

**Univerzita Karlova v Praze**  
**Lékařská fakulta v Hradci Králové**

**DISERTAČNÍ PRÁCE**

**Simona Paulíková**

**2014**

**Univerzita Karlova v Praze**  
**Lékařská fakulta v Hradci Králové**

Doktorský studijní program  
**Klinická onkologie a radioterapie**

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

***ATM* and *TGFβ1* polymorphisms in prediction of late complications of chemoreadiotherapy in patients with locally advanced cervical cancer**

**MUDr. Simona Paulíková**

Školitel: prof. MUDr. Jiří Petera, Ph.D.

Školitel konzultant: doc. MUDr. Renata Soumarová, Ph.D., MBA

Hradec Králové 2014

Obhajoba dne: .....

## **Prohlášení autora:**

---

### Prohlášení:

Prohlašuji tímto, že jsem doktorskou disertační práci zpracovala samostatně a že jsem uvedla všechny použité informační zdroje. Zároveň dávám souhlas k tomu, aby tato práce byla uložena v Lékařské knihovně Lékařské fakulty UK v Hradci Králové a zde užívána ke studijním účelům za předpokladu, že každý, kdo tuto práci použije pro svou publikační nebo přednáškovou činnost se zavazuje, že bude tento zdroj informací řádně citovat.

Souhlasím se zpřístupněním elektronické verze mé práce v informačním systému Univerzity Karlovy v Praze.

**Hradec Králové, září 2014**

---

## Poděkování:

---

Děkuji svému školiteli prof. MUDr. Jiřímu Peterovi, Ph.D. za odborné vedení, za rady a za pomoc při přípravě této práce. Dále také za vstřícný přístup a trpělivost v průběhu celého mého postgraduálního studia. Za korektury mé disertační práce i mých publikací dále děkuji své školitelce externistce doc. MUDr. Renatě Soumarové, Ph.D., MBA a doc. PharmDr. Martinu Beránkovi, Ph.D.

Dále děkuji všem kolegům z Kliniky Onkologie a Radioterapie FN v Hradci Králové, kteří mi byli jakkoli nápomocni při přípravě této práce, zejména pak MUDr. Igoru Sirákovi a MUDr. Zdeňku Zoulovi.

Také bych ráda poděkovala kolegům z Ústavu Klinické Biochemie a Diagnostiky a to prof. MUDr. Vladimíru Paličkovi, CSc., který umožnil vyšetření našich vzorků na svém pracovišti. Dále především kolegům z Úseku molekulární biologie a genetiky doc. PharmDr. Martinu Beránkovi, Ph.D. a Mgr. Monice Drastíkové za jejich rychlé a precizní zpracování vzorků a validizaci molekulárně biologických metod.

Za statistické zpracování výsledků děkuji doc. RNDr. Ladislavu Duškovi a Mgr. Michaele Cvanové z Institutu Biostatistiky a analýz Masarykovy Univerzity v Brně.

V neposlední řadě bych ráda poděkovala za podporu a trpělivost své rodině a to především své matce a manželovi.

Práce byla finančně podpořena projektem IGA MZ ČR - NT/11334 a projektem PRVOUK 37/11.

## **Použité zkratky:**

---

Arg – arginin

ATM – ataxia teleangiectasia mutated

ATR – ataxia teleangiectasia related

bHCG – beta human chorionic gonadotropin

BMI – body mass index

BRCA1 – breast cancer gene 1

BRT – brachyradioterapie

CA 125 – cancer antigen 125

cdC25A – Cell Division Cycle 25A

CEA – carcinoembryonal antigen

CIN – cervikální intraepiteliální neoplazie

COX2 – cyklooxygenáza 2

DNA – deoxyribonukleotidová kyselina

DSB – double strand breaks

EDTA – Ethylenediaminetetraacetic acid

EORTC – European Organisation for Research and Treatment of Cancer

HPV – human papiloma virus

HR – homologní rekombinace

HR HPV – high risk human papiloma virus

Chk2 – checkpoint kináza 2

CHT – chemoterapie

KO + diff. – krevní obraz s diferencíálním rozpočtem leukocytů

LEEP – loop electroexcisional procedure

LENT-SOMA – late effects in normal tissues subjective, objective, management and analytic scales

Mre11 – Meiotic recombination 11 homolog 1

MRI – magneická rezonance

NbS – Nijmegen breakage syndrome

NCCN – National Comprehensive Cancer Network

NHEJ – non-homologous end joining

PCR – polymerase chain reaction, polymerázová řetězová reakce

PET/CT – pozitronová emisní tomografie/počtačová tomografie

PI3/PI4 – phosphoinositide 3 (4) kinase, fosfatidylinositol-3, 4-fosfatázy

PS – performance status

RFLP – restriction fragment length polymorphism

RT – radioterapie

RTOG – Radiation Therapy Oncology Group

SCCA – squamous cell carcinoma antigen

SLN – sentinel lymphatic node, sentinelová uzlina

SMAD 2/3/4 – Mothers against decapentaplegic homolog 2/3/4

SNP – single nucleotide polymorphism

SSB – single strand breaks

TGF – transforming growth factor

UZ – ultrazvuk

VEGF – vascular endothelial growth factor

WHO – World health organisation

# 1 Obsah

2	Úvod: .....	9
3	Karcinom čípku děložního .....	11
3.1	Epidemiologie .....	11
3.2	Rizikové a prognostické faktory .....	13
3.2.1	Rizikové faktory .....	13
3.2.2	Prognostické faktory .....	14
3.3	Diagnostika, histopatologie a staging .....	15
3.3.1	Diagnostika .....	15
3.3.2	Histopatologie .....	16
3.3.3	Staging .....	18
3.4	Terapie karcinomu děložního čípku .....	21
3.5	Poléčebné sledování, komplikace a prognóza .....	25
3.5.1	Poléčebné sledování (follow up) .....	25
3.5.2	Prognóza .....	25
3.5.3	Poléčebné komplikace .....	26
3.6	Prevence a screening .....	30
4	Radiobiologické aspekty .....	33
4.1	Buněčný cyklus, jeho regulace a význam jednotlivých fází .....	33
4.2	Reakce buněk na poškození ionizujícím zářením .....	35
4.3	Radiosenzitivita a radiorezistence .....	37
5	Gen <i>ATM</i> – Ataxia – teleangiectasia mutated .....	39
5.1	Lokalizace genu, zařazení do proteinové rodiny a funkce .....	39
5.2	Mutace a polymorfismy genu <i>ATM</i> a buněčná radiosenzitivita .....	41
6	Gen <i>TGFβ1</i> – transforming growth factor β1 gen .....	44
6.1	Lokalizace genu, zařazení do proteinové rodiny a funkce .....	44
6.2	Polymorfismy genu <i>TGFβ1</i> a postiradiční nežádoucí reakce .....	47
7	Cíle disertační práce .....	49

8	Soubor nemocných, vyšetřovací metody .....	50
8.1	Pacienti .....	50
8.2	Léčba a sledování .....	51
8.3	Vyšetřovací metody - DNA analýza jednotlivých polymorfismů .....	52
8.4	Statistická analýza .....	54
9	Výsledky.....	56
10	Diskuze .....	63
11	Závěr.....	67
12	Osobní přínos doktoranda.....	69
13	Použitá literatura.....	70
14	Přílohy .....	83



## 2 Úvod:

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

Příčin maligních nádorových onemocnění je velké množství. Mezi nejčastěji zmiňované patří civilizační faktory (nezdravý životní styl, stres, nevhodná strava aj.), stále se zvyšující podíl fyzikálních a chemických toxických látek v životním prostředí, genetické predispozice daného jedince a především prodloužení průměrného věku obyvatelstva v důsledku zlepšení zdravotní péče. K trendu zvyšující se incidence u některých diagnóz také přispívá zvyšování kvality diagnostických metod. Mezi jedny z nejméně zkoumaných příčin v posledních desetiletích patří především faktory genetické.

Rozvoj molekulárně biologických a genetických metod pomohl objasnit mnohé mechanismy kancerogeneze, buněčného cyklu a patofyziologie nádorového onemocnění. Díky nim také došlo ke zlepšení a zpřesnění nádorového screeningu, stagingu i možnosti sledování pacientů v léčebném období. Umožnily také např. vznik nového oboru cílené terapie a jistě rozvoj imunomodulační léčby. V neposlední řadě jistě slouží dalšímu výzkumu ve všech oblastech onkologické prevence, diagnostiky a léčby.

Karcinom čípku děložního, na který je zaměřena tato práce, je třetím nejčastějším gynekologickým nádorovým onemocněním u žen v České republice. Dle posledních údajů z roku 2011 byla incidence 1023 nových případů invazivního karcinomu za rok a ve stejném roce zemřelo v důsledku tohoto onemocnění 399 žen. Pokud nedojde ke včasnému záchytu onemocnění (tedy do stadia IIA) nelze již pacientku léčit radikálním chirurgickým výkonem. Metodou volby se u takových žen stává radikální radioterapie – zevní radioterapie v kombinaci s brachyterapií a konkomitantní chemoterapií. Tato léčba umožňuje sice dobrou kontrolu nad chorobou, ale přináší s sebou možné riziko vzniku pozdních postiradiačních komplikací, které zvyšují morbiditu i mortalitu pacientek v léčebném období. Tyto komplikace se vyskytují u 10-15% takto léčených žen a prozatím nedokážeme jejich vznik nijak předem předpovídat. Nalezením vhodných prediktivních faktorů bychom tak mohli lépe předem

určit vyšší radiosenzitivitu pacientek a následně tak modulovat terapii, abychom těmto komplikacím předešli.

Dle dostupných údajů v literatuře za pozdní postiradiační reakce může vyšší radiosenzitivita tkání ozářováním léčených pacientek. V posledních letech byla jako příčina zvýšené senzitivity tkání zkoumána celá řada mutací genů, které zodpovídají především za reparační procesy poškozené DNA ionizujícím zářením. Nicméně vzhledem k tomu, že jde o sít' na sebe navazujících reakcí, které jistě nejsou všechny plně objasněny, nelze prozatím z dostupných vědeckých publikací přesně určit mutaci jediného genu, či mutace skupiny genů, které by byly zodpovědné za zvýšenou tkáňovou senzitivitu k ionizujícímu záření.

Teoretická oblast této práce je zaměřena především na epidemiologii, diagnostiku a léčbu karcinomu děložního čípku. Dále jsou uvedeny základní radiobiologické údaje sloužící k objasnění pochodů v nádorové populaci buněk po ozáření a základní teorie o radiosenzitivitě a radiorezistenci tkání. Další část pojednává o genech *ATM* a *TGFβ1*, především o jejich vlastním významu a významu jejich polymorfismů v rozvoji pozdní reakce tkání na ionizující záření s uvedením výsledků vědeckých publikací.

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

### 3 Karcinom čípku děložního

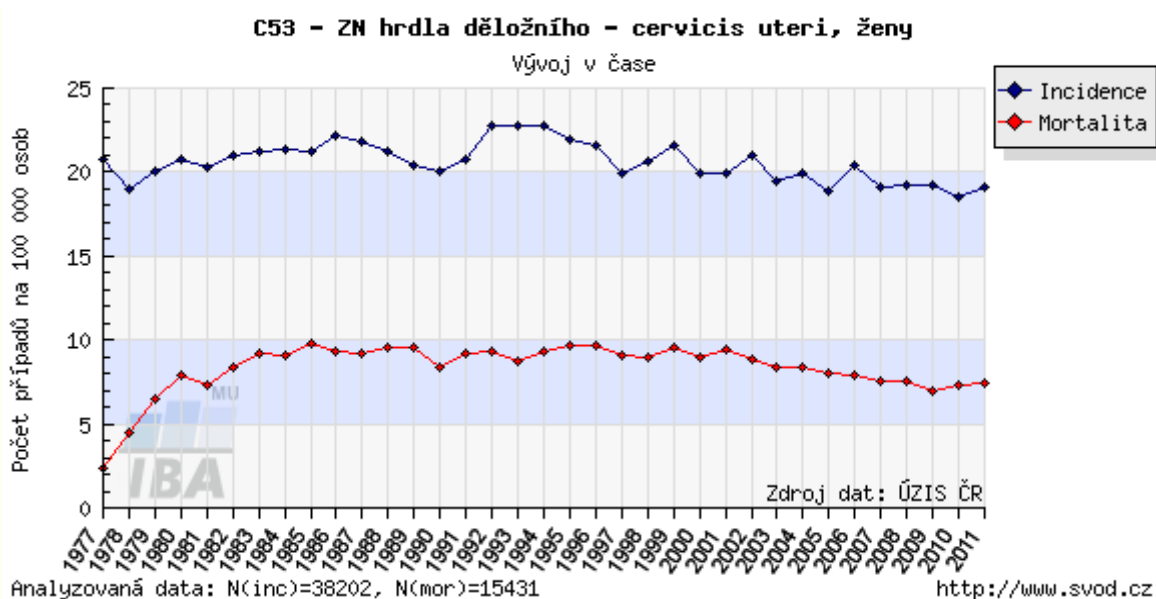
#### 3.1 Epidemiologie

Karcinom děložního hrdla je, dle posledních údajů, v České republice třetí nejčastěji se vyskytující nádorové onemocnění ženských pohlavních orgánů. Se svojí incidencí 19,1/ 100 000 obyvatel (obr. 1) se řadíme v evropském měřítku mezi země s největším výskytem tohoto onemocnění. Celosvětově potom zaujímáme 105. pozici. I přesto, že u celé řady ostatních nádorových diagnóz má incidence vzestupný charakter (kolorektální karcinom, karcinomy plic), u nádorů hrdla děložního je incidence stabilní.

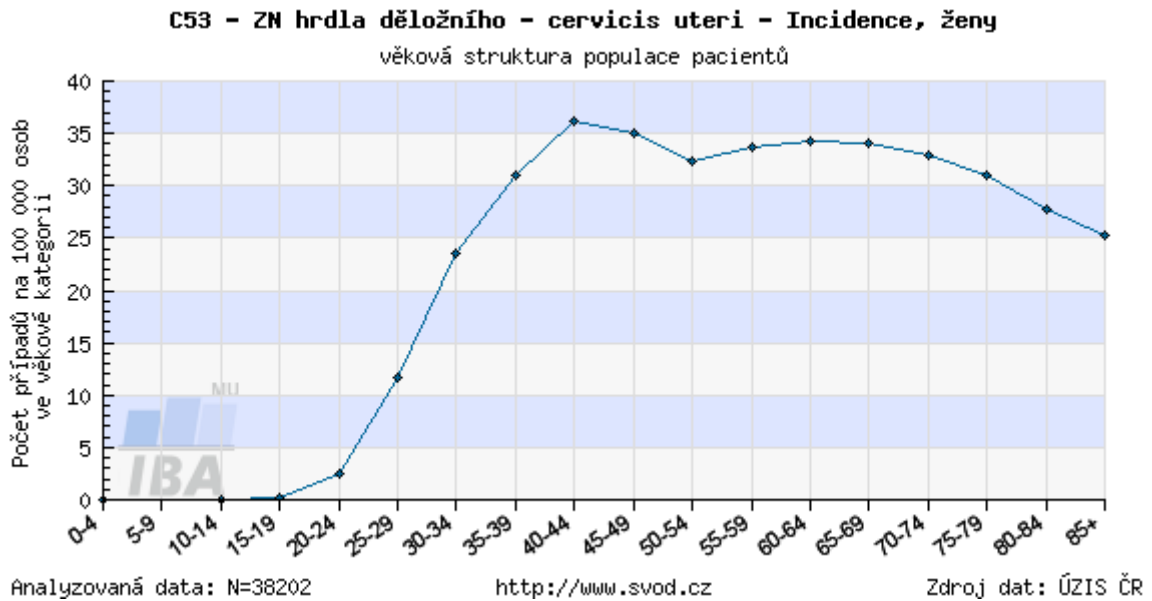
Mortalita činí u nádorů děložního hrdla 7,5 případů/ 100 000 obyvatel ročně a její tendence má dle posledních údajů mírně vzestupný charakter (obr. 1). Ve srovnání s dalšími evropskými státy je mortalita v ČR spíše na střední úrovni, v celosvětovém měřítku potom patříme k zemím s nižší mortalitou.

Dalším důležitým údajem je incidence tohoto typu nádoru dle věkových skupin, která prudce stoupá po 35. roce u žen mladších 40 let. Není to ale již nejvyšší vrchol výskytu tohoto onemocnění, ten dle posledních údajů spadá do věkového rozmezí 40–44 let, 45–49 let. Druhý vrchol výskytu spadá do věkových rozmezí 55–59 let, 60–64 let a 65–69 let, kde jsou rozdíly v incidenci minimální (obr. 2). Toto je změna oproti údajům z let minulých, kdy byl hlavní vrchol mezi 35.– 39. rokem a druhý vrchol mezi 60.– 65. rokem.

Obrázek č. 1: Incidence a mortalita na karcinom hrdla děložního v čase

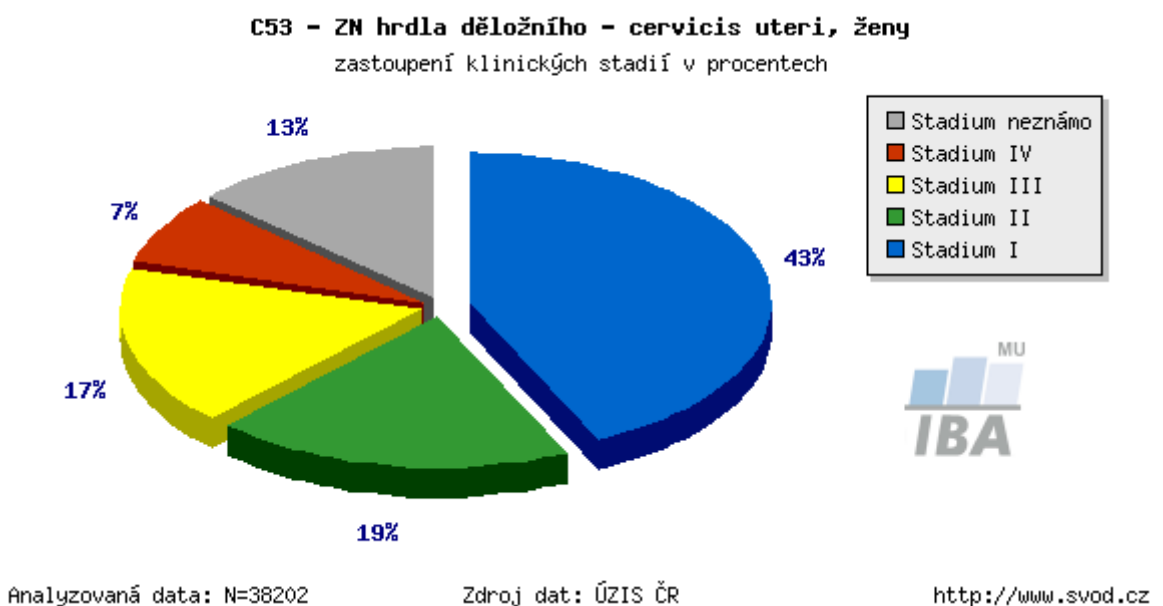


Obrázek č. 2: Incidence karcinomu hrdla děložního podle věku



Bohužel dlouhodobě přetrvává ještě vysoké procento pacientek, u kterých je diagnostikováno onemocnění v pokročilém stadiu. Toto procento činí přes 50% všech diagnostikovaných invazivních karcinomů děložního hrdla (obr. 3). Tyto alarmující hodnoty svědčí o pozdní diagnostice, která se odvíjí od absence dobře organizovaného screeningu, nekvalitních cytologických laboratoří, nedostatečném testování HPV a neexistence zpětné vazby ve smyslu kontroly pracovišť (Cibula et. al. 2009).

Obrázek č. 3: Zastoupení stádií onemocnění



## 3.2 Rizikové a prognostické faktory

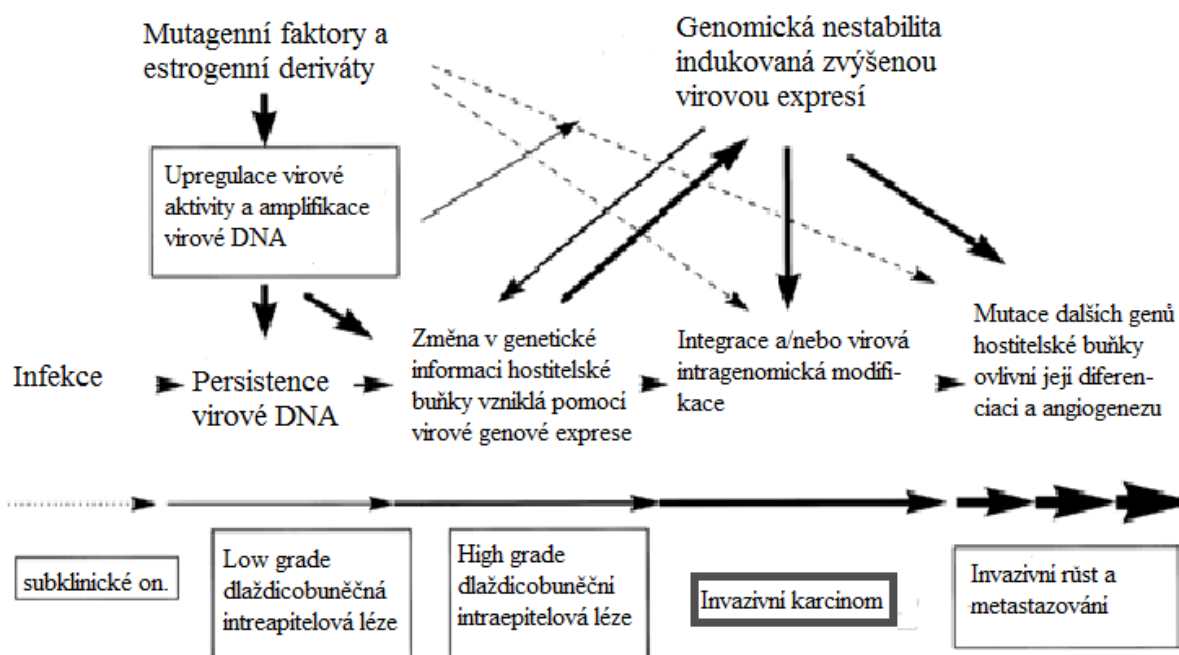
### 3.2.1 Rizikové faktory

Rizikové faktory pro rozvoj karcinomu děložního čípku souvisí především se sexuálním chováním žen. Hlavním rizikovým faktorem je infekce lidským papilomavirem s vysokým rizikem – HR HPV (high risk human papilloma virus). Vzhledem k tomu, že 99,7% případů karcinomu čípku děložního vykazuje pozitivitu HR HPV, lze ho již označit za faktor etiologický (Cibula et al. 2009). Nejvyšší riziko vzniku maligní transformace u buněk sliznice děložního čípku představují především HR typy 16 a 18, které se podílejí přibližně na 70% karcinomů. Promořenost naší populace tímto virem je zhruba 80% a svého maxima výskytu dosahuje před 25. rokem u sexuálně aktivních žen. Virus poté persistuje v epitelu děložního hrdla díky neschopnosti imunitního systému, který jej neumí zneškodnit. Samotná předstádia (prekancerózy) či následně invazivní karcinomy se objevují až po desetiletích od nákazy. Nicméně samotná perzistence viru nepostačuje k rozvoji kancerogeneze (obr. 4).

