced head and neck cancer: a randomized multicenter study. *J Clin Oncol* 1998; 16: 1318-24.
- Jeremic B, Shibamoto Y, Milicic B i wsp. Hyperfractionated radiation therapy with or without concurrent low-dose daily cisplatin in locally advanced squamous cell carcinoma of the head and neck: a prospective randomized trial. *J Clin Oncol* 2000; 18: 1458-64.
- Jeremic B, Shibamoto Y, Stanisavljevic B i wsp. Radiation therapy alone or with concurrent low-dose daily either cisplatin or carboplatin in locally advanced unresectable squamous cell carcinoma of the head and neck: a prospective randomized trial. *Radiother Oncol* 1997; 43: 29-37.
- Al-Sarraf M, LeBlanc M, Giri PG i wsp. Chemoradiotherapy versus radiotherapy in patients with advanced nasopharyngeal cancer: phase III randomized Intergroup study 0099. *J Clin Oncol* 1998; 16: 1310-7.
- Adelstein DJ, Lavertu P, Saxton JP i wsp. Mature results of a phase III randomized trial comparing concurrent chemoradiotherapy with radiation therapy alone in patients with stage III and IV squamous cell carcinoma of the head and neck. *Cancer* 2000; 15; 88: 876-83.
- Browman GP, Hodson DI, Mackenzie RJ i wsp. Cancer Care Ontario Practice Guideline Initiative Head and Neck Cancer Disease Site Group. Choosing a concomitant chemotherapy and radiotherapy regimen for squamous cell head and neck cancer: A systematic review of the published literature with subgroup analysis. *Head Neck* 2001; 23: 579-89.
- El-Sayed S, Nelson N. Adjuvant and adjunctive chemotherapy in management of squamous cell carcinoma of the head and neck region: a meta-analysis of prospective and randomized trials. *J Clin Oncol* 1996; 14: 838-47.
- Pignon JP, Bourhis J, Domenge C. Chemotherapy added to locoregional treatment for head and neck squamous-cell carcinoma: three meta-analysis of updated individual data. *Lancet* 2000; 355: 949-55.
- Bosset JF, Gignoux M, Triboulet JP i wsp. Chemoradiotherapy followed by surgery compared with surgery alone in squamous-cell cancer of the esophagus. *N Engl J Med* 1997; 17; 337: 161-7.
- Coia LR, Engstrom PF, Paul AR i wsp. Long-term results of infusional 5-FU, mitomycin-C and radiation as primary management of esophageal carcinoma. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 1991; 20: 29-36.
- Herskovic A, Martz K, Al-Sarraf M i wsp. Combined chemotherapy and radiotherapy compared with radiotherapy alone in patients with cancer of the esophagus. *N Engl J Med* 1992; 11; 326: 1593-8.
- Schaake-Koning C, van den Bogaert W, Dalesio O i wsp. Effects of concomitant cisplatin and radiotherapy on inoperable non-small-cell lung cancer. *N Engl J Med* 1992; 20; 326: 524-30.
- Furuse K, Fukuoka M, Kawahara M i wsp. Phase III study of concurrent versus sequential thoracic radiotherapy in combination with mitomycin, vindesine, and cisplatin in unresectable stage III non-small-cell lung cancer. *J Clin Oncol* 1999; 17: 2692-9.
- Ahn YC, Park K, Kim DY i wsp. Preoperative concurrent chemoradiotherapy for stage IIIA non-small cell lung cancer. *Acta Oncol* 2001; 40: 587-92.
- Morris M, Eifel PJ, Lu J i wsp. Pelvic radiation with concurrent chemotherapy compared with pelvic and para-aortic radiation for high-risk cervical cancer. *N Engl J Med* 1999; 15; 340: 1137-43.
- Rose PG, Bundy BN, Watkins EB i wsp. Concurrent cisplatin-based radiotherapy and chemotherapy for locally advanced cervical cancer. *N Engl J Med* 1999; 15; 340: 1144-53.
- Whitney CW, Sause W, Bundy BN i wsp. Randomized comparison of fluorouracil plus cisplatin versus hydroxyurea as an adjunct to radiation therapy in stage IIB-IVA carcinoma of the cervix with negative para-aortic lymph nodes: a Gynecologic Oncology Group and Southwest Oncology Group Study. *J Clin Oncol* 1999; 17: 1339-48.
