

UNIVERZA V LJUBLJANI
BIOTEHNIŠKA FAKULTETA

Mateja DELAČ

**VPLIV OKUŽBE S HPV NA ODZIVNOST CELIČNIH
KULTUR PLOŠČATOCELIČNEGA KARCINOMA
USTNEGA ŽRELA NA RADIOTERAPIJO IN
KEMOTERAPIJO**

MAGISTRSKO DELO
(Magistrski študij – 2.stopnja)

Ljubljana, 2013

UNIVERZA V LJUBLJANI
BIOTEHNIŠKA FAKULTETA

Mateja DELAČ

**VPLIV OKUŽBE S HPV NA ODZIVNOST CELIČNIH KULTUR
PLOŠČATOCELIČNEGA KARCINOMA USTNEGA ŽRELA NA
RADIOTERAPIJO IN KEMOTERAPIJO**

MAGISTRSKO DELO
(Magistrski študij – 2.stopnja)

**EFFECT OF HPV INFECTION ON RESPONSIVENESS OF
SQUAMOUS-CELL CARCINOMA CELL LINES OF
HYPOPHARYNX TO RADIOTHERAPY AND CHEMOTHERAPY**

M. Sc. THESIS
(Master Study Programmes)

Ljubljana, 2013

Magistrsko delo je zaključek študija molekulske biologije. Opravljeno je bilo na Oddelku za eksperimentalno onkologijo Onkološkega inštituta Ljubljana.

Študijska komisija Oddelka za biologijo je za mentorico diplomskega dela imenovala prof. dr. Majo Čemažar, za recenzenta pa prof. dr. Roka Kostanjška.

Komisija za oceno in zagovor:

- Predsednica: doc. dr. Blagajana HERZOG VELIKONJA
Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Oddelek za biologijo
- Članica: prof. dr. Maja ČEMAŽAR
Onkološki inštitut Ljubljana, Oddelek za eksperimentalno onkologijo
- Član: prof. dr. Rok KOSTANJŠEK
Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Oddelek za biologijo

Datum zagovora:

Magistrska naloga je rezultat lastnega raziskovalnega dela. Podpisana se strinjam z objavo svoje naloge v polnem tekstu in na spletni strani Digitalne knjižnice Biotehniške fakultete. Izjavljam, da je naloga, ki sem jo oddala v elektronski obliki, identična tiskani verziji.

Mateja Delač

KLJUČNA DOKUMENTACIJSKA INFORMACIJA

ŠD	Du2
DK	616.321-006-085(043.3)=163.6
KG	ploščatocelični karcinom ustnega žrela/humani virus papiloma/celična linija FaDu/celična linija FaDu2A3/kemoterapija/radioterapija
AV	DELAČ, Mateja
SA	ČEMAŽAR, Maja (mentor)
KZ	SI-1000 Ljubljana, Večna pot 111
ZA	Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Oddelek za biologijo
LI	2013
IN	VPLIV OKUŽBE S HPV NA ODZIVNOST CELIČNIH KULTUR PLOŠČATOCELIČNEGA KARCINOMA USTNEGA ŽRELA NA RADIOTERAPIJO IN KEMOTERAPIJO
TD	magistrsko delo (magistrski študij – 2.stopnja)
OP	XIII, 50 str., 5 pregl., 21 sl., 50 vir.
IJ	sl
JJ	Sl/en
AI	Rakava obolenja so z izjemo držav tretjega sveta eden izmed glavnih vzrokov umrljivosti današnjega časa. Najpomembnejša etiološka dejavnika za nastanek ploščatoceličnega karcinoma glave in vratu sta kajenje in alkohol. Kot zelo pomemben etiološki dejavnik pa se ugotavlja tudi humani virus papiloma. Njegova prisotnost v rakavih celicah naj bi napovedovala ugodno prognozo zdravljenja za paciente. Standardno zdravljenje ploščatoceličnega karcinoma glave in vratu predstavljajo operativni poseg, radioterapija ali pa kombinacija radio- in kemoterapije. Rezultati kliničnih retrospektivnih študij so pokazali povečano občutljivost pacientov s ploščatoceličnim karcinomom glave in vratu, okuženih s humanim virusom papiloma, za radio- in kemoterapijo. Ugotovili so, da na izboljššan odziv na radio- in kemoterapijo vplivata virusna onkoproteina E6 in E7, ki uravnata celični cikel. Za razumevanje vpliva teh dveh onkoproteinov na izid terapije so potrebne <i>in vitro</i> študije. Pri naši študiji smo uporabili dve celični liniji ploščatoceličnega karcinoma ustnega žrela: FaDu in njen subklon FaDu2A3, ki je stabilna celična linija, dobljena s transfekcijo s plazmidom, ki ima zapis za onkoproteina E6 in E7. Odziv celičnih linij smo preverjali pri različnih terapevtskih pogojih: obsevanju, kemoterapiji in njuni kombinaciji. Delež preživelih celic smo ugotavljali s testom klonogenosti. Rezultati naše raziskave so pokazali, da prisotnost virusnih onkogenov E6 in E7 v celični liniji FaDu2A3 vpliva na povečano občutljivost teh celic za obsevanje in kombinacijo radio- in kemoterapije. V primerjavi s celično linijo FaDu so se celice FaDu2A3 izkazale za manj občutljive za kemoterapevtik cisplatin.