Dalšími rizikovými faktory jsou – časný začátek pohlavního života, větší počet sexuálních partnerů (10 a více), kouření (oslabuje slizniční imunitu), multiparita, nízký socioekonomický status, imunodeficitní onemocnění, nedostatečný příjem vitamínů, rodinná zátěž ze strany matky a užívání hormonální kontracepce, která podporuje transkripci a perzistenci viru v kombinaci s dalšími rizikovými faktory. Hormonální antikoncepce prokazatelně zvyšuje spíše riziko vzniku adenokarcinomů než převážně se vyskytujícího spinocelulárního karcinomu. Po jejím vysazení se riziko normalizuje až za 10 let (Cibula et al. 2009).

Jedním z velmi důležitých rizikových faktorů je zanedbávání pravidelného každoročního cytologického screening s expertní kolposkopií. Bohužel screening není v České republice prozatím dobře organizován (popsáno v části 2.1) a výsledkem je přetrvávající vysoká incidence karcinomu cervixu. Příkladem nutnosti lepší organizace screeningu tohoto nádorového onemocnění jsou některé evropské státy (např. Finsko), kde zvýšená screeningová účast sledované populace tuto incidenci prokazatelně snížila.

Obrázek 4: Schéma rozvoje nádorového onemocnění asociovaného s vysoce rizikovými typy HPV (upraveno dle H zur Hausen et al. 2000).



### 3.2.2 Prognostické faktory

Většina hlavních prognostických faktorů je zahrnuta v samotném stagingu onemocnění a vyjádřena pomocí TNM a FIGO klasifikace. Patří mezi ně především rozsah nádoru, postižení regionálních mízních uzlin (jejich počet a velikost metastáz), postižení paraaortálních mízních uzlin a invaze do parametrií či šíření na poševní stěnu. Jako prognosticky negativní se jeví tumory většího rozsahu (T), s pozitivním postižením lymfatických uzlin (pokud se zjistí peroperačně, klesá šance na pětileté přežití z 90 na 30%), větší velikosti (u pacientek s tumorem větším než 4 cm je sníženo 10leté přežití na pouhých 13% (Mouková et al.), a jako velmi silný negativní prediktivní faktor se jeví bilaterální postižení parametrií oproti unilaterálnímu (Siuhami et al., G C de Toit et al. 1997)

Mezi další negativní prognostické faktory patří – šíření tumoru do oblasti děložního isthmusu a děložního těla, invaze do krevních a lymfatických cév (prognosticky horší je angioinvaze), intraperitoneální šíření, histopatologický grading, který má větší prognostický význam u adenokarcinomů, u časných stádií spinocelulárního karcinomu je to hodnota SCCA markeru před léčbou. Prognózu také významně ovlivňuje adekvátní radikalita operačního výkonu a kvalitně

provedená radioterapie, proto je nutné péči o tyto pacienty přenechat specializovaným onkologickým centrům, kde je zajištěna komplexní léčba. Do budoucna se mezi prognostické faktory ovlivňující adjuvantní léčbu u pacientek s méně pokročilým tumorem pravděpodobně zařadí význam mikrometastáz sentinelových uzlin, průkaz mikrometastáz o velikosti menší než 0,2 mm a izolace nádorových buněk či trombů v lymfatických cévách. Vzhledem k rozvoji molekulárně biologických technik bude stoupat význam stanovení biomolekulárních markerů (např. overexprese genů p53, p16, p21, která se zdá dle literatury negativním prognostickým faktorem, taktéž overexprese genů COX2 či VEGF aj.). Další výzkum této oblasti pravděpodobně povede k vytvoření nových prognostických kritérií, která nám pomohou predikovat biologické chování nádorů. Budeme tak schopni lépe diferencovat např. agresivnější typy tumorů a zvolit intenzivnější terapii či zvážit benefit jednotlivých léčebných modalit u konkrétních pacientek (příkladem je nedávne zavedení ONCOTYPE DX testu u pacientek s karcinomem prsu).

### **3.3 Diagnostika, histopatologie a staging**

#### **3.3.1 Diagnostika**

V rámci preventivního screeningového programu karcinomu děložního čípku je pacientce jednou ročně provedeno gynekologické vyšetření pomocí prebioptických metod (kolposkopie, cytologický stěr a fakultativně test na HR HPV subtypy) doplněné pohmatovým vyšetřením, vyšetřením zevních rodidel a gynekologickým ultrazvukem. Pokud některé z těchto vyšetření ukáže podezření na prekancerózu či karcinom, následuje cílená biopsie (provádí se buď punch biopsie, endocervikální kyretáž, nebo LEEP excize nebo lze provést diagnostickoterapeutický výkon – konizaci či cylindrickou disekci cervixu). Pokud je výsledek biopsie pozitivní, následovat by měla standardní stagingová vyšetření, která jsou uvedena v tabulce 1.

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

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

Dle výsledku výše popsaných vyšetřovacích metod je určeno stádium zhoubného procesu, na jehož základě se dále odvíjí celý terapeutický proces. Rozhodovat o typu léčby by měl vždy tým skládající se z gynekologa, klinického a radiačního onkologa, klinického patologa a eventuálně radiodiagnostika, jelikož, kvalitně provedený a určený staging s následně dobře zvolenou terapií patří k důležitým prognostickým faktorům.

### 3.3.2 Histopatologie

Převážná většina diagnostikovaných primárních tumorů hrdla děložního jsou tumory epitelové s převahou dlaždicobuněčného karcinomu, který tvoří 60-80% všech karcinomů této oblasti. Dalších 10-15% tvoří adenokarcinomy různých typů a zbytek pak představují vzácné tumory např. adenosquamózní karcinomy, adenoidně cystické karcinomy, nádory s neuroendokrinní sekrecí atd. V tabulce č. 2 je přehled histopatologické klasifikace nádorů děložního hrdla. Zajímavostí je, že v zemích, kde se vzhledem ke kvalitnímu screeningu snižuje incidence karcinomu hrdla děložního, klesá podíl karcinomů dlaždicobuněčných, ale zvyšuje se výskyt adenokarcinomů (Cibula et al. 2009). Za příčinu se udává horší detekovatelnost adenokarcinomů při cytologickém screeningu (vyrůstají většinou endocervikálně).

Dlaždicobuněčný karcinom můžeme dle histologického obrazu rozdělit na několik subtypů. Mezi základní patří dělení na rohovější a nerohovější, další varianty jsou již méně časté – bazaloidní, verukózní, kondylomatózní, papilární, lymphoepitelioma- like a skvamotranzicionální. Toto rozdělení na histologické



subtypy má význam především prognostický. Mezi ty s velmi dobrou prognózou patří typ verukózní a kondylomatózní, dobrou prognózu mají také rohovějící, nerohovějící a papilární. Špatnou prognózu má agresivní bazaloidní dlaždicobuněčný karcinom.

Tumory ze žláznatého epitelu jsou heterogenní skupinou nádorů. Nejčastěji se vyskytujícím adenokarcinomem je mucinózní, představuje 50-60% všech adenokarcinomů cervixu. Dělen je na několik subtypů, z nichž nejčastější je právě endocervikální typ, který představuje 70% mucinózních adenokarcinomů. Jde o nádor s velmi dobrou prognózou, který téměř nemetastazuje. Druhým nejčastějším typem adenokarcinomu je endometrioidní adenokarcinom. Představuje 30% všech diagnostikovaných adenokarcinomů této oblasti a je histologicky shodný s endometriodním adenokarcinomem dělohy a jiných oblastí. Bývá proto někdy obtížné zjistit, zda jde o primární tumor cervixu nebo prorůstající tumor z dělohy. U pacientek s adenokarcinomem je často pozorován v jednom vzorku výskyt více než jednoho subtypu adenokarcinomu. Jako smíšený adenokarcinom jej můžeme označit tehdy, když minoritní složka zahrnuje více jak 10% objemu nádoru.

Skupina dalších epitelových malignit hrdla děložního zahrnuje celou řadu vzácných nádorů. Z nich nejčastěji se vyskytujícím je adenoskvamózní karcinom, jeho málo diferencovanou variantou je nádor z „matnicových buněk“, který je agresivní a má špatnou prognózu. Dalším již vzácněji zastoupeným je adenoidně cystický karcinom se špatnou prognózou a adenoidně bazocelulární karcinom, který bývá dobře diferencovaný a mívá prognózu příznivou.

Z mezenchymálních tumorů bývá nejvíce zastoupen leiomyosarkom a ze smíšených mezenchymálních a epiteliálních nádorů vzácný maligní smíšený mülleriánský tumor.

Závěr každého histopatologického vyšetření bioptického vzorku by měl vždy uvádět histologický typ nádoru, stupeň diferenciac (grade), hloubku invaze do stromatu a vyjádření o lymfangioinvazi. U stádií Ia1 a Ia2 je nutno dodat rozměr léze. Pokud šlo o konizát, potom popis okrajů preparátu a to jak laterálních, tak proximálního okraje v kanále hrdla děložního.

Tabulka č. 2: Histopatologická klasifikace nádorů hrdla děložního (Cibula et al. 2009)

	<b>Histologický typ</b>	<b>M kód</b>
<b>Epitelové nádory</b>		
z dlaždicobuněčného epitelu	dlaždicobuněčný karcinom	8070/3
	mikroinvazivní dlaždicobuněčný karcinom	8076/3
žlazové nádory	mucinózní adenokarcinom	8480/3
	endometriodní adenokarcinom	8380/3
	světlebuněčný adenokarcinom	8310/3
	serózní adenokarcinom	8441/3
	mezonefrický adenokarcinom	9110/3
ostatní epitelové nádory	adenoskvamózní karcinom	8560/3
	karcinom z matnicových buněk	8015/3
	malobuněčný karcinom	8041/3
	nediferencovaný karcinom	8020/3
	adenoidně cystický karcinom	8200/3
	adenoidně bazocelulární karcinom	8098/3
<b>Mezenchimální nádory</b>	leiomyosarkom	8890/3
	nediferencovaný endocervikální sarkom	8805/3
	endometriální stromální sarkom, low grade	8931/3
<b>Smišené epitelové a mezenchymální nádory</b>	karcinosarkom /smíšený maligní müllerianský nádor)	8980/3
	adenosarkom	8933/3
	Wilmsův tumor	8960/3
<b>melanocytární nádory</b>	maligní melanom	8720/3

### 3.3.3 Staging

K určení pokročilosti a stádia karcinomu děložního čípku používáme dvě hlavní klasifikace a to klasifikaci TNM a FIGO. Zohledňuje se v nich především velikost tumoru, postižení okolních orgánů, lymfatických uzlin a výskyt vzdálených metastáz. Prozatím o stádiu onemocnění nerozhoduje v TNM klasifikaci uvedená stromální invaze, dále stádium neovlivňuje ani lymfangioinvaze, stupeň postižení parametrií, poměr velikosti tumorózní léze k objemu cervixu či rozlišení stupně postižení stěny rekta a močového měchýře.

TNM klasifikace hodnotí velikost primární léze, postižení regionálních mízních uzlin a výskyt vzdáleným metastáz dle následujícího schématu.

#### **Hodnocení primární léze**

TX – stádium primárního tumoru nelze hodnotit

T0 – bez známek primárního tumoru

Tis – karcinom in situ (CIS)

T1 – karcinom hrdla děložního omezený na dělohu

T2 – nádor se šíří mimo dělohu, ale ne ke stěně pánevní nebo na dolní třetinu pochvy

T3 – nádor se šíří ke stěně pánevní, postihuje dolní třetinu pochvy, nebo způsobuje hydronefrózu či afunkci ledviny

T4 – nádor postihuje sliznici močového měchýře, rekta, nebo se šíří mimo malou pánev.

### **Hodnocení regionálních mízních uzlin**

Mezi regionální mízní uzliny řadíme uzliny – paracervikální, parametriální, hypogastrické (vnitřní ilické i obturatorní), společné a zevní ilické, presakrální a laterální sakrální.

NX – regionální uzliny nelze hodnotit

N0 – v regionálních uzlinách nejsou metastázy

N1 – metastázy v regionálních mízních uzlinách

Pro označení pN0 je nutné provedení pánevní lymfadenektomie s vyšetřením více jak 10 lymfatických uzlin. Pokud není dosaženo dostatečného počtu vyšetřených uzlin, uvádí se pNX.

### **Hodnocení vzdálených metastáz**

MX – vzdálené metastázy nelze hodnotit

M0 – nejsou vzdálené metastázy

M1 – vzdálené metastázy přítomny

Nejčastěji metastazuje karcinom děložního čípku do paraaortálních a mediastinálních lymfatických uzlin, do plic a skeletu.

Klasifikaci TNM uvedena v tabulce č. 3, rozdělení do stádií dle TNM klasifikace potom zobrazuje tabulka č. 4.

Klasifikace FIGO je založena na klinických vyšetřeních, ačkoliv je v poslední revizi zřejmý posun ke klasifikaci na základě histopatologického vyšetření

preparátů získaných chirurgickým stagingem.

FIGO klasifikace člení onemocnění do základních 4 stádií:

**Stádium I** – časné onemocnění omezené na primární orgán

**Stádium II** – onemocnění s lokální progresí mimo primární orgán postihující přilehlé tkáně

**Stádium III** – onemocnění s extenzivnějším, avšak lokálním šířením

**Stádium IV** – metastatické onemocnění

Další podrobnější rozdělení jednotlivých stádií uvedeno v tabulce č. 3.

Tabulka č. 3: Souhrn klasifikací TNM a FIGO (Cibula et al. 2009)

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

Tabulka č. 4: Stádia nádoru děložního čípku dle TNM klasifikace (Cibula et al. 2009)

<i>Stádium</i>	<i>TNM</i>
0	Tis N0 M0
IA	T1a N0 M0
IA1	T1a1 N0 M0
IA2	T1a2 N0 M0
IB	T1b N0 M0
IB1	T1b1 N0 M0
IB2	T1b2 N0 M0
IIA	T2a N0 M0
IIA1	T2a1 N0 M0
IIA2	T2a2 N0 M0
IIB	T2b N0 M0
IIIA	T3a N0 M0
IIIB	T1, T2, T3a N1 M0, T3b jakékoli N0M0
IVA	T4 jakékoliv N M0
IVB	jakékoliv T jakékoliv N M1

### 3.4 Terapie karcinomu děložního čípku

Chirurgický výkon je považován za dominantní léčebnou modalitu především časných stádií karcinomu hrdla děložního (tedy do stádia IIA). V posledních letech je kladen v této oblasti především důraz na modifikaci radikality výkonů s ohledem na prognostické faktory a přání pacientky ohledně zachování fertility. Hlavním cílem je redukce morbidity, která významně ovlivňuje kvalitu života odléčených pacientek. V těchto stádiích je alternativou k chirurgickému výkonu radikální radioterapie. Indikována je v případech, kdy se pacientka nemůže především vzhledem k interkurentním onemocněním či vzhledem k celkovému stavu a věku podrobit operačnímu výkonu, nebo jde o její výslovné přání. Jako metoda volby se nepoužívá především kvůli postiradiačním komplikacím, které nemocným zhoršují kvalitu především sexuálního života a také kvůli ozáření ovarií. I přes tyto uváděné možné komplikace se radikální radioterapie dostává dle posledních studií do popředí již od stádia IB2, a to vzhledem ke zlepšujícím se technikám radioterapie, které umožňují větší šetření zdravých tkání, čímž je výskyt těchto komplikací zmírněn.

Metodou volby od stádia IIB, kdy nádor přerůstá pericervikální fascii a postihuje parametria se stala radikální chemoradioterapie. V posledních letech však není úplně jednotný názor na operabilitu tohoto stádia. V některých

centrech, pokud nejsou potvrzeny vzdálené metastázy či invaze do okolních orgánů, se operují i stádia s invazí do parametrií se současnou pánevní lymfadenektomií. Pro tento postup hovoří argumenty, které udávají zabránění pozdním komplikacím po radioterapii, zachování ovariální funkce (provádí se radikální hysterektomie), poskytnutí spolehlivého stagingu lymfatických uzlin s odstraněním těch metastaticky postižených a snížení rizika recidiv u radiorezistentních nádorů. Nicméně proti hovoří to, že velká část pacientek po operaci stejně podstupuje adjuvantní radioterapii, což výrazně zvyšuje riziko poléčebných komplikací a zvyšuje dlouhodobou morbiditu pacientek. Vzhledem k tomu, že ještě není dostatek studií, které by srovnávaly prognózu a morbiditu pacientek léčených chirurgicky a pacientek léčených radioterapií, nelze jednoznačně říci, která z metod je metodou volby. Nicméně standardem v České republice zůstává radikální chemoradioterapie a k tomuto způsobu léčby se přiklání i NCCN doporučení.

#### Stádium 0 (karcinom in situ)

Hlavní léčebnou modalitou je konizace. Pokud nedosahuje tumor k okrajům, či do apexu konusu nebo nezůstala část tumoru v hrdle a není sporná invazivita tumoru, je postačujícím výkonem. Hysterektomii lze zvolit tehdy, když si žena nepřeje další těhotenství, děloha je myomatózní, nebo nelze provést konizaci z výše popsanych důvodů.

#### Stádium IA1

Pokud si žena přeje zachovat fertilitu, pak je dostačujícím výkonem konizace, pokud nádor nevykazuje angioinvasi či nejsou pozitivní okraje. Při angioinvasi, nebo pozitivitě okrajů se provádí trachelektomie s laparoskopickou lymfadenektomií a pokud jsou uzliny pozitivní je indikována hysterektomie dle Wertheima a Meigse. Jinak je indikován konzervativní chirurgický výkon – extrafasciální hysterektomie, pokud si nemocná nepřeje další těhotenství. Pokud nelze tumor řešit operačně, je metodou volby samostatná brachyterapie.

#### Stádium IA2, IB1, non bulky IIA

V těchto stádiích již má chirurgická léčba srovnatelné výsledky s radikální chemoradioterapií, proto závisí na zvyklosti centra, která z metod převažuje. U

pacientek mladších je indikována radikální hysterektomie dle Wertheima - Meigse s pánevní a event. paraaortální lymfadenektomií. Pokud jsou uzliny pozitivní, je indikována adjuvantní radioterapie. U žen přejících si zachování fertility (pouze u st. IA2, IB1) lze provést radikální trachelektomii s pánevní a event. paraaortální lymfadenektomií.

Radioterapie se provádí jako kombinovaná radikální léčba (zevní radioterapie + brachyterapie). K radioterapii lze přidat komkomitantní chemoterapii (nejčastěji cisplatinu). U stadia IA2 můžeme provést i samostatnou brachyterapii.

#### Stádium IB2 a bulky IIA

Metodou volby od tohoto stádia je radikální kombinovaná radioterapie s konkomitantní chemoterapií. Operační řešení je též možné, provádí se radikální hysterektomie dle Wertheima a Meigse, která je nutno doplnit adjuvantní radioterapií. Takto kombinovaná léčba zvyšuje morbiditu v léčebném období, proto se dává přednost chemoradioterapii.

#### Stádium IIB, IIIA, IIIB

Zde obdobně jako u předchozích dvou stádií je dávána přednost radikální chemoradioterapii. U pacientek, které radioterapii podstoupit nechtějí, můžeme zvážit radikální hysterektomii s pánevní a paraaortální lymfadenektomií.

#### Stádium IVA

Dle stavu pacientky zvážíme buď samostatnou radioterapii, nebo chemoradioterapii s cílem radikálním či paliativním.

#### Stádium IVB

V tomto stádiu lze provádět již pouze léčbu paliativní. Její rozsah a typ závisí na celkovém stavu nemocné. Jedná se buď o chemoterapii nebo o radioterapii, cílem je zejména udržení dobré kvality života pacientky.

Při zvažování léčebné strategie pacientek od stadia IB2 výše musíme provést radiologický staging uzlin (CT břicha, MRI, nebo PET/CT). Jakmile je nález pozitivní, je u pacientek indikována chemoradioterapie. Pokud je negativní, pak

se provádí k vyloučení positivity pánevní a event. paraaortální laparoskopická lymfadenektomie.