- Peters WA 3rd, Liu PY, Barrentt RJ 2nd i wsp. Concurrent chemotherapy and pelvic radiation therapy compared with pelvic radiation therapy alone as adjuvant therapy after radical surgery in high-risk early-stage cancer of the cervix. *J Clin Oncol* 2000; 18: 1606-13.
- Epidermoid anal cancer: results from the UKCCCR randomised trial of radiotherapy alone versus radiotherapy, 5-fluorouracil, and mitomycin. UKCCCR Anal Cancer Trial Working Party. UK Co-ordinating Committee on Cancer Research. *Lancet* 1996; 19; 348: 1049-54.
- Bartelink H, Roelofsen F, Eschwege F i wsp. Concomitant radiotherapy and chemotherapy is superior to radiotherapy alone in the treatment of locally advanced anal cancer: results of a phase III randomized trial of the European Organization for Research and Treatment of Cancer Radiotherapy and Gastrointestinal Cooperative Groups. *J Clin Oncol* 1997; 15: 2040-9.
- Gasińska A, Kołodziejski L, Biesaga B. Tumour cell kinetics as prognostic factor in surgically-treated-non-small cell lung cancer. *Lung Cancer* 1997; 18: 159-70.
- Gasińska A, Urbański K, Jakubowicz J i wsp. Tumour cell kinetics as a prognostic factor in squamous cell carcinoma of the cervix treated with radiotherapy. *Radiother Oncol* 1999; 50: 77-84.
- Słonina D, Klimek M, Szytyma T i wsp. Comparison of the radiosensitivity of normal-tissue cells with normal-tissue reactions after radiotherapy. *Int J Radiat Biol* 2000; 76: 1255-64.
- Gasińska A, Urbański K, Gruchała A i wsp. A ratio of apoptosis to mitosis, proliferation pattern and prediction of radiotherapy response in cervical carcinoma. *Neoplasma* 2002; 49: 379-86.
- Gasińska A, Urbański K, Adamczyk A i wsp. Prognostic significance of intratumour microvessel density and haemoglobin level in carcinoma of the uterine cervix. *Acta Oncol* 2002; 41: 437-43.
- Vanselow B, Eble MJ, Rudat V i wsp. Oxygenation of advanced head and neck cancer: prognostic marker for the response to primary radiochemotherapy. *Otolaryngol Head Neck Surg* 2000; 122: 856-62.

30. Hironaka S, Hasebe T, Kamijo T i wsp. Biopsy specimen microvessel density is a useful prognostic marker in patients with T(2-4)M(0) esophageal cancer treated with chemoradiotherapy. *Clin Cancer Res* 2002; 8: 124-30.
31. Glaser CM, Millesi W, Kornek GV i wsp. Impact of hemoglobin level and use of recombinant erythropoietin on efficacy of preoperative chemoradiation therapy for squamous cell carcinoma of the oral cavity and oropharynx. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 2001; 50: 705-15.
32. Koukourakis MI, Giatromanolaki A, Sivridis E i wsp. Hypoxia-regulated carbonic anhydrase-9 (CA9) relates to poor vascularization and resistance of squamous cell head and neck cancer to chemoradiotherapy. *Clin Cancer Res* 2001; 7: 3399-403.
33. Koukourakis MI, Giatromanolaki A, Sivridis E i wsp. Hypoxia-inducible factor (HIF1A and HIF2A), angiogenesis, and chemoradiotherapy outcome of squamous cell head-and-neck cancer. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 2002; 53: 1192-202.
34. Shimada H, Takeda A, Nabeya Y i wsp. Clinical significance of serum vascular endothelial growth factor in esophageal squamous cell carcinoma. *Cancer* 2001; 92: 663-9.
35. Shimada H, Hoshino T, Okazumi S i wsp. Expression of angiogenic factors predicts response to chemoradiotherapy and prognosis of oesophageal squamous cell carcinoma. *Br J Cancer* 2002; 86: 552-57.
36. Gorski DH, Beckett MA, Jaskowiak NT i wsp. Blockage of the vascular endothelial growth factor stress response increases the antitumor effects of ionizing radiation. *Cancer Res* 1999; 15: 59: 3374-8
37. McDonnell CO, Harmey JH, Bouchier-Hayes DJ i wsp. Effect of multimodality therapy on circulating vascular endothelial growth factor levels in patients with oesophageal cancer. *Br J Surg* 2001; 88: 1105-9.