KEYWORDS DOCUMENTATION

DN Du2
 DC 616.321-006-085(043.3)=163.6
 CX Squamous cell carcinoma of hypopharynx/human papillomavirus/FaDu cell line/FaDu2A3 cell line/chemotherapy/radiotherapy
 AU DELAČ, Mateja
 AA ČEMAŽAR, Maja (supervisor)
 PP SI-1000 Ljubljana, Večna pot 111
 PB Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Oddelek za biologijo
 PY 2013
 TI EFFECT OF HPV INFECTION ON RESPONSE OF HYPOPHARYNGEAL SQUAMOUS CELL CARCINOMA CELL CULTURES TO CHEMOTHERAPY AND RADIOTHERAPY
 DT M. Sc. Thesis (Master Study Programmes)
 NO XIII, 50 p., 5 tab., 21 fig., 50 ref.
 LA sl
 AL Sl/en
 AB Cancer diseases are, with the exception of the third world countries, one of the main causes of the mortality nowadays. Two of the most important aetiological factors for the squamous-cell carcinoma of head and neck are smoking and alcohol. Consumption is that human papilloma virus is another very important aetiological factor. Its presence in the cancer cells should predict a favourable prognosis for the patients. Surgery, radiotherapy and the combination of the radio- and chemotherapy are conventional treatments of the squamous-cell carcinoma of head and neck. The results of the clinical retrospective studies have shown the increased sensitivity to the radio- and chemotherapy of the patients with the squamous-cell carcinoma of head and neck, who have been infected with the human papilloma virus. Viral oncoproteins E6 and E7, which are influencing activity of the cell cycle, have been recognised as the main reason for the improved response to the treatment. For the understanding of the influence of these two oncoproteins on the results of the therapy, in-vitro studies are needed. In our study, two cell lines of the squamous-cell carcinoma of the oropharynx were used: FaDu and its subclone FaDu2A3, which is a stably transfected cell line expressing onkoproteins E6 and E7. The response of the cell lines in the diverse therapeutic conditions was proved: irradiation, chemotherapy and the combination of both. The surviving fraction of the cells with the clonogenic assay was measured. The results of our study have shown that the presence of the viral oncogenes E6 and E7 in the cell line FaDu2A3 increase sensitivity of these cells on the irradiation alone or its combination with chemotherapy. In comparison to the cell line FaDu, the cells FaDu2A3 have proved to be less sensitive to the chemotherapeutic cisplatin.

KAZALO VSEBINE

KLJUČNA DOKUMENTACIJSKA INFORMACIJA.....	III
KEYWORDS DOCUMENTATION	IV
KAZALO VSEBINE	V
KAZALO SLIK.....	VII
SLOVARČEK	X
OKRAJŠAVE IN SIMBOLI	XI
1 UVOD	1
2 NAMEN DELA IN DELOVNE HIPOTEZE	2
3 PREGLED OBJAV	2
3.1 HUMANI VIRUS PAPILOMA	2
3.2 PLOŠČATOCELIČNI KARCINOM USTNEGA ŽRELA	4
3.2.1 Incidenca	4
3.2.2 Način okužbe s HPV	5
3.2.3 Morfologija PCKGV	5
3.2.4 Molekulski mehanizmi delovanja HPV pri kancerogenezi	6
3.2.5 Gostiteljeva kontrola okužbe s HPV	7
3.2.6 Način detekcije	8
3.3 RADIOTERAPIJA.....	9
3.3.1 Vloga HPV pri odzivu na radioterapijo	13
3.4 KEMOTERAPIJA.....	13
3.5.1 Cisplatin.....	16
3.5.1.1 Delovanje.....	17
3.5.1.2 Radiosenzitivizacija.....	19
4 MATERIALI IN METODE	22
4.1 CELIČNI LINIJE.....	22

4.1.1 Celična linija FaDu.....	22
4.1.2 Celična linija FaDu 2A3.....	22
4.1.3 Gojenje celičnih linij.....	23
4.2 IZRAČUNAVANJE RASTNIH KRIVULJ CELIČNIH LINIJ FaDu IN 2A3.....	24
4.3 OPTIMIZACIJA ŠTEVILA CELIC ZA IZVEDBO TESTA KLONOGENOSTI.....	25
4.4 RADIOTERAPIJA.....	25
4.5 KEMOTERAPIJA.....	26
4.6 KOMBINACIJA RADIO IN KEMOTERAPIJE.....	26
4.7 OBDELAVA PODATKOV IN STATISTIČNA ANALIZA REZULTATOV.....	27
5 REZULTATI.....	28
5.1 DOLOČANJE RASTNIH KRIVULJ CELIČNIH LINIJ FaDu IN FaDu2A3.....	28
5.2 OBSEVANJE CELIČNIH LINIJ FaDu in FaDu2A3.....	29
5.3 KEMOTERAPIJA CELIČNIH LINIJ FaDu in FaDu2A3.....	30
5.4 OBČUTLJIVOST CELIČNIH LINIJ FaDu in FaDu2A3 ZA KOMBINACIJO RADIO IN KEMOTERAPIJE.....	32
5.4.1 Kombinacija radio in kemoterapije pri koncentraciji 0,05 µg/ml cisplatina.....	32
5.4.2 Kombinacija radio in kemoterapije pri koncentraciji 0,1 µg/ml cisplatina.....	34
6 RAZPRAVA.....	38
7 SKLEPI.....	44
8 POVZETEK.....	45
9 VIRI.....	46