Důležitá je i správná indikace adjuvantní (poooperační) radioterapie, která by měla být provedena vždy u radikálně odoperovaných pacientek s rizikovými faktory a to 1) u stadia pT1b1 s infiltrací více než 2/3 stromatu hrdla děložního, 2) u stadia pT1b2, pT2a a u vyšších stádií, 3) při lymfangioinvazi, 4) u pozitivních uzlin, 5) v případě těsných či pozitivních okrajů manžety poševní, 6) při neadekvátní operaci (zejména pNX) od T1a2 výše. Provádí se zevní radioterapie pánve v dávce 45 Gy na oblast poševního pahýlu, parametrií, presakrálních, zevních, vnitřních a případně i společných ilických uzlin (u N1). Radioterapie se při pozitivních uzlinách, pozitivním resekcčním okraji či šíření nádoru do parametrií kombinuje s konkomitantním podáním cisplatin. Pokud jsou postiženy společné ilické uzliny ozařujeme i paraaortální uzliny po úroveň renálních tepen, v případě postižení paraaortálních uzlin k hornímu okraji Th12. Pokud jsou u pacientky postižena parametria, jsou pozitivní resekcční okraje, či je postižení proximální pochvy, kombinujeme zevní radioterapii s brachyterapií, pokud to stav nemocné dovolí. Používá se aplikace vaginálních ovoidů (kolpostatu) nebo vaginálního válce do apexu pochvy a cílem je ozáření vaginální jizvy, horní třetiny vaginy a části parametrií.

Závěrem zmínka o terapii recidivujícího onemocnění. Ta závisí především na tom, jaká byla užitá léčba primární, dále na tom, kde se recidiva vyskytla a především na stavu pacientky. Operační řešení se uplatňuje hlavně u pacientek léčených primárně radioterapií nebo u těch, které podstoupily konzervativnější chirurgické výkony (dle stavu nemocné lze použít až exenterační výkony). Dále můžeme použít cílenou radioterapii u pacientek, které ji v předchozí léčbě nepodstoupily, ale lze užít i reiradiaci u nemocných s předchozí radioterapeutickou léčbou. Kombinovat můžeme zevní radioterapii s brachyterapií či chemoterapií. Pokud je recidivující onemocnění rozsáhlého a metastazujícího charakteru užíváme pouze paliativní chemoterapii i radioterapii s cílem zachování co nejlepší kvality života, nebo s ohledem na zdravotní stav pacientky postupujeme pouze symptomaticky.



### 3.5 Poléčebné sledování, komplikace a prognóza

#### 3.5.1 Poléčebné sledování (follow up)

Cílem poléčebného sledování pacientek je včasné zachycení možné recidivy onemocnění, dále včasná diagnostika sekundárních tumorů a poléčebných komplikací ve sledované oblasti. Jednou z hlavních příčin recidivujícího onemocnění je perzistující HPV. Nejčastěji se objevují recidivy do dvou let od prodělané léčby, nicméně až 11% případů se manifestuje i po 5. roce od ukončení terapie (Cibula et al. 2009). V prvním roce by měly být pacientky vyšetřeny nejprve po 4 týdnech od ukončení terapie a následně docházet na kontroly každé tři měsíce. V rámci této kontroly je jim provedeno fyzikální a gynekologické vyšetření, provedeny fakultativně odběry markerů SCCA (u spinocelulárních karcinomů), nebo CA 125 a CEA (u adenokarcinomů). Ultrazvuk pánve a ledvin v prvních dvou letech je indikován každé 3–6 měsíce, poté jen 1x ročně. Ze zobrazovacích vyšetření se provádí RTG srdce a plic 1x ročně a fakultativně CT břicha a pánve, MRI pánve nebo PET/CT.

Odběr SCCA není prozatím součástí povinných restagingových vyšetření, nicméně dle dostupné literatury, jeho zvýšené hladiny předchází o několik měsíců klinickou manifestaci recidivy. Tento marker může také pomoci při rozlišení postiradiační fibrózy od skutečné recidivy.

#### 3.5.2 Prognóza

Včasné zachycení karcinomu děložního čípku dává pacientkám velkou naději na úplné vyléčení. S pokročilostí choroby se však jejich prognóza zhoršuje. Bohužel, jak je popsáno v části o epidemiologii, převažuje počet pacientek, které mají v době diagnózy již onemocnění v pokročilém stádiu. Nejvýznamnějším a prognózu nejvíce zhoršujícím faktorem je samotná velikost primárního tumoru a hlavně postižení lymfatických uzlin. Důležitým faktorem ovlivňujícím prognózu pacientek je také správně zvolená a hlavně kvalitně provedena terapie (chirurgické výkony, plánování a aplikace radioterapie). V neposlední řadě závisí prognóza na agresivitě samotného tumoru, celkovém stavu pacientky a její spolupráci. V tabulce č. 5 je uvedeno pětileté přežití pacientek ve vztahu ke stádiu onemocnění.

Tabulka č. 5: Prognóza s ohledem na stádium onemocnění

<b>Ca in situ (TIS)</b>	trvalé vyléčení u 100%	5–ti leté přežití
<b>Stádium I</b>	75 – 90%	81,6%
<b>Stádium II</b>	50 – 70%	61,3%
<b>Stádium III</b>	30 – 40%	36,7%
<b>Stádium IV</b>	10 – 15%	12,1%

### 3.5.3 Poléčebné komplikace

Vznik nežádoucích reakcí po léčbě závisí u pacientek s karcinomem děložního čípku především na pokročilosti onemocnění při diagnóze, která rozhoduje o užití vhodné léčebné metody a hlavně na celkovém stavu pacientky před léčbou.

Vzhledem k tomu, že u časných stádií dáváme přednost léčbě chirurgické a u stádií pokročilejších zase převládá chemoradioterapie, dělíme poléčebné komplikace na chirurgické, postiradiační a postchemoterapeutické. Dále dle doby vzniku od ukončení léčby můžeme dělit komplikace na časně a pozdní. Vzhledem k zaměření disertační práce budou chirurgické komplikace zmíněny jen ve stručném přehledu, více rozebrány budou nežádoucí reakce po onkologické léčbě.

Rozvoj chirurgických komplikací závisí především na rozsahu výkonu (na radikalitě), na komorbiditách pacientky a hlavně na erudici centra provádějícího operační léčbu. Rozdělujeme je na peroperační, časně a pozdní pooperační. Nejčastější peroperační komplikací, a to hlavně při radikální hysterektomii, je krevní ztráta. Postihuje asi 5% pacientek a v dnešní době je mortalita z této příčiny již vzácná. V časném pooperačním období se nejčastěji vyskytují urologické komplikace, jako je hypotonie močového měchýře, která prodlužuje nutnost ponechání Foleyova katétru (15–76%). Méně často se vyskytují vaskulární příhody (3–5%) – trombóza, krvácení, embolizace, což jsou život ohrožující stavy, ty už mají mortalitu vyšší. V pozdním pooperačním období se objevují komplikace předně v souvislosti s provedeným výkonem v pánvi a v souvislosti s provedenou lymfadenektomií. Ty nejčastěji se vyskytující jsou: 1) urologické – přetrvávající hypotonie močového měchýře, tvorba píštělí, inkontinence moči, 2) intestinální – subileózní a ileózní stavy, 3) lymfovaskulární – nejčastější jsou lymfedémy dolních končetin, trombembolické

příhody z pánevních žil a 4) komplikace spojené s hojením sutury – hematomy, abscesy ve stěně břišní, hernie. Velmi důležitými pozdními komplikacemi, které ovlivňují kvalitu života žen po chirurgické léčbě, jsou sexuální dysfunkce.

V pooperačním období udává potíže se sexuální dysfunkcí 75% žen a přibližně 15% pacientek svůj sexuální život po léčbě úplně ukončí (Cibula et al 2009).

Onkologická terapie vzhledem ke svému širokému spektru způsobuje celou řadu nežádoucích reakcí. Netýká se totiž pouze tkání postižených tumorem, ale často ovlivňuje celou řadu pochodů, které se dříve či později projeví na zdravých tkáních jak v přímém okolí tumoru, tak i na tkáních vzdálených (např. nežádoucí reakce chemoterapie ve smyslu myelopatie atd.).

Již při plánování radioterapie musí radiační onkolog dle hodnot tolerančních dávek zdravých tkání rozhodnout o dávce, která bude aplikována do cílového objemu s minimálním zasažením kritických orgánů. U karcinomu děložního čípku jsou hlavními kritickými orgány močový měchýř, rektum a tenké střevo. Pokud je nutné ozařované pole rozšířit a ozařovat oblast paraaortálních uzlin, přidává se k nim ještě mícha a ledviny. I přesto, že vývoj radioterapie již především díky IMRT, přesnějšimu plánování radioterapie, umožňuje výrazně snížit dávku aplikovanou na kritické orgány, zůstávají nežádoucí reakce na ozáření limitujícím faktorem léčby.

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

Dalším a prakticky nejvyužívanějším dělením postiradiačních reakcí je rozdělení dle rychlosti jejich nástupu – na časné a pozdní. Toto dělení ale nezávisí tak na době vzniku, jako na patofyziologickém mechanismu účinku ionizujícího záření na určité typy tkání. Tomuto mechanismu se věnuje kapitola o radiobiologii tkání.

*Časné poradiační reakce* se týkají především tkání s rychlou obměnou buněk. Jde tedy především o sliznice, kůži a kostní dřeň. Je to způsobeno tím, že buňky těchto tkání mají kratší buněčný cyklus a reagují tak na poškození ionizujícím zářením dříve. U pacientek s karcinomem děložního čípku nejčastěji pozorujeme lokální časné účinky v podobě poradiační dermatitidy v oblasti třísel, perinea a crena ani, jednotlivé stupně postižení jsou popsány spolu s dalšími v tabulce č. 6. Další často se vyskytující jsou reakce na sliznici pochvy v podobě edému a epitelolýzy s fibrinovými nálety (tzv. špekovitá reakce). Mezi velmi frekventované příznaky časné reakce na ozáření patří urologické příznaky – dysurické obtíže, hematurie, nykturie a z gastroenterologických příznaků to jsou především průjemy, nadýmání, tenezmy, bolesti břicha, rektorhagie a při ozařování v oblasti horního břicha pak nechutenství, nauzea a zvracení. V podstatě jde o aseptické záněty sliznic, které se ale často rychle bakteriálně infikují a mohou komplikovat samotnou léčbu zářením např. rozvojem sepse. K dalším již systémovým časným reakcím řadíme hematologické reakce. Tyto se zvláště vyskytují u pacientek léčených kombinací chemoterapie a radioterapie. Proto je během léčby nutné u pacientek sledovat pravidelně hodnoty krevního obrazu (KO) s diferenciálním počtem leukocytů. Pozorované poklesy se týkají především erytrocytů, trombocytů a leukocytů. Nejzávažnějším stavem je pokles počtu neutrofilů pod  $0,5 \times 10^9$  tzv. febrilní neutropenie, která patří k jedněm z akutních stavů v onkologii. Závažnost reakcí se posuzuje dle pětistupňové škály RTOG, RTOG/EORTC kritérií, nebo dle LENT-SOMA skórovacího systému. Příklad RTOG/EORTC klasifikace viz. přílohy (tabulka č. 6).

Léčba časných nežádoucích reakcí spočívá především v lokálním ošetřování poškozené kůže a sliznic, v podávání antiemetik, antidiarhotik a antibiotik. Pokud dojde k výrazným poklesům krevních elementů, pak je nutná suplementace krevních derivátů a jsou podávány růstové faktory. Zásadní pro další pokračování léčby je i podpůrná terapie v podobě hydratace, sledování příjmu stravy s následným využitím nutriční podpory a správně vedená analgoterapie.

*Pozdní nežádoucí efekty* radioterapie postihují tkáně, jejichž buňky mají dlouhotrvající buněčný cyklus a reagují tedy s větším zpožděním na poškození ionizujícím zářením. Bohužel buňky těchto tkání mají také nízkou schopnost regenerace, a proto změny v dané tkáni bývají většinou ireverzibilní. Toto je hlavní limitující faktor aplikace radioterapie. Frekvence výskytu pozdních

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

Postchemoterapeutické nežádoucí účinky zahrnují velké množství akutních i pozdních komplikací a podrobnější popis jistě přesahuje rámec tohoto textu. Uvádím proto pouze nejčastěji se vyskytující a to především akutní reakce na podání chemoterapeutik. Vzhledem k tomu, že u pacientek léčených pro karcinom děložního čípku jsou v radikální léčbě nejčastěji užívány platinové deriváty, vyskytují se u nich především tyto nežádoucí reakce – 1) alopecie, která

bývá pouze dočasná, 2) nauzea a zvracení, které ale již v dnešní době většinou dobře zvládneme pomocí kombinované antiemetické terapie, 3) hematologická toxicita – anémie, neutropénie a trombocytopenie, které dle stupně závažnosti řešíme suplementací krevních derivátů či růstovými faktory a poslední velmi významná je 4) nefrotoxicita, která u těžších případů může skončit trvalým poškozením až selháním ledvin, proto je nutné pravidelně kontrolovat ledvinné funkce a zajistit dostatečnou hydrataci.

Trendem současné komplexní protinádorové léčby je i přes velké riziko vzniku poléčebných komplikací tyto reakce co nejvíce eliminovat a udržet co nejlepší kvalitu života odléčených pacientek. Přispívá k tomu zdokonalování operačních technik, nové možnosti aplikace radioterapie i celkově neustále se zlepšující podpůrná péče o pacienty v průběhu léčby i po ní.

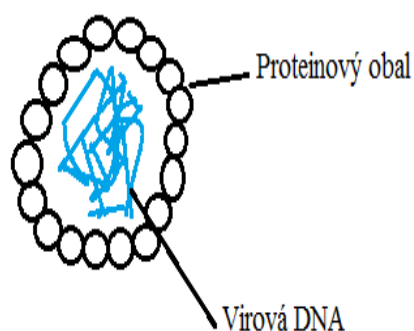
### 3.6 Prevence a screening

Vzhledem ke své etiologii je nádor děložního čípku snadno preventabilní zhoubné nádorové gynekologické onemocnění. Důkazem toho jsou země s velmi dobře fungujícím screeningem, ve kterých klesla incidence tohoto onemocnění pod 10 a u některých pod 4/100 000 obyvatel. Samotná prevence se u nádoru děložního čípku soustředí na identifikaci rizikových faktorů, na detekci prekanceróz a časných stádií onemocnění, čímž se snaží předejít vyšším nárokům na léčbu a důsledkům progresu a recidivy onemocnění. Prevenci můžeme rozdělit na čtyři úrovně – primární, sekundární, tercierní a kvartérní.

Primární prevencí u karcinomu děložního čípku se snažíme zabránit samotnému výskytu onemocnění eliminací rizikových faktorů a identifikací jedinců s hereditárními sklony k onemocnění. Důležitá je v tomto dostatečná osvěta populace z hlediska rizikových faktorů. Hlavními rizikovými faktory pro vznik cervikálního karcinomu jsou sexuální promiskuita, nezdravý životní styl a kouření. Dominantní příčinou rozvoje karcinomu děložního čípku ale zůstává persistující HPV infekce. Toto zjištění vedlo v minulosti k vytvoření vakcín proti hlavním rizikovým typům HPV a dobrovolné plošné očkování dívek od 12 let proti HPV se již od roku 2012 zavedlo i v České republice.

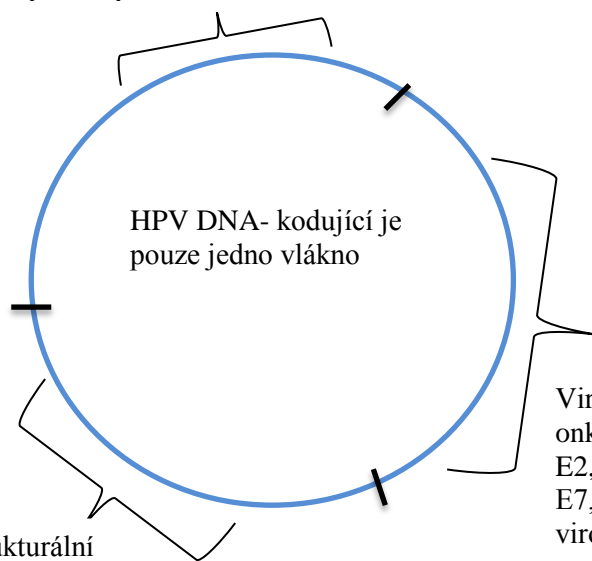
Obrázek č. 5: Human papilomavirus 16

Virus HPV- schema + organizace genomu



Nekodující sekvence- promotor p97- reguluje transkripci a replikaci virové DNA

Geny L1, L2 kodující strukturální proteiny virové kapsidy



Pacientky si mohou vybrat ze dvou typů vakcín: 1) **Silgard** – je vakcína která působí proti typům 16,18 HPV, které se nejvíce podílejí na rozvoji cervikálního karcinomu a zároveň proti HPV typům 6,11, které jsou původci genitálních kondylomat. Pojišťovna tuto vakcínu nehradí. 2) **Cervarix** – je vakcína pouze proti typům HPV 16, 18 a od 1. 4. 2012 je plošně hrazena ze zdravotního pojištění pro dívky od 12 let. Vakcíny obsahují pouze obaly virů a nemohou tak zapříčinit samotnou infekci. Předpokládá se, že i když je vakcína namířena pouze proti základním výše popsáným typům HPV, vyvolá zkříženou reakci imunitního systému i proti dalším HPV virům. Nejúčinnější je očkovat dívky ještě před zahájením pohlavního života, ale očkovat se mohou nechat i ženy až do věku 45 let, u kterých toto očkování také snižuje riziko onemocnění karcinomem děložního čípku. Prokázáno bylo i snížení rizika vzniku karcinomu pochvy, anu a hrtanu, proto se jistě zvažuje i plošné očkování chlapců, ale vakcínou Silgard, která působí i proti typům 6 a 11 (Burger et al. 2014). Nicméně prozatím je to pouze na rodičích, zda nechají svého syna očkovat, protože v tom případě musí uhradit vakcínu samy.

Sekundární prevence je zaměřena na včasnou diagnózu prekanceróz a zhoubných nádorů hrdla děložního v časných stádiích. Jejím cílem je snižovat

mortalitu zachycením nižších stádií onemocnění. Hlavním nástrojem sekundární prevence je screening karcinomu děložního hrdla, o kterém je více pojednáno v kapitole diagnostika. Pacientky mají nárok na bezplatné screeningové vyšetření u svého gynekologa 1x ročně. Pokud se na něj žena nedostaví, jsou od ledna 2014 zavedena pravidla adresného zvaní, které bude zajištěno zdravotními pojišťovnami. Společně se screeningem je ale důležitá informovanost a motivace žen, aby se pravidelných ročních kontrol účastnily.

Terciární prevence má za hlavní cíl včas zachytit recidivující onemocnění. Jejím hlavním ukazatelem je dlouhodobé přežití nemocných, proto je po léčbě nutný efektivní a pravidelný follow up. Péče o tyto pacientky by měla být proto soustředěna do onkogynekologických center. V terciární prevenci je nutné se věnovat i primární a sekundární prevenci dalších malignit.

Kvartérní prevence již spočívá v předcházení a předvídání důsledků progredujícího onemocnění. Hlavním cílem je udržet co nejlepší kvalitu života pomocí kvalitní analgoterapie, podpůrné terapie a psychosociální podpory.