38. George ML, Dzik-Jurasz AS, Padhani AR i wsp. Non-invasive methods of assessing angiogenesis and their value in predicting response to treatment in colorectal cancer. *Br J Surg* 2001; 88: 1628-36.
39. Hormbrey E, Gillespie P, Turner K i wsp. A critical review of vascular endothelial growth factor (VEGF) analysis in peripheral blood: is the current literature meaningful? *Clin Exp Metastasis* 2002; 19: 651-63.
40. Corvo R, Paoli G, Giaretti W i wsp. Evidence of cell kinetics as predictive factor of response to radiotherapy alone or chemoradiotherapy in patients with advanced head and neck cancer. *Int J Radiat Oncol* 2000; 47: 1: 57-63.
41. Dobrowsky W, Dobrowsky E, Wilson GD. In vivo cell kinetic measurements in a randomized trial of continuous hyperfractionated accelerated radiotherapy with or without mitomycin C in head-and-neck cancer. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 2003; 55: 576-82.
42. Lavertu P, Adelstein DJ, Myles J i wsp. P53 and Ki-67 as outcome predictors for advanced squamous cell cancers of the head and neck treated with chemoradiotherapy. *Laryngoscope* 2001; 111: 1878-92.
43. Zhang XD, Coventry BJ, Jamieson GG i wsp. The utility of the proliferative index in pretreatment biopsy specimens of esophageal squamous cell carcinoma. *Dis Esophagus* 1998; 11: 215-20.
44. Hickey K, Grehan D, Reid IM i wsp. Expression of epidermal growth factor receptor and proliferating cell nuclear antigen predicts response of esophageal squamous cell carcinoma to chemoradiotherapy. *Cancer* 1994; 74: 1693-8.
45. Nasierowska-Guttmejer A. The comparison of immunohistochemical proliferation and apoptosis markers in rectal carcinoma treated surgically or by preoperative radio-chemotherapy. *Pol J Pathol* 2001; 52: 53-61.
46. Kitamura K, Saeki H, Kawaguchi H i wsp. Immunohistochemical status of the p53 protein and Ki-67 antigen using biopsied specimens can predict a sensitivity to neoadjuvant therapy in patients with esophageal cancer. *Hepatogastroenterology* 2000; 47: 419-23.
47. Kim NK, Park JK, Lee KY i wsp. p53, BCL-2, and Ki-67 expression according to tumor response after concurrent chemoradiotherapy for advanced rectal cancer. *Ann Surg Oncol* 2001; 8: 418-24.
48. Homma A, Furuta Y, Oridate N i wsp. Correlation of clinicopathological parameters and biological markers related to apoptosis and proliferative activity with a clinical outcome in squamous cell carcinoma of the larynx treated with concurrent chemoradiotherapy. *Auris Nasus Larynx* 2001; 28 Suppl: S87-94.
49. Rees M, Stahl M, Klump B i wsp. The prognostic significance of proliferative activity, apoptosis and expression of DNA topoisomerase II alpha in multimodally-treated oesophageal squamous cell carcinoma. *Anticancer Res* 2001; 21: 3637-42.
50. Hironaka S, Hasebe T, Kamijo T i wsp. Biopsy specimen microvessel density is a useful prognostic marker in patients with T(2-4)M(0) esophageal cancer treated with chemoradiotherapy. *Clin Cancer Res* 2002; 8: 124-30.
51. Rodel C, Grabenbauer GG, Papadopoulos T i wsp. Apoptosis as a cellular predictor for histopathologic response to neoadjuvant radiochemotherapy in patients with rectal cancer. *Int J Radiat Biol Phys* 2002; 52: 294-303.
52. Bando N, Hayashi T, Kishibe K i wsp. Prognostic value of p53 mutations, bax, and spontaneous apoptosis in maxillary sinus squamous cell carcinoma. *Cancer* 2002; 94: 1968-80.
53. Tatemoto Y, Osaki T, Yoneda K i wsp. Expression of p53 and p21 proteins in oral squamous cell carcinoma: correlation with lymph node metastasis and response to chemoradiotherapy. *Pathol Res Pract* 1998; 194: 821-30.
54. Kishi K, Doki Y, Miyata H i wsp. Prediction of the response to chemoradiation and prognosis in oesophageal squamous cancer. *Br J Surg* 2002; 89: 597-3.
55. Michel P, Magois K, Robert V i wsp. Prognostic value of TP53 transcriptional activity on p21 and bax in patients with esophageal squamous cell carcinomas treated by definitive chemoradiotherapy. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 2002; 54: 379-85.