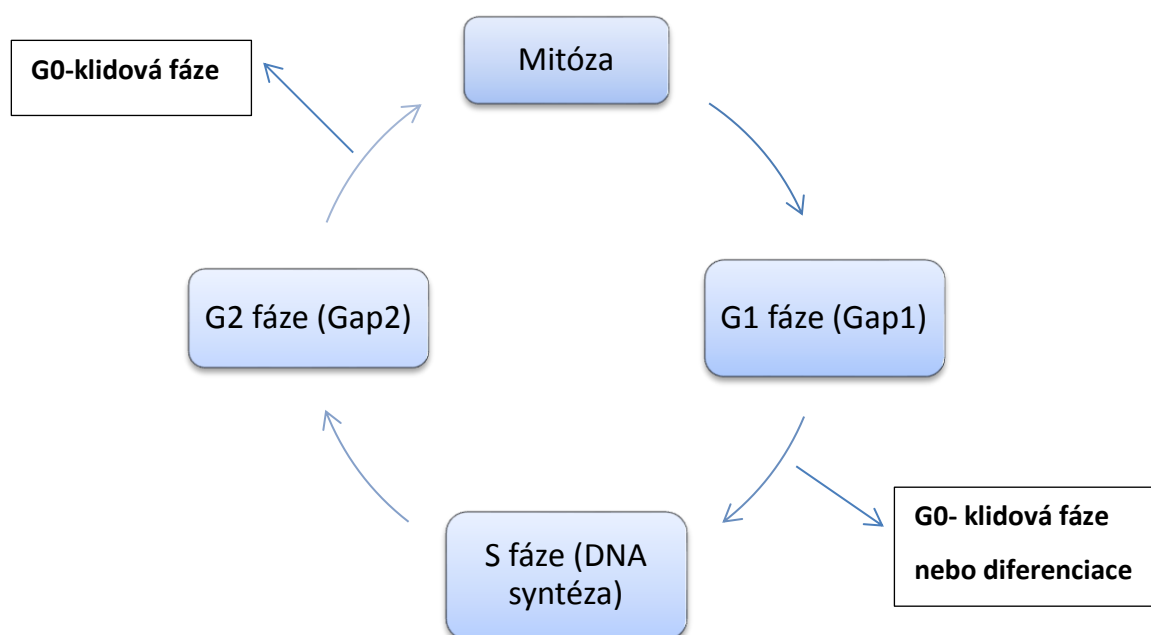


## 4 Radiobiologické aspekty

### 4.1 Buněčný cyklus, jeho regulace a význam jednotlivých fází

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

Obrázek č. 6: Fáze buněčného cyklu



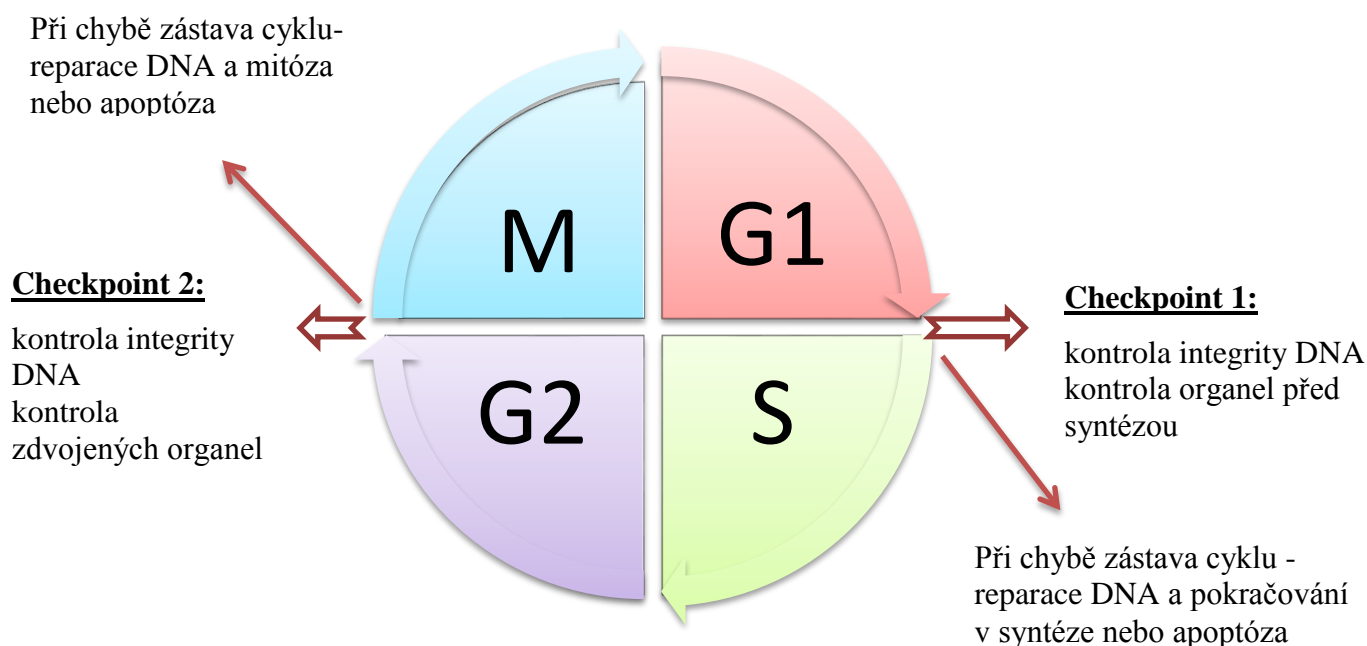
Fáze G1 (Gap1) – je první fází po dělení buňky a probíhají v ní běžné fyziologické procesy. Trvá většinou nejdéle a v jejím průběhu má buňka možnost vstoupit do G0 fáze, což je fáze klidová, kdy je nulová proliferační aktivita a probíhají bazální procesy uvnitř buňky. Vznikají z nich tzv. buňky diferencované, přičemž ne všechny jsou znovu schopné klidovou fází ukončit a znovu přejít do fáze G1 (např. neurony). Pokud buňka nevstoupí do G0 fáze, následuje fáze S (syntéza) – v jejím průběhu dochází ke zdvojení (replikaci) genetického materiálu buňky v rámci přípravy na buněčné dělení. Replikace DNA je mnohastupňově kontrolovaný proces, který může při špatné funkci kontrolních či reparačních mechanismů vést k závažným genetickým změnám (mutacím). Po fázi syntézy následuje fáze G2 (Gap2) při níž se zdvojují organely a syntetizují proteiny nutné k následnému rozdělení buňky na dvě buňky dceřiné. Samotná fáze dělení se

nazývá *fáze M (mitotická)*, na jejímž konci vzniknou dvě buňky s identickou genetickou výbavou, které vstupují ve svých cyklech opět do fáze G1.

Regulace takto složitého procesu je nezbytná pro udržení homeostázy v organismu a její poškození vede buď, k buněčné smrti, nebo k nádorvé transformaci buňky. Kontrolu zajišťují proteiny cykliny a cyklindependentní kinázy, jejichž funkce je na cyklinech závislá. Samotnou aktivitu cyklindependentních kináz řídí právě koncentrace cyklínů v buňce, která se mění v různých fázích buněčného cyklu. Buněčný cyklus má prozatím popsány 4 kontrolní body (checkpointy), z nichž pro radiobiologii nejvýznamnější je regulační bod G1 a G2 (Feltl, Cvek 2008). Checkpoint G1 se nachází mezi G1 a S fází a před jeho překonáním prodělá buňka komplexní kontrolu integrity DNA. Pokud naleznou kontrolní mechanismy chybu v průběhu kontroly, dojde k zastavení buněčného cyklu a ke spuštění reparačních mechanismů. Pokud se defekt v DNA opravit nedá, přejde buňka do programované buněčné smrti, pokud jej opraví, může pokračovat dále v procesu dělení. Klíčovou roli v detekci poškozené DNA hraje DNA dependentní kináza ATM, o které bude pojednáno v samostatné kapitole. Druhým checkpointem je G2, který se nachází mezi G2-M fází. Jeho hlavní význam spočívá v kontrole jak integrity DNA, tak dalších částí replikované buňky před rozdělením do dceřiných buněk. Opět tedy pomocí kontrolních a reparačních mechanismů umožní buňce opravit případná poškození a buněčný cyklus pokračuje dále směrem k mitóze nebo u neopravitelných poškození směrem k apoptóze. Tyto dva velmi důležité kontrolní body buněčného cyklu se podílejí na udržení genomové stability a jejich poškození se významně podílí na rozvoji nádorové buněčné transformace.

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

Obrázek č. 7: Checkpointy buněčného cyklu



#### 4.2 Reakce buněk na poškození ionizujícím zářením

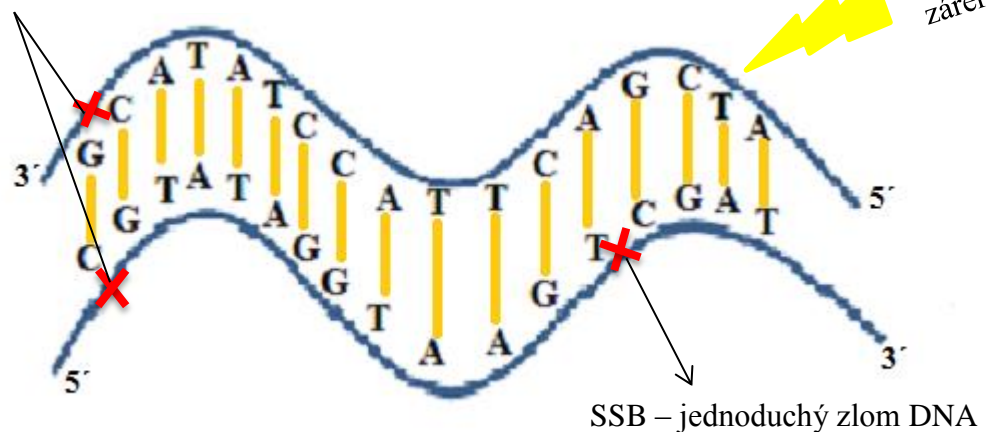
Poškození molekuly DNA způsobuje celá řada faktorů, mezi které patří oxidativní stres buňky (např. při zánětu, ischemii a následné reperfúzi), faktory fyzikální (poškození ionizujícím zářením) a chemické (různé druhy chemikálií). Vzhledem k zaměření disertační práce bude dále pojednáno především o vlivu ionizujícího záření na molekulu DNA.

Interakce ionizujícího záření s molekulou DNA můžeme rozdělit na přímé a nepřímé. Základním procesem, který způsobuje samotné poškození DNA, je ionizace. Při ní se atomy a molekuly zasažené buňky mění v ionty. Ionizace může být buď **přímá** (všeobecně ji s větší pravděpodobností způsobuje záření s těžkými částicemi – alfa záření) – což je vzácnější děj, který vede přímo k výraznému poškození většinou obou vláken DNA, nebo **ionizace nepřímá** (takto poškozuje molekulu DNA záření s lehkými částicemi – záření X) – při níž dochází nejdříve k ionizaci vody s následným vznikem volných radikálů kyslíku, které reagují s DNA a poškozují její fosfosacharidovou složku nebo poškozují baze. Tímto způsobem je poškozeno až 70% buněk vystavených ionizujícímu záření (Šlampa, Petera et al. 2007). Ionizující záření poškozuje DNA molekulu různým způsobem – poškození bazí, cukrů, vazeb mezi vlákny, ale nejdůležitějším inzultem je tvorba zlomů DNA molekuly. Zlomy mohou postihnout buď jedno, nebo obě vlákna DNA a dle toho je také dělíme.

Jednovláknové zlomy (single – strand breaks, SSB) vznikají narušením vazby mezi jednotlivými nukleotidy na jednom vlákně DNA molekuly. Jsou proto snadněji reparovatelné, protože druhé nepoškozené vlákno slouží jako vzor pro reparační mechanismy.

Obrázek č.8: Jednovláknové a dvojitý zlomy DNA

DSB - dvojitý zlom DNA



Dvojitý zlom DNA (double- strand breaks, DSB) jsou nejvýznamnější poškození DNA, které způsobuje ionizující záření. Postižena jsou totiž obě vlákna dvoušroubovice, jejich reparace je podstatně složitější a zatížená velkým výskytem chyb (chromozomální aberace, mutace). Tyto chyby buď vedou ke smrti buňky, nebo buněčný cyklus pokračuje dále, ale s již zmutovaným genomem. Takto poškozená genetická informace může vést k neregulovanému dělení buněk a ke spuštění tumorigeneze.

Odpověď buňky na poškození DNA je vysoce složitý proces zahrnující regulaci genové exprese ve všech jejích stupních, vedoucí k expresi tisíců genů (Missirian et al. 2014). Prvním krokem odpovědi na poškození DNA je rozpoznání zlomů této molekuly. Jakmile dojde k nahromadění DSB při replikaci, dojde k aktivaci checkpointu. Klíčovým enzymem této aktivační reakce je ATM kináza a ATR (ATM and RAD3 related) kináza, které následně spustí kaskádu dějů vedoucích k zastavení buněčného cyklu a k reparaci nebo k buněčné smrti (Davis et al. 2013). Pokud je poškozeno pouze jedno vlákno DNA, je pro buňku snadné jej opravit. Nepoškozené vlákno je vzorem pro DNA ligázu, která

dosyntetizuje dle této předlohy poškozenou část řetězce. DSB zlomy jsou pro buňku mnohem silnější a na opravu složitější noxou. Dva nejdůležitější mechanismy sloužící k opravě DSB zlomů DNA jsou homologní rekombinace (HR) a nehomologní rekombinace (HNEJ).

**Homologní rekombinace** je na nepoškozeném vlákně závislý, vysoce přesný reparační proces, jehož hlavní úlohou je ochrana genomu. Hraje důležitou roli především při zdvojování genetické informace a poskytuje tak kritickou podporu při DNA replikaci a udržování správné funkce telomerázy (Li et al. 2008). Tento reparační proces ale probíhá spíše u jednodušších organismů, protože je velmi složité nalézt u vyšších organismů vhodnou předlohu pro opravu. HR se uplatňuje především v pozdní S fázi a fázích G2 a M, protože zde je dostatek genetického materiálu (jsou zde přítomny sesterské chromatidy) k nalezení vhodné předlohy (Reliene et al. 2007).

**Nehomologní rekombinace** je v kombinaci s dalšími reparačními procesy nejdůležitějším mechanismem opravy genomu u lidí (Burma et al. 2006). Při nehomologní rekombinaci dochází k přímému spojování konců poškozeného řetězce DNA molekuly (bez ohledu na kompatibilitu) a na rozdíl od HR, není potřeba homologního vlákna k reparaci léze řetězce. Teoreticky tak není tento typ rekombinace závislý na fázi buněčného cyklu (Davis et al. 2013). Tento typ opravy genomu je ale spojen s velkým rizikem vzniku genomových změn (mutací), které mohou být spouštěčem kancerogeneze.

### 4.3 Radiosenzitivita a radiorezistence

Vnímavost buněk k účinkům ionizujícího záření je ovlivněná celou řadou faktorů. Jedním ze základních je fáze buněčného cyklu, ve které se dané buňky při ozáření tkáně nacházejí. Bylo prokázáno, že buňky, které se nacházejí v pozdní G1 a G2 fázi, tedy před kontrolními body cyklu, nebo u nich probíhá mitotická fáze, jsou více radiosenzitivnější (Sinclair et al. 1963). Na tomto pokladě lze následně i rozdělit tkáně na více radiosenzitivní a radiorezistentní, protože tkáně, jejichž buňky mají krátký buněčný cyklus s rychlým proliferačním potenciálem, budou více vnímavé k ozáření. Rychle dělící se buňky mají totiž omezenou reparační kapacitu a po jejich ozáření dochází k rychlé buněčné smrti (sliznice, epidermis aj.). Naopak je tomu u tkání radiorezistentních, jejichž buňky se buď dělí pomalu, nebo vůbec (vazivo, svalová tkáň, nebo buňky CNS). Na

vnímavost buněk k ionizujícímu záření má vliv i dostatečné okysličení, přičemž hypoxie způsobuje vyšší radiorezistenci buněk. Buněčná radiosenzitivita má ale, dle posledního výzkumu, podklad také v genetické výbavě jedince. Tyto genetické rysy společně s vlivem prostředí způsobují velkou interindividuální variabilitu reakce organismu na ionizující záření (Roberts et al. 1999). Genetický podklad tkáňové, respektive buněčné radiosenzitivity, je v posledním desetiletí významným středem zájmu vědeckých prací, které se snaží najít vhodné prediktivní faktory vyšší tkáňové citlivosti k ozáření. Vzhledem k výše popsané reakci buněk na ozáření se jako vhodné genetické faktory nabízejí právě geny zodpovědné za detekci a reparaci poškozené DNA.

## 5 Gen *ATM* – Ataxia – teleangiectasia mutated

### 5.1 Lokalizace genu, zařazení do proteinové rodiny a funkce

Gen *ATM* byl lokalizován na dlouhém raménku 11. chromozomu (11q22–q23) již v roce 1991 (Foroud et al. 1991). kóduje důležitou checkpoint kinázu, která je členem PI3/PI4 – kinázové rodiny. *ATM* serine/threoninová kináza je důležitý enzym, který společně s blízkou příbuznou *ATR* kinázou, patří mezi hlavní regulátory signálních cest buněčného cyklu zodpovědných za odpověď na poškození DNA molekuly (Chistakov et al. 2008). Po své aktivaci spouští kaskádu dějů, při které jsou aktivovány další proteiny zahrnující – tumor supresory p53 a BRCA1, checkpoint kinázy CHK2, checkpoint proteiny RAD 17 a RAD 9 a DNA reparační proteiny NBS1 a SMC1. SMC1 je klíčovým proteinem při kontrole DNA replikační vidlice (jde o komplex proteinů, které zodpovídají za průběh replikace) a při reparaci poškozené DNA (Kitagawa et al. 2004). Na obrázku č. 9 jsou zobrazeny hlavní signální cesty aktivované *ATM* kinázou.

Hlavním procesem, který vede k aktivaci *ATM*, je remodelace chromatinové formace, vznikající po zasažení DNA molekuly fyzikálními či chemickými noxami, na jejichž podkladě vznikají SSB a DSB zlomy DNA. Tato remodelace probíhá hned v prvních minutách po zasažení a to v oblasti, kde se nacházejí DNA reparační proteiny (Tichý et al. 2010). Aktivace *ATM* je jedním z prvních kroků směřujících k odpovědi na poškození DNA (Lavin et al. 1997). Po iradiaci DNA a následném vzniku DSB zlomu dochází k fosforylaci serinové části *ATM* kinázy, což vyvolá disociaci neaktivního dimeru a *ATM* se tak stává aktivní. K tomuto procesu je nutná přítomnost komplexu MRN, který se skládá z proteinů Mre11, Rad50 a Nbs1 (Uziel et al. 2003). V průběhu replikace je MRN komplex spojen s chromatinem, když rozpozná DSB zlom DNA, vyšle signál neaktivní *ATM* kináze. V podstatě lze říci, že MRN komplex je hlavním senzorem vzniklých zlomů DNA molekuly po iradiaci (Mirzoeva et al. 2003).

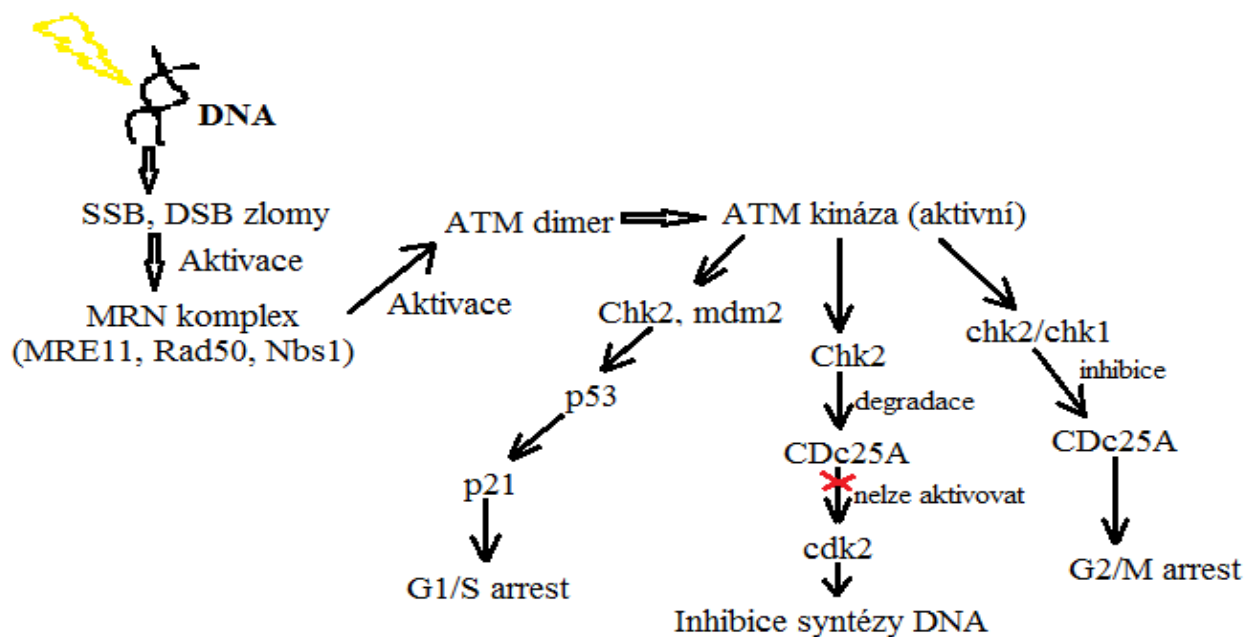
Vzhledem k velkému množství substrátů, které *ATM* kináza po své aktivaci fosforyluje, je nesporné, že je klíčovým regulátorem buněčné odpovědi na poškození DNA. Reguluje nejdůležitější 3 checkpointy buněčného cyklu, je zapojena do DNA reparace a také do regulace apoptózy (Khanna et al. 2001).

Prvním checkpointem je G1 checkpoint, ve kterém *ATM* kináza fosforyluje (aktivuje) proteiny p53, chk-2 a mdm2. U proteinů chk-2 a mdm2 nadále ovlivňuje jejich aktivitu tak, aby mohla řídit aktivitu a stabilitu proteinu p53

(Kastan et al. 1991). Aktivovaný p53 protein je klíčový mediátor pro zastavení buněčného cyklu a pro rozvoj apoptózy (Preist et al. 2004). Hlavní cílový protein aktivovaného p53, který reguluje G1/S arrest je protein p21, který společně s proteiny p27 a p57 tvoří rodinu proteinů majících schopnost inhibovat široký okruh cyklin-dependentních kináz. Tyto indukují následně zástavu buněčného cyklu (Schwartz et al. 2002).

Obrázek. č. 9: ATM regulace buněčného cyklu

### Ionizující záření



Druhým checkpointem, který ATM kináza reguluje, je kontrolní bod v S fázi. Procesy probíhající po aktivaci kaskády ATM kinázou v tomto checkpointu vedou k zastavení DNA syntézy. U pacientů s AT bylo prokázáno, že pokud jsou porušeny pochody v tomto checkpointu, dochází k jevu tzv. radiorezistentní DNA syntézy (Löbrich et al. 2005). ATM totiž aktivuje chk-2 kinázu, která dále fosforyluje fosfatázu CDc25A což vede v důsledku k její degradaci. Tato degradovaná Cdc25A fosfatáza nemůže defosforylovat cdk2, která je nutná pro další syntézu DNA. Jakékoli mutace výše popsané kaskády vedou k neschopnosti buňky inhibovat syntézu DNA (Falck et al. 2001).

Posledním checkpointem regulovaným ATM kinázou je kontrolní bod přechodu G2/M fáze. Tento kontrolní bod je nezbytný pro zastavení buněčného



cyklu při iradiaci v G2 fázi. Jde o proces závislý na aktivaci chk-1/chk-2 kináz, protože ty, pokud jsou aktivované, inhibují aktivaci Cdc25A fosfatázy nutné k dalšímu pokračování buněčného cyklu (Bao et al. 2001).

Těmito výše popsanými procesy reguluje ATM kináza průběh buněčného cyklu, nicméně je zároveň zapojená do samotné reparace DNA. Jak bylo již uvedeno, defekty DNA se reparují pomocí 2 hlavních mechanismů – NHEJ a HR.

Nehomologní end-joining je dominantní u savčích buněk a tento typ reparace převládá v G1 a časné S-fázi buněčného cyklu, ale aktivní je v podstatě v průběhu celého cyklu (Ma Y et al. 2005). Nevýhodou tohoto typu reparace, je ale větší výskyt spojení nevhodných konců DNA, což může vést ke vzniku chromozomálních aberací, které nejsou rozpoznány v další fázi buněčného cyklu a mohou být i příčinnou maligní transformace buněk.

ATM kináza a MRN komplex mají rozhodující úlohu právě v průběhu druhého mechanismu opravy poškozené DNA – při Homologní rekombinaci. Při HR je jako předloha (templát) použita homologní nepoškozená sekvence DNA sesterské chromatidy. Tato umožní opravu poškozené části molekuly do původního stavu s přesným napojením k sobě náležejících konců DNA. ATM kináza reguluje tento proces pomocí fosforylace BRCA1 proteinu. Tato aktivace ale probíhá nepřímo přes chk-2 ve vazbě na protein RAD51. Ten následně katalyzuje ATP-dependentní výměnu a párování homologních sekvencí mezi DNA řetězci (Lee et al. 2000).

## 5.2 Mutace a polymorfismy genu *ATM* a buněčná radiosenzitivita

Název samotné ATM kinázy je odvozen od vzácného neurodegenerativního onemocnění Ataxia teleangiectázia, které se dědí autozomálně recesivně (Border et al. 1995; Lavin et al. 2008). Jedinci, kteří jsou nosiči tohoto onemocnění, se rodí bez známek postižení, ale během prvních 2–3 let se u nich objeví první příznaky. Incidence této geneticky podmíněné poruchy je 1/100 000 živě narozených dětí na světě (Chun et al. 2004.) Někdy jsou příznaky tohoto onemocnění shrnuty pod pojem Luis-Baarové syndrom. Ta popsal symptomy této vrozené poruchy jako progresivní mozečkovou ataxii s kožními teleangiectáziemi v roce 1941 (Luis-Bar 1941). Následně až po 16 letech v roce 1957 bylo toto onemocnění přejmenováno na Ataxia teleangiectázia syndrom

díky dvěma lékařům – Boderovi a Sandwickovi. Ti pomocí autopsií popsali orgánové abnormality a současně hlavní příznaky choroby jako neurologické symptomy, kožní ektázie a třetí nejčastější příznak rekurentní sinopulmonární infekce (Boder and Sandwick 1957). Mezi hlavní projevy AT syndromu patří – poruchy koordinace pohybů (progresivní choreoatetóza), u dětí bývá opožděný vývoj chůze, ataxie a apraxie pohybu očí. Dále se objevují četné teleangiektázie v oblasti mozečku, kůže nosu, uší, očního bělma a nad lokty. Postižen je i mentální vývoj jedinců, který se zastavuje na úrovni 10– 12 let. Často již během prvních měsíců života se objevují příznaky imunodeficiency (opakované sinopulmonární infekce) a příznaky vyšší radiosenzitivity a to jak na UV záření, tak i na medicínální ozáření. Také se u těchto nemocných zvýšeně vyskytují nádorová onemocnění, která vznikají již v mladém věku (Khanna et al. 2000).

V následujících letech byla odhalena příčina tohoto vrozeného syndromu a to mutace genu *ATM*. V mnoha studiích bylo prokázáno, že buňky s defektním *ATM* genem jsou zvýšeně citlivé na poškození DNA ionizujícím zářením (Morrison et al. 2000). Je u nich zvýšená chromozomální nestabilita a defektní checkpointy buněčného cyklu (Lavin et al. 1997) a zároveň je poškozená detekce zlomů DNA molekuly a jejich reparace (Kuhne et al. 2004). V minulých letech byl odhalen velký počet mutací genu *ATM* v somatických buňkách AT pacientů, které vedou k poškození detekce DSB zlomů DNA a ke genetické instabilitě (Stavinski et al. 1995; Teraoka et al. 1999). Pacienti s AT syndromem jsou homozygotní nositelé těchto mutací a mají plné projevy onemocnění, nicméně u heterozygotních nositelů mutací či polymorfismů genu *ATM* se žádné z těchto symptomů nevyskytují, ale jsou predisponováni k rozvoji malignit (Cavaciuti et al. 2005). Lze proto považovat heterozygotní mutace tohoto genu za rizikový faktor rozvoje karcinogeneze a i za možnou příčinu vyšší radiosenzitivity (Weissberger et al. 1998).

Prozatím byly odhaleny desítky genetických variant a polymorfismů neznámého biologického významu u pacientů s AT syndromem (Sandoval et al. 1999). Jak vyplývá z předchozího textu, existuje přesvědčivá evidence o asociaci mezi polymorfismy genu *ATM* a rizikem vzniku nádorových onemocnění a zároveň asociace mezi těmito polymorfismy a zvýšenou radiosenzitivitou. Jedním z často zkoumaných polymorfismů je jednonukleotidový polymorfismus genu

*ATM* D1853N (5557G>A). U této gentické mutace došlo na 39 exonu k nahrazení asparaginu kyselinou aspartovou v pozici 1853. Přítomnost této alelické varianty může u svých nositelů zvyšovat radiosenzitivitu a významně zvyšuje incidenci nežádoucích účinků po prodělané radioterapii (Cesaretti et al. 2005; Andreassen et al. 2006).

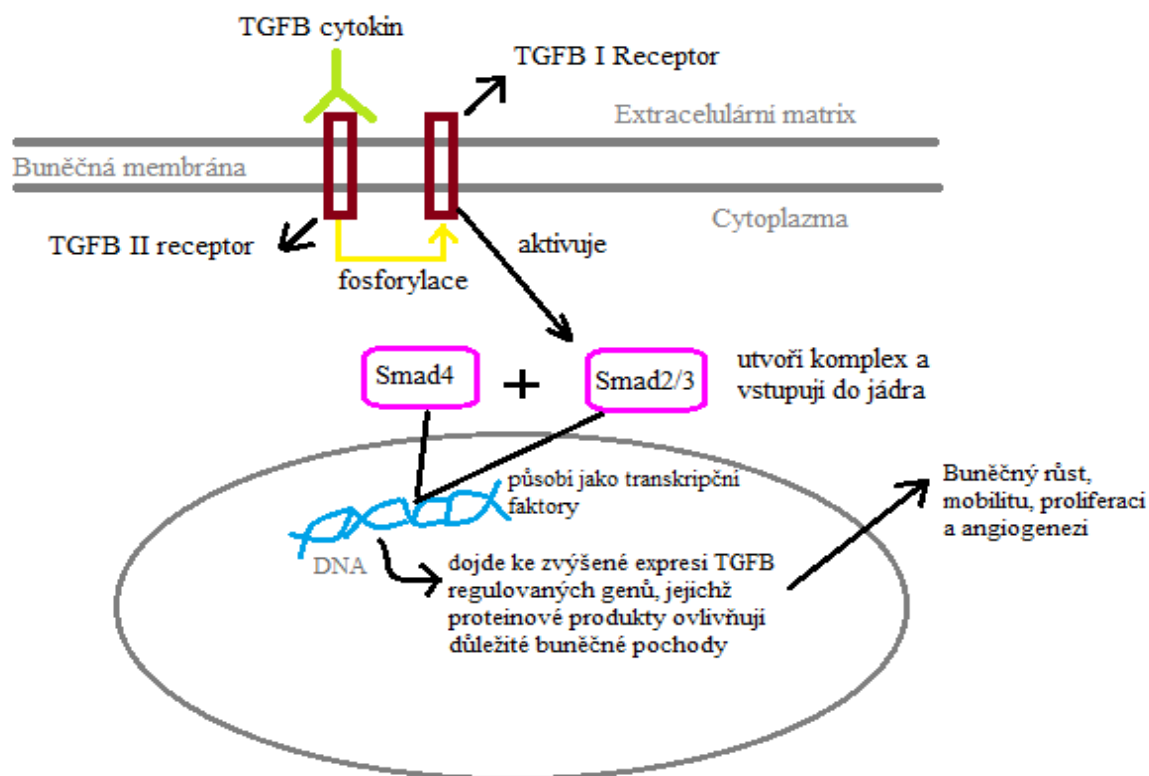
## 6 Gen *TGFβ1* – transforming growth factor β1 gen

### 6.1 Lokalizace genu, zařazení do proteinové rodiny a funkce

*TGFβ1* gen je lokalizován na dlouhém raménku 19. chromozomu (19q13.1-2). Proteinovým produktem tohoto genu je člen transforming growth factor β cytokinové rodiny (která u savců zahrnuje 3 isoformy TGFB 1,2,3), jejíž multifunkční peptidy regulují proliferaci, diferenciaci, adhezi a migraci různých typů buněk (Massagué et al. 2000). Jejich signální cesty jsou velmi složité a začínají navázáním některého z TGFB cytokinu na TGFB receptor II, který je zabudován v buněčné membráně. Ten následně fosforyluje receptor TGFBI, který dále aktivuje různé typy SMAD molekul (obrázek č. 10). Ty se potom hromadí v buněčném jádře a působí zde jako transkripční faktory cílových genů. Kromě výše popsaných dějů je tak tato cytokinová rodina zapojena i do embryogeneze, angiogeneze, imunitních reakcí (zánět, fibróza) a také do tumorigeneze (Derynck et al. 2007). Stručný přehled základních signálních cest TGFB cytokinů ukazuje obrázek č. 10.

První zmínka o genu *TGFβ1* pochází z roku 1985, kdy byl tento gen lokalizován pomocí in situ hybridizace (Fujií et al. 1985) na dlouhém raménku 19. chromozomu. V následujících letech proběhla celá řada studií, které se zabývaly funkcí tohoto genu. V roce 1990 objevil Dickinson et al., vysoké hladiny TGFB1 mRNA a TGFB1 proteinu ve vyvíjejících se tkáních chrupavky, kosti a kůže u myši. Poukázal tak na jeho důležitou úlohu v růstu a diferenciaci těchto tkání. Význam TGFB cytokinů v tumorigenezi a progresi nádorového růstu zkoumal mezi prvními Derynck et al., který v roce 2001 poukázal na to, že nejvíce upregulovaným genem u nádorových buněk je z TGFB rodiny právě gen *TGFβ1*. Ten se pak v následujících letech stal předmětem řady studií zkoumajících jeho úlohu v rozvoji nádorových onemocnění. Popsal také existenci autokrinních a parakrinních účinků TGFB cytokinů na růst nádorových buněk a jejich mikroprostředí.

Obrázek č. 10: TGFB hlavní signální cesta přes Smad molekuly



Samotné poškození signálních cest TGFB cytokinů může vést u buněk k získání hlavních znaků malignity – selhání odpovědi k inhibitorům buněčného růstu, proliferace s absencí exogenních signálů, invazivita, metastatický potenciál, immortalita, ztráta apoptózy, angiogeneze a schopnost vyhnout se kontrole imunitního systému (Elliot et al. 2005).

Důležitou úlohu v normálních tkáních hrají cytokiny TGFB především při hojení jejich poškození. Opět hlavní úlohu v těchto procesech hraje TGFB1. V případě poranění tkání má TGFB1, dle literárních zdrojů, hlavní roli jak při normálním, tak při abnormálním hojení poškozené oblasti (Branton et al. 1999). Tento cytokin je produkován v biologicky inertní formě a většinou je spojen s peptidem v malý latentní komplex, který je vylučován buňkami do cytoplazmy. K aktivaci tohoto komplexu může dojít různými cestami zahrnujícími expozici proteázám, integrinům a volným radikálům (Lawrence et al. 1991). Tento malý latentní komplex se může také vázat na několik dalších TGFB1 binding proteinů a tvořit tak větší komplexy, které jsou dále secernovány do extracelulární matrix (Annes et al. 2003). TGFB1 byl nalezen v buňkách mnoha tkání, nicméně jeho nejvyšší koncentrace jsou v krevních destičkách. TGFB1 je v hojném množství

secernován trombocyty do okolí v místě poraněné tkáně. Mezi jeho hlavní aktivity v hojivém procesu patří nalákání makrofágů a monocytů do místa poškození, inhibice proliferace epiteliálních buněk, posílení maturace fibroblastů ve fibrocyty, což zvyšuje produkci fibrotické tkáně. Dále posiluje angiogenezu a inhibuje rozpadání extracelulární matrix (Ascroft et al. 1999; Hakenjos et al. 2000; Branton et al. 1999). Vzhledem k této hojivé funkci, která vede v konečném důsledku k zahojení rány fibrózní jizvou, může nadměrná sekrece tohoto cytokinu vést k rozvoji fibrotizace tkání. Potvrzeno to bylo u celé řady chronických onemocnění charakterizovaných excesivní fibrózou – chronické hepatitidy či glomerulosklerózy. V takto postižených orgánech byla odhalena zvýšená exprese *TGFβ1* genu (Border et al. 1994; Thsushima et al. 1999). Toto zjištění potvrzují i studie, ve kterých byl zkoumán vliv genové terapie inhibující expresi *TGFβ1* na další rozvoj fibrózy v takto postižených orgánech. Ukazuje se, že inhibicí exprese *TGFβ1* dochází k výraznému snížení fibroprodukce u chronickou fibrózou postižených tkání (Isaka et al. 1996; Border et al. 1990).

Podobně jako je tomu po mechanickém poškození tkáně, dochází k vyvolání stejného procesu hojení i po poškození ionizujícím zářením nebo po podání chemoterapie. Zvýšená exprese *TGFβ1* byla prokázána na krysích modelech ve tkáních, které byly vystaveny ionizujícímu záření (Ansher et al. 1990). Současně byla popsána, v závislosti na dávce ionizujícího záření, zvýšená exprese a aktivace *TGFβ1* signálních cest vedoucí k rozvoji fibroprodukce v ozářených tkáních (Franko et al. 1997). Asociace mezi rozvojem tkáňové fibrózy a zvýšenou expresí *TGFβ1* v postižených tkáních byla prokázána u lidí i u zvířat také po podání chemoterapie (Giri et al. 1993). Vzhledem k těmto popsaným asociacím zvýšené tkáňové exprese *TGFβ1* s poléčebně vzniklou fibrózou lze říci, že TGFB1 hraje dominantní roli v rozvoji poléčebných komplikací ve smyslu fibrotických změn, které jsou podkladem zhoršené funkce, takto postižených orgánů. Mutace vedoucí ke ztrátě funkce *TGFβ1* genu jsou u zvířat prokazatelně letální, nicméně pokud dojde k poškození pouze jedné molekuly v TGFB signální cestě, je tato genetická modifikace slučitelná se životem a v některých případech může mít za následek i radiorezistenci tkání vůči poškození ionizujícím zářením (Flanders et al. 2002). U lidí bylo zase odhaleno, že existuje velká interindividuální variabilita v nositelství jednonukleotidových polymorfismů

genu *TGFβ1*, které jsou asociovány se zvýšeným rizikem rozvoje tkáňového poškození ionizujícím zářením i jinými faktory (Peters et al. 2008)

Dávkování chemoterapie a radioterapie je v podstatě závislé na tolerančních dávkách organismu, u radioterapie zvláště i na procentuálním riziku rozvoje pozdních účinků v exponovaných zdravých tkáních. *TGFβ1* gen se dle výše popsaného zdá být vhodným cílem výzkumu stran jeho postavení v rozvoji poléčebných komplikací. Mnoho prací se již zabývalo právě asociací mezi tímto genem a jeho vlivem na rozvoj postiradiačních či pochemoterapeutických nežádoucích účinků. Vzhledem k zaměření disertační práce se dále zmiňují pouze o asociaci mezi polymorfismy tohoto genu a rozvojem pozdních postiradiačních komplikací.

## 6.2 Polymorfismy genu *TGFβ1* a postiradiační nežádoucí reakce

Radioterapie zůstává stále základním kamenem managementu léčby více jak u poloviny zjištěných solidních tumorů. Bohužel i přes své možnosti, radiací indukované poškození okolních zdravých tkání je limitujícím faktorem pro intenzitu dávky ionizujícího záření a má vliv především na dlouhodobou kvalitu zdraví a života pacientů v poléčebném období (Bentzen et al. 2006). V průběhu poslední dekády udělala věda v oblasti radiobiologie významný pokrok při hledání vhodných analýz v predikci pozdních účinků radioterapie na zdravé tkáni. Je zde rostoucí podezření, že riziko poškození zdravých tkání po prodělané radioterapii, je ovlivňováno nejčastěji se vyskytující genetickou odchylkou – jednonukleotidovými polymorfismy (SNPs – single nucleotide polymorphisms) různých genů. Tyto polymorfismy vedou, dle dostupných údajů, ke zvýšené náchylnosti pacientů k nežádoucím účinkům radioterapie, tedy k vyšší radiosenzitivitě (Andreassen et al. 2010). Velký počet studií zaznamenal asociaci mezi různými typy jednonukleotidových polymorfismů a radiací indukovaných poškození zdravých tkání, mezi nimi ale nejvíce studované byly právě SNPs genu *TGFβ1* (Alsner et al. 2008). Jak již bylo výše popsáno, TGFβ1 protein je všestranný profibrotický cytokin, který je zahrnutý do rozvoje a pokračování postiradiačních změn u řady tkání (Martin et al. 2000). Způsobuje především patologickou akumulaci extracelulární matrix, což doprovází řadu zánětlivých a fibrotických chronických onemocnění. Asociace mezi zvýšenými hladinami cirkulujícího TGFβ1 cytokinu a radiací indukovanou fibrózou byla zaznamenána u celé řady pacientů s různými typy nádorů – prsu, plic, prostaty a hlavy a krku

(Anscher et al. 2010). Některé polymorfismy genu *TGFβ1* byly shledány jako příčina zvýšené hladiny cirkulujícího TGFB1 cytokinu v plasmě, což vedlo u zkoumaných skupin pacientů ke zvýšenému riziku rozvoje pozdní postiradiační toxicity. Mezi ty nejvíce studované patří především polymorfismy – 509 C>T, Arg25Pro a Pro10Leu. Polymorfismus – 509 C>T, byl shledán jako signifikantně asociovaný se zvýšenými hladinami cytokinu TGFB1 v plasmě (Graniger et al. 1999). Dále polymorfismus Arg25Pro je, dle dostupné literatury, signifikantně asociován s rozvojem fibrotických změn u plicních allograftů (Martin et al. 2000) a poslední z nich polymorfismus Pro10Leu je taktéž spojován se zvýšenými hladinami cirkulujícího TGFB1 cytokinu a vyšší tkáňovou radiosenzitivitou (Andreassen et al. 2010). Tyto polymorfismy jsou tak logickými kandidáty k prozkoumání jejich významu v rozvoji pozdních účinků radioterapie. Prozatím proběhlé studie, ale podávají sporné výsledky, a to hlavně kvůli malému počtu vyšetřovaných pacientů.



## 7 Cíle disertační práce

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

## 8 Soubor nemocných, vyšetřovací metody

### 8.1 Pacienti

Naše studie zahrnovala 55 pacientek s lokálně pokročilým karcinomem děložního čípku (stádia FIGO IIB a vyšším). Tyto pacientky byly v letech 2001–2010 léčeny chemoradioterapií na Klinice Onkologie a Radioterapie ve Fakultní nemocnici Hradec Králové. Vstupních kritéria pro zařazení byla – 1) diagnóza karcinom děložního čípku, klinické stádium FIGO IIB a výše; 2) absolvovaná léčba chemoradioterapií; 3) follow up delší než 6 měsíců. Shrnutí dalších důležitých charakteristik je popsáno v tabulce č. 6. Zařazovány byly pacientky tak, jak přicházely na ambulantní kontroly. Každá pacientka podepsala informovaný souhlas s odběrem krve a s vyšetřením a následným uchováním jejich DNA (viz. příloha). Studie byla schválena etickou komisí a finančně podporována grantovým projektem IGA MZ číslo: NT11334-4/2010.

Tabulka č. 6: Základní charakteristiky studované skupiny pacientek

Proměnné		Proměnné	Počet (n)
<b>Věk (mean)</b>	47 let (31; 74)	<b>RT dávka na pánev</b>	
<b>Follow up (mean)</b>	6 let (1; 10)	46/48.6 Gy	14
<b>PS WHO</b>	<b>Počet (n)</b>	50 Gy	41
0	35	<b>RT dávka na parametria</b>	
1	17	14 Gy	28
2	1	9 Gy	12
3	2	<b>RT paraaortálních uzlin</b>	28
<b>Histopatologie</b>		<b>BRT dávky</b>	
Spinocelulární karcinom	53	24 Gy	41
Adenocarcinom	2	28/30 Gy	14
<b>Grading</b>		<b>Chemoterapie</b>	55
1	8	Cisplatina	45
2	32	Paklitaxel	10
3	15		
<b>FIGO IIB</b>	26		
<b>FIGO IIB</b>	29		

## 8.2 Léčba a sledování

Všechny do studie zařazené pacientky podstoupily léčbu chemoradioterapií. Léčba probíhala v kombinaci zevní radioterapie, brachyterapie s chemoterapií. Zevní radioterapie byla aplikována na pánev BOX technikou (ozáření pánve ze 4 polí) s parametriálním boostem. V některých případech byly zahrnuty do ozařovaného pole i společné ilické uzliny a paraaortální uzliny (pole bylo rozšířeno na paraaortální oblast). V průběhu zevní radioterapie nebo po jejím skončení pacientky podstoupily intrauterinní brachyterapii pomocí Fletcherova tříkanálového aplikátoru. Dávka záření byla aplikována do bodu A a dávky na body v rektu a močovém měchýři byly plánovány dle International Commission of Radiation Units and Measurements (ICRU) 38. U většiny pacientek (45) probíhala konkomitantní chemoterapie, týdně s cisplatinou v dávce  $40 \text{ mg/m}^2$ , současně se zevní radioterapií. U pacientek s nevyhovujícími renálními parametry byla cisplatina zaměněna za paklitaxel v dávce  $50 \text{ mg/m}^2$ . Vzhledem k individuálnímu celkovému stavu každé pacientky (věk, renální parametry) a vzhledem ke změnám protokolu léčby, ne všechny pacientky dostaly stejnou dávku při radioterapii a stejný typ chemoterapie (tabulka č. 7). Léčebné parametry byly zahrnuty do statistického hodnocení.