56. Yang B, Rice TW, Adelstein DJ i wsp. Overexpression of p53 protein associates decreased response to chemoradiotherapy in patients with esophageal carcinoma. *Mod Pathol* 1999; 12: 251-6.
57. Giatromanolaki A, Koukourakis M, Zaramboukas T i wsp. p53 and bcl-2 expression in locally advanced squamous cell head-neck cancer treated with platinum based chemotherapy and radiotherapy. *Anticancer Res* 1998; 18: 4685-92.
58. Ito T, Kaneko K, Makino R i wsp. Prognostic value of p53 mutations in patients with locally advanced esophageal carcinoma treated with definitive chemoradiotherapy. *J Gastroenterol* 2001; 36: 303-11.
59. Shimada H, Okazumi S, Takeda A i wsp. Presence of serum p53 antibodies is associated with decreased in vitro chemosensitivity in patients with esophageal cancer. *Surg Today* 2001; 31: 591-6.
60. Kitamura K, Saeki H, Kawaguchi H i wsp. Immunohistochemical status of the p53 protein and Ki-67 antigen using biopsied specimens can predict a sensitivity to neoadjuvant therapy in patients with esophageal cancer. *Hepatogastroenterology* 2000; 47: 419-23.
61. Puglisi F, Di Loreto C, Panizzo R i wsp. Expression of p53 and bcl-2 and response to preoperative chemotherapy and radiotherapy for locally advanced squamous cell carcinoma of the oesophagus. *J Clin Pathol* 1996; 49: 456-9.
62. Jezersek-Novakovic B, Frkovic-Grazio S, Novakovic S. The immunohistochemical and serological determination of p53 protein in patients with malignant lymphomas. *Neoplasma* 2002; 49: 16-20.
63. Bartkowiak J, Rieseke P. Porównanie wyników badań immunohistochemicznych i molekularnych w ustalaniu stanu strukturalnego i aktywności białka P53. *Nowotwory* 1999; 49: 439-44.
64. Shears LL, Ribeiro U, Kane J i wsp. Apoptosis in esophageal cancer following induction chemoradiotherapy. *J Surg Res* 1998; 79: 20-4.
65. Ikeguchi M, Maeta M, Kaibara N. Bax expression as a prognostic marker of postoperative chemoradiotherapy for patients with esophageal cancer. *Int J Mol Med* 2001; 7: 413-7.
66. LaCasse EC, Baird S, Korneluk RG i wsp. The inhibitors of apoptosis (IAPs) and their emerging role in cancer. *Oncogene* 1998; 17: 3247-59.
67. Kim YB, Kim GE, Cho NH i wsp. Overexpression of cyclooxygenase-2 is associated with a poor prognosis in patients with squamous cell carcinoma of the uterine cervix treated with radiation and concurrent chemotherapy. *Cancer* 2002; 95: 531-9.
68. Koukourakis MI, Giatromanolaki A, Kakolyris S i wsp. Nuclear expression of human apurinic/apyrimidinic endonuclease (HAP1/Ref-1) in head-and-neck cancer is associated with resistance to chemoradiotherapy and poor outcome. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 2001; 50: 27-36.
69. Munro AJ. An overview of randomized controlled trials of adjuvant chemotherapy in head and neck cancer. *Br J Cancer* 1995; 71: 83-9.
70. Dempke W, Voight W, Grothey A i wsp. Cisplatin resistance and oncogenes-a review. *Anti Cancer Drugs* 2000; 11: 225-36.
71. Fink D, Nebel S, Norris PS i wsp. Enrichment for DNA mismatch repair deficient cells during treatment with cisplatin. *Int J Cancer* 1998; 77: 741-6.
72. Costa S, Terzano P, Santini D i wsp. Neoadjuvant chemotherapy in cervical carcinoma: regulators of cell cycle, apoptosis, and proliferation as determinates of response to therapy and disease outcome. *Am J Clin Pathol* 2001; 116: 729-37.
73. Hsu CH, Chen CL, Hong RL i wsp. Prognostic value of multidrug resistance 1, glutathione-S-transferase-pi and p53 in advanced nasopharyngeal carcinoma treated with systemic chemotherapy. *Oncology* 2002; 62: 305-12.

Otrzymano: 12 czerwca 2003 r.

Przyjęto do druku: 26 września 2003 r.