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

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

### 8.3 Vyšetřovací metody - DNA analýza jednotlivých polymorfismů

Od každé pacientky byly v rámci vstupní návštěvy odebrány 2 zkumavky nesrážlivé venózní krve (EDTA). Následně byla z 200  $\mu$ l této krve extrahována DNA z periferních lymfocytů pomocí microcolumn procedury (QIAamp Blood Mini Kit, Qiagen, Germany). Následně po odběrech od prvních 20 pacientek a 100 zdravých dobrovolníků bylo provedeno ověření vhodných molekulárně biologických vyšetřovacích metod, které byly dále použity k analýze zbylých 55 vzorků. Veškerá DNA analýza probíhala na Ústavu Klinické Biochemie a diagnostiky ve Fakultní nemocnici v Hradci Králové.

Po izolaci DNA následující PCR reakce v oblasti genu *ATM* a *TGF $\beta$ 1*, které byly vykonány pomocí přístroje thermocycler ABI 2720 (Applied Biosystems, USA). Nepřítomnost 5557G>A alely byla potvrzena DNA sekvenováním. Následkem toho byla odhalena cílová mutace v oblasti kodonu 1853. Tento třístupňový proces zahrnuje dvě nezávislé amplifikační reakce (PCR I a PCR II), při kterých je vložen adenin namísto guaninu do kodujícího řetězce a tymin do nekódující části řetězce DNA. Poslední PCR (PCR III) nakonec spojí oba semi-produkty dohromady. Všechny reakce probíhají ve 25  $\mu$ l reakční směsi zahrnující 100ng DNA, 10x koncentrovaný PCR buffer s 15mM magnézium chloridu, 200  $\mu$ M každého z dNTP (Takara, Japan), 0,4  $\mu$ M vhodného páru primerů (Generi Biotech, Czech Republic) a 1U *Taq* polymerázy (Takara, Japan). Po iniciální denaturaci (5min v 95 °C), PCR reakce prošly 35cykly skládající se z 30s denaturace v 95 °C, 30s temperování v 50 °C a 30s elongací v 72 °C. Amplifikace byla vykonána v Veriti 96-well Thermal Cycler (Applied Biosystems, USA). Nukleotidové sekvence ve finálním produktu byly ozřejmeny pomocí DNA sekvenování.

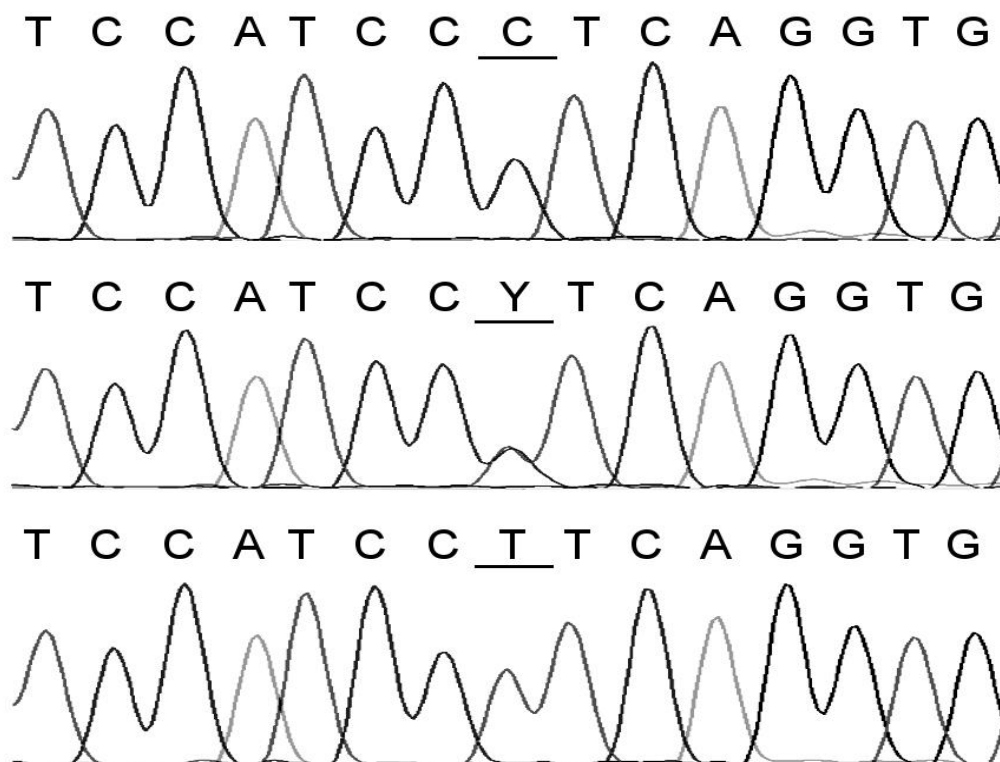
PCR – RFLP (restriction fragment length polymorphism analysis) byla užita především k analýze polymorfního místa 5557G>A *ATM* genu, dále polymorfismů -800G>A a -509C>T genu *TGF $\beta$ 1*. Teplotní profil a skladba reakční směsi pro PCR byla podobná jako u výše popsaných PCR reakcí s výjimkou sekvencí primerů, které se lišily dle typu polymorfismu. Dále je popsán proces u polymorfního místa 5557 G>A genu *ATM*. Reverzní primer (5'-ATT TCT CCA TGA TTC ATT TGG AT -3') představuje wild-type-alelovou

specifickou lokalitu, kterou rozpoznává restriční enzym v průběhu PCR amplifikace. Forward primer (5' - AAA CTA TTG GGT GGA TTT GTT -3') byl navržen pomocí Primer Express Version 2.0 software (Applied Biosystems). 10 $\mu$ l produktu bylo zpracováno s 10 U Mbo I restričním enzymem (New England BioLabs, USA) při teplotě 36 °C po dobu 16 hodin. Rozštěpené fragmenty prošly elektroforézou v 3% agarózovém gelu. Následně vzniklý PCR produkt byl rozštěpen v případě wild-type alely na dva fragmenty. V ostatních vzorcích zahrnujících nerozštěpené PCR produkty viditelné na gelu, následovalo DNA sekvenování. Směs bez DNA templátu byla použita jako negativní amplifikační kontrola (Beránek et al. 2011).

Proces DNA sekvenování byl zahájen tak, že byly purifikovány PCR produkty pomocí QIAquick PCR Purification KIT (Qiagen) a jejich nukleotidové sekvence byly určeny v obou směrech pomocí BigDye Terminato v 3.1. Cycle Sequencing Kit in Genetic Analyser 3130 (Applied Biosystems) dle instrukcí výrobce (Beránek et al. 2011).

Polymorfismus -1552del AGG v oblasti promotoru *TGF $\beta$ 1* genu byl vyšetřen fragmentační analýzou na ABI 3130 genetickém analyzátoru (Applied Biosystems, USA). Forward primer byl modifikován na 5' konci pomocí 6-FAM fluroforu: 5' - FAM- CCA GGT GGA AGG TGG ATT AG – 3'; reverzním primerem byl primer: 5' - CTC CAG TCC CCA GTT AAC CAT C – 3'. K analýze polymorfismu L10P TGFB1 genu bylo užito přímé sekvenování ampliconů (Paulikova et al. 2014).

Tabulka č. 7: Sekvenční analýza *TGFβ1* -509C>T genetického polymorphismu (underlined). Horní část: wild-type genotype; střední část: heterozygotní varianta; dolní část: -509T homozygotní varianta



#### 8.4 Statistická analýza

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

Odds ratio, s 95% limity spolehlivosti bylo užito k popisu vztahu mezi výskytem jednotlivých genetických markerů a stupněm komplikací. Bonferroniho korekce pro mnohočetná srovnání byla použita v těch případech, kde to bylo vhodné. P- hodnoty byly znásobeny 7krát (to je počet analyzovaných genetických

markerů), p-hodnota u TRIPLE TGFB1 markeru byla znásobena 3krát, protože obsahoval 3 genetické markery.

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

Odchytky genotypové distribuce v populaci od Hardy-Weinbergovi rovnováhy byly testovány na skupině zdravých dobrovolníků (kteří sloužili již k validaci molekulárně biologických metod) pomocí exact testu na softwaru Plink 1.07. Skupina zdravých dobrovolníků koresponduje s Hardy-Weinbergovou rovnováhou ve všech zjiřtovaných markerech.

Analýzy byly prováděny v SPSS Statistics 19 (IBM, USA).

## 9 Výsledky

Statistická analýza základních charakteristik pacientek vs. stupeň chronické toxicity u jednotlivých skupin pacientek s užitím Monte Carlo a Fisher's exact testu je vyjádřena v tabulce č.8.

Ze základních charakteristik zkoumané populace pacientek se při srovnání skupiny bez komplikací se skupinami s komplikacemi jeví jako statisticky významné tyto parametry: 1) follow up v letech, který vyšel statisticky signifikantní pro rozvoj pozdních účinků radioterapie při srovnání skupiny bez komplikací se skupinou s komplikacemi III-IV stupně ( $p=0,029$ ). U pacientek s komplikacemi III-IV stupně byl průměrně o 2 roky delší follow up, než u pacientek bez komplikací, měly tak logicky více času na to, aby se u nich komplikace vyvinuly, 2) radioterapie pánve vyšla také jako signifikantní v rozvoji pozdních komplikací při srovnání skupiny bez komplikací se skupinou s komplikacemi III-IV stupně ( $p<0,001$ ). V této analýze nebyla brána v úvahu dávka ionizujícího záření, 3) také ozáření parametrií bez ohledu na dávku se ukázalo být signifikantní v rozvoji pozdních komplikací a to jak při srovnání skupiny bez komplikací se skupinou s komplikacemi I-II stupně ( $p=0,033$ ), tak při srovnání se skupinou s komplikacemi III-IV stupně ( $p<0,001$ ), 4) posledním ze statisticky signifikantních parametrů je BRT, opět bez ohledu na dávku, která vyšla jako statisticky významný parametr při srovnání skupiny pacientek bez komplikací s těmi s komplikacemi III-IV stupně ( $p<0,001$ ).



Tabulka č. 8: Iničiální charakteristiky skupiny pacientů

Iničiální charakteristiky <sup>1</sup>	Rozdělení pacientů v závislosti na stupni komplikací po RT				Statistické porovnání skupin <sup>2</sup>	
	Celkem (N = 55)	Bez komplikací (N = 13)	I - II stupeň komplikací (N = 20)	III - IV stupeň komplikací (N = 22)	Bez vs. I - II	Bez vs. III-IV
<b>Věk při terapii</b>	48.0; 47.4 (44.9; 49.9)	49.0; 47.9 (42.6; 53.2)	45.5; 44.9 (40.6; 49.2)	47.5; 49.4 (45.6; 53.2)	0.524	0.749
≤ 30	4 (7.3%)	1 (7.7%)	3 (15.0%)	0 (0.0%)		
<b>31 - 40</b>	11 (20.0%)	2 (15.4%)	5 (25.0%)	4 (18.2%)		
<b>41 - 50</b>	19 (34.5%)	5 (38.5%)	5 (25.0%)	9 (40.9%)	0.431	0.909
<b>51 - 60</b>	16 (29.1%)	3 (23.1%)	7 (35.0%)	6 (27.3%)		
> 60	5 (9.1%)	2 (15.4%)	0 (0.0%)	3 (13.6%)		
<b>Follow up v letech</b>	6.0; 5.9 (5.1; 6.6)	2.0; 4.0 (1.9; 6.1)	6.0; 6.3 (5.3; 7.2)	6.5; 6.6 (5.7; 7.5)	0.052	<b>0.029</b>
<b>BMI</b>	23.4; 24.8 (23.5; 26.1)	25.4; 25.0 (22.8; 27.3)	23.1; 24.1 (21.7; 26.4)	23.6; 25.3 (23.1; 27.6)	0.281	0.960
< 18,5	2 (3.6%)	1 (7.7%)	1 (5.0%)	0 (0.0%)		
<b>18,5 - 24,9</b>	30 (54.5%)	5 (38.5%)	12 (60.0%)	13 (59.1%)		
<b>25,0 - 29,9</b>	16 (29.1%)	5 (38.5%)	5 (25.0%)	6 (27.3%)	0.670	0.503
<b>30,0 - 39,9</b>	5 (9.1%)	2 (15.4%)	1 (5.0%)	2 (9.1%)		
≥ 40,0	2 (3.6%)	0 (0.0%)	1 (5.0%)	1 (4.5%)		
<b>RT páne<sup>3</sup></b>						
<b>46/48.6 Gy</b>	14 (25.5%)	8 (61.5%)	5 (25.0%)	1 (4.5%)		
<b>50/60 Gy</b>	41 (74.5%)	5 (38.5%)	15 (75.0%)	21 (95.5%)	0.067	< 0.001
<b>RT parametrií</b>						
<b>14 Gy</b>	38 (69.1%)	4 (30.8%)	15 (75.0%)	19 (86.4%)		
<b>9 Gy</b>	12 (21.8%)	7 (53.8%)	4 (20.0%)	1 (4.5%)	<b>0.033</b>	<0.001
<b>No</b>	5 (9.1%)	2 (15.4%)	1 (5.0%)	2 (9.1%)		
<b>RT PALU</b>						
<b>Yes</b>	28 (50.9%)	3 (23.1%)	12 (60.0%)	13 (59.1%)		
<b>No</b>	27 (49.1%)	10 (76.9%)	8 (40.0%)	9 (40.9%)	0.072	0.078
<b>BRT<sup>3</sup></b>						
<b>18/24 Gy</b>	41 (74.5%)	5 (38.5%)	15 (75.0%)	21 (95.5%)		
<b>28/30 Gy</b>	14 (25.5%)	8 (61.5%)	5 (25.0%)	1 (4.5%)	0.067	<0.001

Iniciální charakteristiky <sup>1</sup>	Rozdělení pacientů v závislosti na stupni komplikací po RT				Statistické porovnání skupin <sup>2</sup>	
	Celkem (N = 55)	Bez komplikací (N = 13)	I - II stupeň komplikací (N = 20)	III - IV stupeň komplikací (N = 22)	Bez vs. I - II	Bez vs. III-IV
<b>CHT CDDP</b>						
<b>Yes</b>	52 (94.5%)	12 (92.3%)	20 (100.0%)	20 (90.9%)	0.394	1.000
<b>No</b>	3 (5.5%)	1 (7.7%)	0 (0.0%)	2 (9.1%)		
<b>CHT taxol</b>						
<b>Yes</b>	10 (18.2%)	2 (15.4%)	3 (15.0%)	5 (22.7%)	1.000	0.689
<b>No</b>	45 (81.8%)	11 (84.6%)	17 (85.0%)	17 (77.3%)		
<b>CHT 2 different CHT</b>						
<b>1 CHT</b>	8 (14.5%)	2 (15.4%)	3 (15.0%)	3 (13.6%)	0.626	0.595
<b>1 CHT</b>	46 (83.6%)	10 (76.9%)	17 (85.0%)	19 (86.4%)		
<b>No</b>	1 (1.8%)	1 (7.7%)	0 (0.0%)	0 (0.0%)		

<sup>1</sup> Spojitá data jsou charakterizována mediánem; průměrem (95% interval spolehlivosti). Kategorické parametry jsou zobrazeny jako absolutní a relativní frekvence u daných skupin

<sup>2</sup> Patientky bez komplikací byly srovnávány s pacientkami s komplikacemi I-II or III-IV stupně. Mann-Whitney U test byl užit pro srovnání spojitých parametrů. Rozdíly v kategorických parametrech byly testovány Fisher's exact testem (binární proměnné) nebo exact Monte Carlo testem (multinomialní proměnné).

<sup>3</sup> Každá pacientka podstoupila RT pánve a BRT. Patientky, které podstoupily RT pánve v dávce 50/60 Gy, dostaly i stejnou dávku BRT 18/24 Gy.

Tabulka č. 9: Genotypová a alelová frekvence u jednotlivých skupin pacientek

Genotypy/alely		<i>TGFβ1</i>					
		<i>ATM</i>	-1552	-800	-509	10	TRIPLE/DOUBLE
<b>Bez komplikací (n=13)</b>							
	wt/wt	11 (84.6 %)	3 (23.1 %)	11 (84.6 %)	3 (23.1 %)	3 (23.1 %)	3 (23.1 %)
	M/wt	2 (15.4 %)	9 (69.9 %)	2 (15.4 %)	9 (69.2 %)	9 (69.2 %)	9 (69.2 %)
	M/M	0 (0.0 %)	1 (7.7 %)	0	1 (7.7 %)	1 (7.7 %)	1 (7.7 %)
	allele wt	24 (92.3 %)	15 (57.7 %)	24 (92.3 %)	15 (57.7 %)	15 (57.7 %)	15 (57.7 %)
	allele M	2 (7.7 %)	11 (42.3 %)	2 (7.7 %)	11 (42.3 %)	11 (42.3 %)	11 (42.3 %)
<b>Grade I–II komplikace (n=20)</b>							
	wt/wt	17 (85.0 %)	13 (65.0 %)	17 (85.0 %)	13 (65.0 %)	9 (45.0 %)	14 (70.0 %)
	M/wt	2 (10.0 %)	6 (30.0 %)	3 (15.0 %)	6 (30.0 %)	9 (45.0 %)	5 (25.0 %)
	M/M	1 (5.0 %)	1 (5.0 %)	0	1 (5.0 %)	2 (10.0 %)	1 (5.0 %)
	allele wt	36 (90.0 %)	32 (80.0 %)	37 (92.5 %)	32 (80.0 %)	27 (67.5 %)	33 (82.5 %)
	allele M	4 (10.0 %)	8 (20.0 %)	3 (7.5 %)	8 (20.0 %)	13 (32.5 %)	7 (17.5 %)
<b>Grade III–IV komplikace (n=22)</b>							
	wt/wt	18 (81.8 %)	12 (54.5 %)	21 (95.5 %)	12 (54.5 %)	10 (45.5 %)	13 (59.1 %)
	M/wt	4 (18.2 %)	6 (27.3 %)	1 (4.5 %)	6 (27.3 %)	7 (31.8 %)	5 (22.7 %)
	M/M	0 (0.0 %)	4 (18.2 %)	0	4 (18.2 %)	5 (22.7 %)	4 (18.2 %)
	allele wt	40 (90.9 %)	30 (68.2 %)	43 (97.7 %)	30 (68.2 %)	27 (61.4 %)	31 (70.5 %)
	allele M	4 (9.1 %)	14 (31.8 %)	1 (2.3 %)	14 (31.8 %)	17 (38.6 %)	13 (29.5 %)
<b>Grade I–IV komplikace (n=42)</b>							
	wt/wt	35 (83.3 %)	25 (59.5 %)	38 (90.5 %)	25 (59.5 %)	19 (45.2 %)	27 (64.3 %)
	M/wt	6 (14.3 %)	12 (28.6 %)	4 (9.5 %)	12 (28.6 %)	16 (38.1 %)	10 (23.8 %)
	M/M	1 (2.4 %)	5 (11.9 %)	0	5 (11.9 %)	7 (16.7 %)	5 (11.9 %)
	allele wt	76 (90.5 %)	62 (73.8 %)	80 (95.2 %)	62 (73.8 %)	54 (64.3 %)	64 (76.2 %)
	allele M	8 (9.5 %)	22 (26.2 %)	4 (4.8 %)	22 (26.2 %)	30 (35.7 %)	20 (23.8 %)

M = mutace , Wt = wild type, *TGFβ1* double: alelická double kombinace -509, L10P; *TGFβ1* triple: alelická triple kombinace -1552, -509, L10P

V tabulce č. 9 je uvedena genotypová a alelová frekvence u jednotlivých skupin pacientek.

*TGFβ1* alelické kombinace byly do naší studie zahrnuty na základě jejich možné asociace s chronickými komplikacemi po radioterapii u pacientek léčených pro gynekologické tumory (Kim de Ruyck et al. 2006). U pacientek s komplikacemi III-IV stupně (skupina 3) se vyskytuje procentuálně více homozygotních nositelů polymorfismu -1552del AGG a -509 C>T (18,2% vs 7,7%) a zároveň více homozygotních nositelů polymorfismu L10P (22% vs 7,7%). Co se kombinací SNPs týká, tak je u skupiny pacientek s komplikacemi III-IV procentuálně více homozygotních nositelek kombinace Triple i Double (18,2% vs 7,7%).

Univariální a multivariální analýza s užitím logistického regresního modelu viz.tab. č. 10

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

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

Co se multivarietní analýzy týká, tak z klinických charakteristik se pouze ozáření parametří v dávce 14Gy zdá být rizikovým statisticky významným faktorem v rozvoji pozdních postiradiačních komplikací jak stupně III-IV ( $p=0,006$ ), tak stupně I-IV ( $p=0,004$ ). Z genetických markerů v multivarietní analýze obstál jako statisticky významný rizikový faktor pouze homozygotní genotyp TRIPLE *TGFβ1* genu a to jak v předpovědi komplikací III-IV stupně ( $p=0,021$ ), tak v předpovědi komplikací kteréhokoli stupně ( $p=0,12$ ).

Tabulka č. 10: Predikce pozdních komplikací – univarietní a multivarietní logistický regresní model

	Grade III–IV komplikace vs. bez komplikací <sup>1</sup>			Grade I-IVkomplikace vs. bez komplikací <sup>1</sup>		
	OR (95% CI)	<i>p</i> uni	<i>p</i> multi	OR (95% CI)	<i>p</i> uni	<i>p</i> multi
Věk při léčbě (roky)	1.018 (0.944;1.099)	0.643		0.993 (0.929;1.060)	0.826	
Věková kategorie 41–50 <sup>2</sup>	1.350 (0.211;8.617)	0.751		0.700 (0.138;3.558)	0.667	
Věková kategorie >50 <sup>2</sup>	1.350 (0.211;8.617)	0.751		0.800 (0.159;4.023)	0.787	
BMI	1.014 (0.876;1.172)	0.856		0.988 (0.874;1.117)	0.848	
BMI kategorie ≤24.9 <sup>3</sup>	1.806 (0.391;8.348)	0.449		1.970 (0.495;7.832)	0.336	
BMI kategorie >29.9 <sup>3</sup>	1.250 (0.146;10.699)	0.839		1.136 (0.162;7.995)	0.898	
EBRT pánve 50/60 Gy <sup>4</sup>	33.600 (3.381;333.885)	<b>0.003</b>		9.600 (2.338;39.423)	<b>0.002</b>	
EBRT parametria 14 Gy <sup>5</sup>	14.250 (2.619;77.542)	<b>0.002</b>	<b>0.006</b>	9.562 (2.341;39.060)	<b>0.002</b>	<b>0.004</b>
EBRT PALU	4.815 (1.027;22.571)	<b>0.046</b>		4.902 (1.173;20.479)	<b>0.029</b>	
CHT CDDP	0.833 (0.068;10.202)	0.887		1.667 (0.139;20.014)	0.687	
CHT paclitaxel	1.618 (0.266;9.852)	0.602		1.294 (0.238;7.028)	0.765	
<i>TGFβ1</i> -1552 <sup>7</sup> homozygot <sup>8</sup>	5.988 (1.332;27.027) ( $\varphi=0.410$ ; $p=0.015$ )	<b>0.020</b>		5.618 (1.451;21.739) ( $\varphi = 0.356$ ; $p=0.008$ )	<b>0.012</b>	
<i>TGFβ1</i> 10 homozygot <sup>8</sup>	4.831 (1.096;21.277) ( $\varphi=0.363$ ; $p=0.032$ )	<b>0.037</b>		3.650 (0.964;13.889) ( $\varphi = 0.266$ ; $p=0.049$ )	0.056	
<i>TGFβ1</i> TRIPLE <sup>9</sup> homozygot <sup>8</sup>	7.634 (1.634;35.714) ( $\varphi=0.459$ ; $p=0.007$ )	<b>0.010</b>	<b>0.021</b>	7.194 (1.821;28.571) ( $\varphi = 0.406$ ; $p=0.003$ )	<b>0.005</b>	<b>0.012</b>

<sup>1</sup>Odds ratio (OR, zastoupeno 95% intervalem spolehlivosti) pro univarietní (*p* uni) model založený na logistické regresi; multivarietní (*p* multi) regrese založená na zpětném postupně selektujícím algoritmu.

<sup>2</sup>Referenční kategorie je ≤40 let.

<sup>3</sup>Referenční kategorie je BMI 25–29.9.

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

<sup>5</sup>Referenční kategorie je 9 Gy EBRT na parametria.

<sup>7</sup>*TGFβ1* -1552 je stejné jako *TGFβ1* -509 polymorphism .

<sup>8</sup>Referenční kategorie jsou uskupení heterozygotů.

<sup>9</sup>*TGFβ1* triple je stejné jako *TGFβ1* double genotypes.

BMI = body mass index

CHT = chemoterapie

EBRT- external beam radiotherapy (zevní radioterapie)

PALU – EBRT paraaortálních lymfatických uzlin

## 10 Diskuze

Reakce zdravých tkání na ozáření je velmi podobná hojení, např. po mechanickém poškození, jak je uvedeno výše. Avšak v případě iradiace vstupují tkáně do cyklu dějů zahrnujících hypoxii, angiogenezu, buněčnou smrt, proliferaci a infiltraci makrofágy. Ve výsledku vede tento proces k totální přestavbě původní tkáně, přičemž tato je nahrazena převážně kolagenem s pozůstatkem pouze několika buněčných elementů (Asher et al. 2005). U gynekologických nádorových onemocnění po prodělané radioterapii bývá rektum a močový měchýř, pro svou těsnou komunikaci s gynekologickými orgány, nejvíce poškozenou oblastí. Nejčastěji se vyskytující pozdní komplikace zahrnují zvýšenou frekvenci močení a stolice, drobné i silnější krvácení, částečnou inkontinenci moči či stolice. Fibróza a ischemie v oblasti submukózy a muscularis mucosae jsou převážně zodpovědné za tyto pozdní účinky ve spolupráci s dalšími vaskulárními abnormalitami, kolagenovou depozicí a abnormálními fibroblasty (Stone et al. 2003, Coia et al. 1995). Jak vyplývá z dříve publikovaného, zdá se být cytokin TGFB1 hlavním mediátorem procesu fibrogenese a počtu dalších patogenetických procesů, které se podílejí na tkáňové odpovědi na ozáření (Anscher et al. 1990, Richter et al. 1997). Nicméně jak můžeme vidět z výsledků předchozích prací i z výsledků práce naší, nelze pouze tento cytokin ani mutace jeho kodujícího genu označit za jedinou příčinu rozvoje pozdních nežádoucích účinků po prodělané léčbě RT. V rámci naší studie byl také vyšetřen, nejvíce v souvislosti s vyšší radiosenzitivitou zkomunovaný, polymorfismus genu *ATM* 5557G>A. Mutace tohoto genu jsou příčinou insuficientní funkce jeho genového produktu (*ATM* kinázy), což vede ke genomové nestabilitě, ztrátě schopnosti reparability DSB zlomů DNA a zvýšené radiosenzitivě (Gatti et al. 2001). Takto zmutovaný gen může pak být logicky jednou z příčin vyšší tkáňové senzitivity k poškození ionizujícím zářením.

V rámci naší studie jsme se pokusili prokázat možnou asociaci klinických parametrů (dávky ionizujícího záření, věk, BMI, typ chemoterapie) a kandidátských polymorfismů genů (*ATM* -5557G>A; -1552del AGG, -509C>T, -800G>A a L10P polymorfismy genu *TGFβ1*) s rizikem vzniku pozdních komplikací na přežívající skupině pacientek léčených radikální chemoradioterapií pro inoperabilní stádium karcinomu děložního čípku. Vzhledem k negativním výstupům studie De Ruycka et al., z roku 2006, jsme se rozhodli nevyšetřovat

polymorfni místa genu *TGFβ1* R25P a T263I. Kvůli nízkému výskytu alelických variant polymorfismu -800G>A *TGFβ1* genu (šest -800G>A heterozygotů, žádný homozygot) ve zkoumaném souboru pacientek, jsme se rozhodli jej vynechat ve statistické analýze.

V univariétní logistické regresi jako statisticky významné klinické parametry v předpovědi pozdní toxicity radioterapie grade III-IV vyšly – ozáření pánve dávkou 50 Gy, parametriální boost v dávce 14 Gy a ozáření paraaortálních lymfatických uzlin. Multivariétní analýzou prošel jako jediný signifikantní parametr v předpovědi chronické toxicity pouze boost na parametria v dávce 14 Gy.

I přesto, že chemoterapie samotná indukuje objemné poškození DNA následované aktivací tkáňové odpovědi, ve které hrají *ATM* i *TGFβ1* významnou roli (Woods et al. 2013) a zároveň se předpokládá, že zvyšuje radiosenzitivitu tkání právě mutagenním účinkem na geny zodpovědné za reparaci ionizujícím zářením poškozené DNA (Solary et al. 2001, Carielo et al. 1992), se nám nepodařilo prokázat její statisticky signifikantní vliv na rozvoj pozdních komplikací po prodělané chemoradioterapii u zkoumaného souboru pacientek.

Jak bylo výše uvedeno polymorfismus genu *ATM* 5557G>A byl předmětem již řady studií, které zkoumaly jeho význam v rozvoji pozdních komplikací po prodělané radioterapii. Nicméně výsledky těchto prací jsou rozporuplné. Studie Andreassena et al., z roku 2006, prokázala signifikantní asociaci mezi hetero- i homozygotním nositelstvím tohoto polymorfismu a rozvojem podkožní fibrózy po radioterapii u pacientek s karcinomem prsu, které podstoupily adjuvantní radioterapii po mastektomií. Naopak negativní výsledky, co se genu *ATM* týká, publikoval v roce 2006 Damarju et al., který do své studie zahrnul 83 pacientů léčených radioterapií pro karcinom prostaty. U těchto pacientů byla vyšetřena celá řada polymorfismů kandidátských genů a hledána asociace s výskytem pozdních postiradiačních komplikací. Polymorfismus genu *ATM* 5557G>A zde vyšel jako statisticky nesignifikantní v rozvoji pozdní toxicity radioterapie ( $p=0,130$ ). Podobně negativní výsledky přinesla i jiná práce Andreassena et al., z roku 2006, která neprokázala asociaci mezi nositelstvím polymorfismu 5557G>A *ATM* genu a rozvojem pozdních komplikací u 120 pacientek s karcinomem prsu odléčených adjuvantní radioterapií. Také v našem projektu se



nepovedlo prokázat, že polymorfismus 5557G>A genu *ATM* je signifikantním prediktivním faktorem chronické toxicity radioterapie u pacientek léčených pro pokročilý karcinom děložního čípku.

Z předchozího textu vyplývá, že fibróza hraje důležitou úlohu v rozvoji pozdních komplikací po radioterapii. Četné studie zabývající se tímto procesem sledávají TGFB1 cytokin za klíčový mediátor v odpovědi na poškození tkání ionizujícím zářením. Celá řada prací zabývající se asociací mezi zvýšenými plazmatickými hladinami TGFB1 cytokinu u pacientů s nádorovým onemocněním a rozvojem závažné radioterapií indukované fibrózy také demonstrovala účast *TGFβ1* genu a jeho polymorfismů na klinické radiosenzitivitě. Tyto studie zahrnovaly pacienty léčené radioterapií pro karcinom plic (Guerra et al. 2012, Stenmak et al. 2012), prostaty (Peters et al. 2008), hlavy a krku (Feltl et al. 2005), prsu (Quarmby et al. 2003, Giatopulous et al. 2007) a konečníku (Schirmer et al. 2012). Nicméně závěry těchto prací svým negativním výsledkem nepodporuje studie Barnetta et al., z roku 2010, která zahrnovala 778 pacientek s karcinomem prsu odléčených radioterapií. Nepodařilo se jim prokázat jakoukoli asociaci mezi zvýšeným rizikem vzniku poradiační fibrózy v ozařovaném poli a výskytem jednotlivých polymorfismů genu *TGFβ1* (-509C>T, L10P).

Polymorfismy genu *TGFβ1* a jejich význam v rozvoji pozdních komplikací po léčbě se u 78 pacientek léčených radioterapií pro karcinom děložního čípku a děložního těla zabýval i De Ruyck et al., ve své práci z roku 2006. Důvodem k testování polymorfismů tohoto genu byl jejich možný vliv na genetickou kontrolu plazmatických hladin TGFB1 cytokinu. Polymorfismy – 1552del AGG, - 509C>T, a – 800G>A jsou umístěné na 5'konci promotorové oblasti *TGFβ1* genu a mohou mít tak vliv na produkci cytokinu. Dále oba polymorfismy L10P, R25P jsou lokalizovány v signální sekvenci, která je zodpovědná za export nově syntetizovaného proteinu skrze membránu endoplazmatického retikula. Polymorfismus T263I je pravděpodobně zahrnut do stability a aktivity proteinu. Tato studie poukazuje na to, že homozygotní nosiči SNPs – 509C>T, - 1552delAGG a L10P mohou mít zvýšené riziko rozvoje pozdních komplikací po RT pánve. Vyskytovalo se u nich 2,4 krát vyšší riziko střední závažné reakce po

radioterapii ( $p=0,347$ ) a 3,6 krát vyšší riziko rozvoje závažných reakcí ( $p=0,260$ ). Nicméně ač slibné, jsou tyto výsledky statisticky nevýznamné.

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

V rámci naší studie jsme se snažili prokázat význam polymorfismů genů *ATM* a *TGFβ1* v predikci pozdních komplikací po prodělané chemoradioterapii u pacientek s pokročilým karcinomem děložního čípku. Naše výsledky, které uvádějí, že samostatné jednonukleotidové polymorfismy genu *TGFβ1* a genu *ATM* nekorelují s vyšší tkáňovou radiosenzitivitou jsou v souladu s literárními údaji (Barnett et al. 2012, Andreassen et al. 2006). Vzhledem však k našemu statisticky signifikantnímu výsledku u homozygotních *TGFβ1* haplotypů složených z jednotlivých polymorfismů se zdá, že do budoucna bude užitečnější v predikci individuální radiosenzitivity testovat kombinované haplotypy či genotypy složené z polymorfismů jednotlivých genů zapojených do reparace DNA.

## 11 Závěr

Karcinom děložního čípku při své přetrvávající vysoké incidenci patří v České republice mezi tři nejčastěji se vyskytující gynekologické malignity. Představuje tak významnou zdravotní zátěž ženské populace a zároveň i významný socioekonomický problém. I přes zavedený screening je stále více jak 50% karcinomů této oblasti diagnostikováno až v pokročilém stádiu, což snižuje šance pacientek na úplné vyléčení i na dlouhodobé přežití po léčbě. Metodou volby v léčbě pokročilých karcinomů děložního čípku (od stadia IIB) je chemoradioterapie. Tato terapie s sebou přináší ale riziko vzniku akutní a chronické toxicity, která se vyskytuje u 10-15% takto léčených žen. Vzhledem ke zlepšování technik jak zevní radioterapie, tak brachyterapie, bude toto procento v příštích letech pravděpodobně klesat. Avšak na rozvoj pozdních komplikací dle dostupných údajů nemá vliv pouze samotné provedení onkologické léčby. Existují i další faktory, které ovlivňují radiosenzitivitu tkání. Z nich nejvíce studované jsou v posledních letech právě faktory molekulárně biologické.

V minulosti byla v mnoha studiích prokázána zvýšená tkáňová radiosenzitivita u pacientů s onemocněním Ataxia teleangiectázia, kteří byli homozygotními nositeli různých mutací genu *ATM*. Proteinový produkt tohoto genu je zodpovědný za regulaci buněčného cyklu a reparaci poškozené DNA, a tudíž jeho poškozená funkce vede ke genomové nestabilitě a může být jednou z příčin vyšší tkáňové radiosenzitivity. Gen *TGFβ1* patří k hlavním koordinátorům tkáňové odpovědi na poškození různého typu včetně zásahu ionizujícím zářením. Výsledky publikované v posledních letech poukazují na to, že různé mutace a polymorfismy tohoto genu jsou spojovány jak s rozvojem nádorové transformace, tak s rozvojem vyšších stupňů toxicity po prodělané radioterapii.

Cílem naší studie bylo prokázat signifikantní vztah mezi výskytem polymorfismů genů *ATM* a *TGFβ1* a rozvojem pozdních komplikací po prodělané chemoradioterapii u 55 pacientek léčených pro pokročilý karcinom děložního čípku. Dalším cílem bylo validizovat vhodné molekulárně biologické metody sloužící k rychlé analýze těchto polymorfismů.

Jak vyplývá z výše popsaných výsledků, nebyla prokázána statisticky významná asociace mezi jednotlivými námi testovanými polymorfismy a pozdní toxicitou chemoradioterapie a to jak v homozygotní formě, tak i předpokládané

heterozygotní formě. Jakmile jsme ale seskupili polymorfismy genu *TGFβ1* do tzv. compound (složených) haplotypů, povedlo se nám prokázat statisticky signifikantní asociaci mezi složeným homozygotním haplotypem -1552delAGG/-509C>T/L10P *TGFβ1* genu s pozdními postiradiačními komplikacemi jak III-IV stupně, i jakéhokoli stupně. Zároveň se podařilo vyvinout a ověřit vhodné laboratorní metody ke stanovení jednotlivých polymorfismů genu *ATM* a *TGFβ1*.

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

## 12 Osobní přínos doktoranda

Má disertační práce vznikala za podpory projektu IGA MZ ČR NT/11334-4/2010 a projektu PRVOUK. Na začátku svého studia jsem u souboru 250 pacientek léčených pro karcinom děložního čípku na Klinice Onkologie a Radioterapie zpracovala základní údaje o diagnostice, léčbě a následných poléčebných komplikacích. Následně jsme na základě těchto údajů stanovili kritéria k náboru do naší studie – tzn. pacientka s karcinomem děložního čípku ve stadiu IIB a vyšším, léčená chemoradioterapií a doba od ukončení léčby alespoň půl roku. Poté jsem se podílela na přípravě informovaného souhlasu s odběrem krevního vzorku na analýzu DNA a získala jsem souhlas s provedením studie od etické komise. Nábor pacientek a odběry probíhaly v rámci kontrol na ambulancích, kde jsem v tu dobu ještě nepracovala, proto jsem jej sama neprováděla. Vzorky krve byly následně odeslány k analýze na Ústav Klinické Biochemie a Diagnostiky FNHK, kam jsem dodala jen potřebné údaje ohledně zařazených pacientek, ale na samotné analýze vzorků, či na ověřování metod jsem se také nepodílela. Následně vzniklé výsledky jsem připravila ke statistickému zpracování, které proběhlo na Institutu Biostatistiky a analýz Masarykovy Univerzity v Brně. Mým hlavním úkolem bylo následně vzniklé statistické výsledky zhodnotit a připravit z nich přednášky a publikace. Výsledky jsem přednesla na třech tuzemských konferencích a prezentovala jsem je i v podobě posteru na jednom kongresu zahraničním.

### 13 Použitá literatura

ALSNER, Jan, Christian Nicolaj ANDREASSEN a Jens OVERGAARD. Genetic Markers for Prediction of Normal Tissue Toxicity After Radiotherapy. *Seminars in Radiation Oncology*. 2008, vol. 18, issue 2, s. 126-135. DOI: 10.1016/j.semradonc.2007.10.004.

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

ANDREASSEN, Christian N., Jens OVERGAARD, Jan ALSNER, Marie OVERGAARD, Carsten HERSKIND, Jamie A. CESARETTI, David P. ATENCIO, Sheryl GREEN, Silvia C. FORMENTI, Richard G. STOCK a Barry S. ROSENSTEIN. ATM sequence variants and risk of radiation-induced subcutaneous fibrosis after postmastectomy radiotherapy. *International Journal of Radiation Oncology Biology Physics*. 2006, vol. 64, issue 3, s. 776-783. DOI: 10.1016/j.ijrobp.2005.09.014.

ANDREASSEN, Christian Nicolaj, Norman Jay KLEIMAN a Richard J. O'HANLON. Searching for genetic determinants of normal tissue radiosensitivity – Are we on the right track?. *Radiotherapy and Oncology*. 2010, vol. 97, issue 1, s. 1-8. DOI: 10.4271/831458.

ANNES, J. P. a Dean SHEPPARD. Making sense of latent TGFbeta activation. *Journal of Cell Science*. 2003, vol. 116, issue 2, s. 67-79. DOI: 10.1201/9781420014211.ch4.

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

ANSCHER, M. S. Targeting the TGF- 1 Pathway to Prevent Normal Tissue Injury After Cancer Therapy. *The Oncologist*. 2010, vol. 15, issue 4, s. 350-359. DOI: 10.1634/theoncologist.2009-s101.

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

ASHCROFT GS. Review Bidirectional regulation of macrophage function by TGF-beta. *Microbes Infect*. 1999 Dec; 1(15):1275-82

BAO, Shideng RANDAL S. TIBBETTS, Kathryn M. BRUMBAUGH, Yanan FANG, D. Ashley RICHARDSON, Ambereen ALI, Susan M. CHEN, Robert T. ABRAHAM a Xiao-Fan WANG. ATR/ATM-mediated phosphorylation of human Rad17 is required for genotoxic stress responses. *Nature*. 2001, vol. 411, issue 6840, s. 969-974. DOI: 10.1038/35082110.

BARNETT, Gillian C., Charlotte E. COLES, Neil G. BURNET, Paul D.P. PHAROAH, Jennifer WILKINSON, Catharine M.L. WEST, Rebecca M. ELLIOTT, Caroline BAYNES a Alison M. DUNNING. No association between SNPs regulating TGF- $\beta$ 1 secretion and late radiotherapy toxicity to the breast: Results from the RAPPER study. *Radiotherapy and Oncology*. 2010, vol. 97, issue 1, s. 9-14. DOI: 10.1016/j.radonc.2009.12.006.

BENTZEN SM. Preventing or reducing late side effects of radiation therapy: radiobiology meets molecular pathology. *Nat Rev Cancer*. 2006 Sep; 6(9):702-13

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

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

BORDER WA, Brees D. a Noble NA. Transforming growth factor-beta and extracellular matrix deposition in the kidney. *Contrib Nephrol*. 1994; 107():140-5.

BORDER WA, OKUDA S, LANGUINO LR, SPORN MB a RUOSLAHTI E. Suppression of experimental glomerulonephritis by antiserum against transforming growth factor beta 1. *Nature*. 1990 Jul 26;346(6282):371-4.

BRANTON MH, a KOPP JB. TGF-beta and fibrosis. *Microbes Infect*. 1999 Dec; 1(15):1349-65.

BURGER, EA, Sy S, NYGÅRD M, KRISTIENSEN IS a KIM JJ. Prevention of HPV-related cancers in Norway: cost-effectiveness of expanding the HPV vaccination program to include pre-adolescent boys. *PLoS One*. 2014 Mar 20;9(3):e89974. DOI: 10.1371/journal.pone.0089974.

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

CARIELLO N.F., J.A. SWENBERG a SKOPEK T.R. In vitro mutational specificity of cisplatin in the human hypoxanthine guanine phosphoribosyltransferase gene. *Cancer Res*. 1992 May 15;52(10):2866-73.

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

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

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

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



DAMARAJU, S., D MURRAY, J DUFOUR, D CARANDANG a S MYREHAUG. Association of DNA Repair and Steroid Metabolism Gene Polymorphisms with Clinical Late Toxicity in Patients Treated with Conformal Radiotherapy for Prostate Cancer. *Clinical Cancer Research*. 2006, vol. 12, issue 8, s. 2545-2554. DOI: 10.1158/1078-0432.ccr-05-2703.

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

DERYNCK, R., AKHURST, R. J., BALMAIN, A. TGF-beta signaling in tumor suppression and cancer progression. *Nature Genet*. 29: 117-129, 2001.

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

DICKINSON, Mary E., Michael S. KOBRIN, Colleen M. SILAN, David M. KINGSLEY, Monica J. JUSTICE, Duncan A. MILLER, Jeffrey D. CECI, Leslie F. LOCK, Angela LEE, Arthur M. BUCHBERG, Linda D. SIRACUSA, Karen M. LYONS, Rik DERYNCK, Brigid L.M. HOGAN, Neal G. COPELAND a Nancy A. JENKINS. Chromosomal localization of seven members of the murine TGF- $\beta$  superfamily suggests close linkage to several morphogenetic mutant loci. *Genomics*. 1990, vol. 6, issue 3, s. 505-520. DOI: 10.1016/0888-7543(90)90480-i.

DU TOIT, G.C.a B. J. SMIT. Clinical prognostic parameters in stage III cervical carcinoma – an analysis of 732 patients. *South Africa medical journal* 1997; 87: 1434-1440.

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

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

FELTL, D, E ZAVADOVA, M PALA a P HOZAK. Posttreatment plasma TGF-beta 1 level predicts late morbidity in advanced head and neck cancer.

*International Journal of Radiation Oncology Biology Physics*. 2004, vol. 60, S516-S516. DOI: 10.1016/s0360-3016(04)01768-7.

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

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

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

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

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

GIRI, S N, D M HYDE a M A HOLLINGER. Effect of antibody to transforming growth factor beta on bleomycin induced accumulation of lung collagen in mice. *Thorax*. 1993, vol. 48, issue 10, s. 959-966. DOI: 10.1136/thx.48.10.959.

GRAINGER D, K. HEATHCOTE , M. CHIANO, H. SNIEDER , P.R. KEMP , J.C. METCALFE, N.D. CARTER a T.D. SPECTOR. Genetic control of the circulating concentration of transforming growth factor type beta1. *Human Molecular Genetics*. 1999, vol. 8, issue 1, s. 93-97. DOI: 10.1093/hmg/8.1.93.

GUERRA, Jose Luis Lopez, Daniel GOMEZ, Qingyi WEI, Zhengshen LIU, Li-E WANG, Xianglin YUAN, Yan ZHUANG, Ritusko KOMAKI a Zhongxing LIAO. Association between single nucleotide polymorphisms of the transforming growth factor  $\beta$ 1 gene and the risk of severe radiation esophagitis in patients with lung cancer. *Radiotherapy and Oncology*. 2012, vol. 105, issue 3, s. 299-304. DOI: 10.1016/j.radonc.2012.08.014.

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

HAUSEN, H. z. a Ala-Eddin MOUSTAFA. Papillomaviruses Causing Cancer: Evasion From Host-Cell Control in Early Events in Carcinogenesis. *Journal of the National Cancer Institute*. 2000, vol. 92, issue 9, s. 243-260. DOI: 10.1201/b16780-9.

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

CHUN, Helen H a Richard A GATTI. Ataxia–telangiectasia, an evolving phenotype. *DNA Repair*. 2004, vol. 3, 8-9, s. 1187-1196. DOI: 10.1007/springerreference\_91703.

ISAKA Y1, BREES DK, IKEGAYA K, KANEDA Y, IMAI E, NOBLE NA a BORDER WA. Gene therapy by skeletal muscle expression of decorin prevents fibrotic disease in rat kidney. *Nat Med*. 1996 Apr;2(4):418-23.

- KASTAN, MB, ONYEKWERE O, SIDRANSKY D, VOLGESTEIN B a CRAIG RW. Participation of p53 protein in the cellular response to DNA damage. *Cancer Res* 1991;51:6304-11.
- KHANNA, K. K. Cancer Risk and the ATM Gene: a Continuing Debate. *JNCI Journal of the National Cancer Institute*. 2000, vol. 92, issue 10, s. 795-802. DOI: 10.1093/jnci/92.10.795.
- KHANNA, KK, MF LAVIN, SP JACKSON a TD MULHERN. ATM, a central controller of cellular responses to DNA damage. *Cell Death and Differentiation*. 2001, vol. 8, issue 11, s. 1052-1065. DOI: 10.1038/sj.cdd.4400874.
- KITAGAWA, R. Phosphorylation of SMC1 is a critical downstream event in the ATM-NBS1-BRCA1 pathway. *Genes*. 2004, vol. 18, issue 12, s. 1423-1438. DOI: 10.1101/gad.1200304.
- KO, LJ a PRIVES C. P53: puzzle and paradigm. *Genes Dev*. 1996;10:1054-72.
- KUHNE, M. a Penny JEGGO. A Double-Strand Break Repair Defect in ATM-Deficient Cells Contributes to Radiosensitivity. *Cancer Research*. 2004, vol. 64, issue 2, s. 500-508. DOI: 10.1158/0008-5472.can-03-2384.
- LAVIN MF. Ataxia-telangiectasia: from a rare disorder to a paradigm for cell signalling and cancer. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*. 2008;9(10):759–769.
- LAVIN, MF a SHILOH Y. The genetic defect in ataxia-telangiectasia. *Annual Review of Immunology*. 1997;15:177–202.
- LAWRENCE D. Identification and activation of latent transforming growth factor  $\beta$ . *Methods Enzymol*. 1991;198:327–336.
- LEE, Jong-Soo, Kimberly M. COLLINS, Alexandra L. BROWN, Chang-Hun LEE, Jay H. CHUNG a Susan GASSER. HCds1-mediated phosphorylation of BRCA1 regulates the DNA damage response. *Nature*. 2000, vol. 404, issue 6774, s. 201-204. DOI: 10.3410/f.1012247.186996.

LI, Xuan a Wolf-Dietrich HEYER. Homologous recombination in DNA repair and DNA damage tolerance. *Cell Research*. 2008, vol. 18, issue 1, s. 99-113. DOI: 10.1038/cr.2008.1.

LÖBRICH, Markus a Penny A. JEGGO. The two edges of the ATM sword: Co-operation between repair and checkpoint functions. *Radiotherapy and Oncology*. 2005, vol. 76, issue 2, s. 112-118. DOI: 10.1016/j.radonc.2005.06.027.

LOUIS-BAR D. Sur syndrome progressif comprenant des telangiectasies capillaires cutanees et conjonctivales symetriques, a disposition naevoide et de troubles cerebelleux. *Confín Neurol (Basel)*. 1941;4:32-42.

MA, Yunmei a Haihui LU. Repair of Double-Strand DNA Breaks by the Human Nonhomologous DNA End Joining Pathway: The Iterative Processing Model. *Cell Cycle*. 2005, vol. 4, issue 9, s. 1193-1200. DOI: 10.4161/cc.4.9.1977.

MARTIN, M., P. REISDORF, M.-C. VOZENIN-BROTONS, J.-L. LEFAIX, S. DELANIAN, R.L. JIRTLE, M.S. ANSCHER, Randy L. JIRTLE a Mitchell S. ANSCHER. TGF- $\beta$ 1 and radiation-induced fibrosis: a key regulation step and a specific therapeutic target. *European Journal of Cancer*. 2001, vol. 37, s. 819-823. DOI: 10.1016/b978-0-12-168562-1.50146-4.

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

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

MISSIRIAN, Victor, Phillip A. CONKLIN, Kevin M. CULLIGAN, Neil D. HUEFNER a Anne B. BRITT. High atomic weight, high-energy radiation (HZE) induces transcriptional responses shared with conventional stresses in addition to a core "DSB" response specific to clastogenic treatments. *Frontiers in Plant Science* [online]. 2014, vol. 5 [cit. 2014-09-22]. DOI: 10.3389/fpls.2014.00364.

MORRISON, C., E. SONODA, N. TAKAO, A. SHINOHARA, K.-i. YAMAMOTO a S. TAKEDA. The controlling role of ATM in homologous recombinational repair of DNA damage. *The EMBO Journal*. 2000, vol. 19, issue 4, s. 569-612. DOI: 10.1128/9781555816704.ch16.

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

MUNGER, John S, Xiaozhu HUANG, Hisaaki KAWAKATSU, Mark J.D GRIFFITHS, Stephen L DALTON, Jianfeng WU, Jean-François PITTET, Naftali KAMINSKI, Chrystelle GARAT, Michael A MATTHAY, Daniel B RIFKIN, Dean SHEPPARD, Gisli JENKINS, Jonathan LAMB a Charlotte WELLER. A Mechanism for Regulating Pulmonary Inflammation and Fibrosis: The Integrin  $\alpha\beta6$  Binds and Activates Latent TGF  $\beta1$ . *Cell*. 1999, vol. 96, issue 3, s. 319-328. DOI: 10.3410/f.12836956.14724166.

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

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

QUARMBY, S., H. FAKHOURY, E. LEVINE, J. BARBER, J. WYLIE, A. H. HAJEER, C. WEST, A. STEWART, B. MAGEE a S. KUMAR. Association of transforming growth factor beta-1 single nucleotide polymorphisms with radiation-induced damage to normal tissues in breast cancer patients. *International Journal of Radiation Biology*. 2003, vol. 79, issue 2, s. 137-143. DOI: 10.1080/0955300021000045673.

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

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

RUYCK, Kim De, Marc Van EIJKEREN, Kathleen CLAES, Klaus BACHER, Anne VRAL, Wilfried De NEVE a Hubert THIERENS. TGF $\beta$ 1 polymorphisms and late clinical radiosensitivity in patients treated for gynecologic tumors. *International Journal of Radiation Oncology Biology Physics.* 2006, vol. 65, issue 4, s. 1240-1248. DOI: 10.1016/j.ijrobp.2006.03.047

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

SAVITSKY K1, BAR-SHIRA A, GILAD S, ROTMAN G, ZIV Y, VANAGAITE L, TAGLE DA, SMITH S, UZIEL T, SFEZ S, ASHKENAZI M, PECKER I, FRYDMAN M, HARNIK R, PATANJALI SR, SIMMONS A, CLINES GA, SARTIEL A, GATTI RA, CHESSA L, SANAL O, LAVIN MF, JASPERS NG, TAYLOR AM, ARLETT CF, MIKI T, WEISSMAN SM, LOVETT M, COLLINS FS a SHILOH Y. A single ataxia telangiectasia gene with a product similar to PI-3 kinase. *Science.* 1995 Jun 23;268(5218):1749-53.

SEDGWICK RP, BODER E. Progressive ataxia in childhood with particular reference to ataxia-telangiectasia. *Neurology.* Jul 1960;10:705-15.

SCHIFFMAN, Mark a Nicolas WENTZENSEN N. Human papillomavirus infection and the multistage carcinogenesis of cervical cancer. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev.* 2013 Apr;22(4):553-60. doi: 10.1158/1055-9965.EPI-12-1406.

SCHIRMER, Markus Anton, Caroline Patricia Nadine MERGLER, Margret RAVE-FRÄNK, Markus Karl HERRMANN, Steffen HENNIES, Jochen GAEDCKE, Lena-Christin CONRADI, Peter JO, Tim BEISSBARTH, Clemens

Friedrich HESS, Heinz BECKER, Michael GHADIMI, Jürgen BROCKMÖLLER, Hans CHRISTIANSEN a Hendrik Andreas WOLFF. Acute Toxicity of Radiochemotherapy in Rectal Cancer Patients: A Risk Particularly for Carriers of the TGFB1 Pro25 variant. *International Journal of Radiation Oncology Biology Physics*. 2012, vol. 83, issue 1, s. 149-157. DOI: 10.1016/j.ijrobp.2011.05.063.

SCHWARTZ, Gary K. CDK Inhibitors: Cell Cycle Arrest Versus Apoptosis. *Cell Cycle*. 2002, vol. 1, issue 2, s. 113-114. DOI: 10.4161/cc.1.2.112.

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

SOLARY E, S. PLENCHETTE, O. SORDET, C. RÉBÉ, P. DUCOROY, R. FILOMENKO, J.M. BRUEY, N. DROIN a L.CORCOS. Modulation of apoptotic pathways triggered by cytotoxic agents. *Thérapie*. 2001 Sep-Oct;56(5):511-8.

SOUHAMI, Luis, JoséA.C. MELO a V. Gonzalo PAREJA. The treatment of stage III carcinoma of the uterine cervix with telecobalt irradiation. *Gynecologic Oncology*. 1987, vol. 28, issue 3, s. 262-267. DOI: 10.1016/0090-8258(87)90171-5.

STENMARK, Matthew H., Xu-Wei CAI, Kerby SHEDDEN, James A. HAYMAN, Shuanghu YUAN, Timothy RITTER, Randall K. Ten HAKEN, Theodore S. LAWRENCE a Spring KONG. Combining Physical and Biologic Parameters to Predict Radiation-Induced Lung Toxicity in Patients With Non-Small-Cell Lung Cancer Treated With Definitive Radiation Therapy. *International Journal of Radiation Oncology Biology Physics*. 2012, vol. 84, issue 2, e217-e222. DOI: 10.1016/j.ijrobp.2012.03.067.

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



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

TERAOKA SN, TELATAR M, BECKER-CATANIA S, LIANG T, ONENGÜT S, TOLUN A, CHESSA L, SANAL O, BERNATOWSKA E, GATTI R A a CONCANNON P. Splicing defects in the ataxia-telangiectasia gene, ATM: underlying mutations and consequences. *Am J Hum Genet.* Jun 1999; 64(6): 1617–1631. DOI: 10.1086/302418.

TICHÝ A, VÁVROVÁ J, PEJCHAL J a REZÁCOVÁ M. Ataxia-telangiectasia mutated kinase (ATM) as a central regulator of radiation-induced DNA damage response. *Acta Medica (Hradec Kralove).* 2010;53(1):13-7.

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

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

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

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

Webový portál - SVOD: epidemiologie zhoubných nádorů v České republice: <http://www.svod.cz/>



## 14 Přílohy

Tabulka č. 6: vybraná hodnotící kritéria akutní toxicity radioterapie dle RTOG/EORTC

<b>Tkáň</b>	<b>Stupeň 1</b>	<b>Stupeň 2</b>	<b>Stupeň 3</b>	<b>Stupeň 4</b>
<b>Kůže</b>	nepatrný erytém, suchá deskvamace, zvýšené pocení	mírný erytém, vlhká deskvamace, střední edém	splyvavá těžká vlhká deskvamace, hluboký edém	Ulcerace, hemoragie, nekróza
<b>Sliznice</b>	nastříknutí sliznic s mírnou bolestivostí nevyžadující analgetika	skvrnitá mukozitida s ev. produkcí serosanquolentního výtoku, středně bolestivá vyžadující analgetika	splyvavá fibrinózní mukozitida, může být silně bolestivá vyžadující narkotika	Ulcerace, hemoragie, nekróza
<b>Horní GIT</b>	nechutenství se ztrátou <5% tělesné hmotnosti v předléčebném období, nauzea nevyžadující antiemtika, břišní dyspepsie nevyžadující parasymptolytika či analgetika	nechutenství se ztrátou <15% tělesné hmotnosti v předléčebném období, nauzea nevracení vyžadující antiemtika, břišní oleš vyžadující analgetika	nechutenství s <15% ztrátou hmotnosti před léčbou ev. výživa pomocí NG sondy či paraenterálně, nauzea nebo vracení vyžadující parenterální podporu, bolest břicha navzdor podání analgetik, hematemesa, melena, abdominální distenze	ileus, subakutní nebo akutní obstrukce, perforace, GI krvácení vyžadující transfúzi, břišní bolest vyžadující dekompresi nebo střevní derivaci
<b>Dolní GIT (pánev)</b>	zvýšená frekvence stolice nebo změna v pravidelnosti bez nutnosti terapie, mírný rektální diskomfort nevyžadující analgetika	průjmy vyžadující parasymptolytika, zvýšená produkce hlenu z konečníku nevyžadující užití vložek, rektální či abdominální bolest vyžadující analgetika	průjmy vyžadující parenterální léčbu, nadměrný výtok hlenu či krve z konečníku vyžadující užití vložek, abdominální distenze	akutní či subakutní obstrukce, píštěl nebo perforace, krácení vyžadující transfúzi, břišní bolest či tenezmy vyžadující střední dekompresi či derivaci
<b>GU tkáň</b>	dvakrát častější frekvence či noční močení než před léčbou, dysurie, urgence nevyžadující medikaci	frekvence močení či noční močení méně časté než 1x za hodinu, dysurie, urgence, spasmus močového měchýře vyžadující lokální anaestetika	frekvence s urgencí a noční močení každou hodinu či častěji, dysurie pánevní bolest či spasmus močového měchýře vyžadující prabidelné užití narcotik, velká hematurie bez koagul	hematurie vyžadující transfúzi, akutní obstrukce močového měchýře nezpůsobená koaguly, ulcerace nebo nekróza
<b>Krevní hodnoty</b>				
Leukocyty x 10 <sup>9</sup>	3.3-<4.0	2.0-<3.0	1.0-<2.0	<1.0
Trombocyty x 10 <sup>9</sup>	75-<100	50-<75	25-<50	<25 nebo sponánní krvácení
Neutrofilů x 10 <sup>9</sup>	1.5-< 1.9	1.0-< 1.5	0.5-< 1.0	<0.5 nebo sepse
Hemoglobin g/l	110-95	<95-75	<75-50	<50

## Informovaný souhlas nemocného

.....  
Jméno pacienta (tiskacím písmem), rodné číslo

### Informace pro pacienta

Vážená paní,

obracíme se na Vás se žádostí o pomoc.

V minulosti jste na Klinice onkologie a radioterapie Fakultní nemocnice Hradec Králové podstoupila léčbu ozařováním pro onemocnění karcinomem děložního čípku. U každé pacientky se po léčbě objevují určité změny ozařovaných tkání, intenzita těchto změn se však může velice lišit. Některým pacientkám, naštěstí pouze v malém procentu, mohou tyto změny působit i komplikace významně ovlivňující život. Protože v současné době nelze jakkoliv odhadnout, jaké bude riziko nežádoucích účinků ozařování, byl na Klinice onkologie a radioterapie FNHK zahájen výzkum, který se touto problematikou zabývá.

Naším cílem je vyšetřit některé geny, které současné vědecké poznání považuje za podezřelé z hlediska rizika rizik komplikací po ozáření, u pacientek, které v minulosti podstoupily radioterapii pro karcinom čípku děložního, a srovnat tyto nálezy s nežádoucími účinky, které pacientky popisovaly a popisují. Pokud bychom našli souvislost mezi rizikem těchto komplikací a stavem těchto genů, mohli bychom v budoucnu rizika následků ozáření předem odhadnout a léčbu těmto následkům přizpůsobit.

Vyšetřování těchto genů (konkrétně je naše pozornost zaměřena na geny zvané ATM a TGF beta) bude probíhat z genetického materiálu – deoxyribonukleové kyseliny, získané z žilní krve. V praxi bychom Vám provedli tedy odběr žilní krve. Následně budeme vyšetřovat v laboratoři Ústavu klinické biochemie a diagnostiky změny těchto uvedených genů. Výsledky vyšetření pak budeme dávat do souvislosti s rozsahem komplikací, které jste uváděla či byly prokázány při klinickém vyšetření lékařem v rámci Vašeho léčebného sledování v ambulanci.

V případě Vašeho souhlasu s výzkumem Vám zaručujeme, že údaje o Vaší osobě budou uchovány s absolutní důvěrností a nebudou prezentovány třetím stranám. Vzorky budou uchovávány anonymně. Získaný materiál nebude použit k jiným než výše uvedeným účelům. Uskladnění a evidence genetického materiálu se řídí platnou legislativou České republiky.

Vaše případné odmítnutí izolace a použití Vaší DNA pro výše zmíněné účely nebude mít žádný dopad na Vaši léčbu.

1/

## Informovaný souhlas nemocného

.....  
Jméno pacienta (tiskacím písmem), rodné číslo

### Souhlas s účastí ve výzkumném projektu

Souhlasím s odběrem vzorku krve k izolaci DNA a s vyšetřením genů ATM a TGF beta.  
Souhlasím s tím, že zdravotní personál, účastnící se výzkumu, může vstupovat do mé zdravotní dokumentace za účelem získání informací o mém zdravotním stavu a komplikacím proběhlé léčby.

.....  
místo a datum

.....  
podpis pacienta /pacientky/

.....  
místo a datum

.....  
podpis lékaře /lékařky/