KAZALO SLIK

Sl. 1: Organizacija krožne DNA človeškega virusa papiloma in njegova integracija v gostiteljev genom	2
Sl. 2: Potek maligne transformacije, povzročene s HPV onkoproteinoma E6 in E7	7
Sl. 3: Posredni in neposredni učinki ionizirajočega sevanja na makromolekule v celici....	10
Sl. 4: Strukturni prikaz cisplatina in karboplatina	16
Sl. 5: Shematski prikaz citotoksične poti cisplatina po reakciji z molekulo vode	17
Sl. 6: Glavni adukti, ki nastanejo po vezavi cis-DDP na DNA: 1,2-znotrajveržni DNA adukt, medveržna povezava, monofunkcijski adukt in protein-DNA povezava. Glavno mesto vezave cis-DDP je N7 mesto gvanina	18
Sl. 7: Popravilo dvojnega preloma DNA verig	20
Sl. 8: Eksplant prve pasaže celične linije FaDu po osmih dneh, vidne so epitelne celice, ki se razraščajo radialno. Del monosloja po tridesetih dneh rasti, opazna je granularnost citoplazme.....	22
Sl. 9: Shema vektorja pLXSN16E6E7	23
Sl. 10: Rastni krivulji celičnih linij FaDu in FaDu2A3	28
Sl. 11: Primerjava občutljivosti celičnih linij FaDu in FaDu2A3 za obsevanje.....	29
Sl. 12: Primerjava zraslih kolonij celičnih linij FaDu in FaDu2A3 pri različnih dozah obsevanja- kontrolna skupina, 2 Gy in 8 Gy	30
Sl. 13: Odziv celičnih linij FaDu in FaDu2A3 na različne koncentracije cisplatina.....	31
Sl. 14: Krivulji odziva celične linije FaDu na kombinacijo radio in kemoterapije (koncentracija cisplatina 0,05µg/ml) ter kontrola samo z obsevanjem	33
Sl. 15: Krivulji odziva celične linije FaDu2A3 na kombinacijo radio in kemoterapije (koncentracija cisplatina 0,05µg/ml) ter kontrola samo z obsevanjem	34
Sl. 16: Krivulji odziva celične linije FaDu na kombinacijo radio in kemoterapije (koncentracija cisplatina 0,1µg/ml) ter kontrola samo z obsevanjem	35
Sl. 17: Kolonije celične linije FaDu po tretiranju z radio in kemoterapijo (koncentracija cisplatina 0,1µg/ml) ter kontrola, tretirana samo z obsevanjem.....	36
Sl. 18: Krivulji odziva celične linije FaDu2A3 na kombinacijo radio in kemoterapije (koncentracija cisplatina 0,05µg/ml) ter kontrola samo z obsevanjem	37
Sl. 19: Kolonije celične linije FaDu2A3 po tretiranju z radio in kemoterapijo (koncentracija cisplatina 0,1µg/ml) ter kontrola, tretirana samo z obsevanjem.....	37

Sl. 20: Primerjava med različnimi dejavniki in okužbo s humanim virusom papiloma 38

Sl. 21: Preživetje frakcij celic HeLa pri obsevanju z dozo 300 Rad (=3Gy) v različnih fazah celičnega cikla, pri čemer čas 0 predstavlja začetek mitoze..... 41

KAZALO PREGLEDNIC

Pregl. 1: Število nasajenih celic pri posameznih koncentracijah cisplatina ($\mu\text{g/ml}$)	26
Pregl. 2: Število nasajenih celic pri kombinaciji radio in kemoterapije	27
Pregl. 3: Število nasajenih celic, ki so bile samo obsevane in so služile kot kontrola pri kombinaciji radio in kemoterapije	27
Pregl. 4: Vrednosti D_0 in D_{10} ($\pm$ SE) za celični liniji FaDu in FaDu2A3 pri kombinirani terapiji (IR in CDDP) s koncentracijo cisplatina $0,05\mu\text{g/ml}$ in kontrolnih skupinah (IR) ..	32
Pregl. 5: Vrednosti D_0 in D_{10} ($\pm$ SE) za celični liniji FaDu in FaDu2A3 pri kombinirani terapiji (IR in CDDP) in kontrolnih skupinah (IR). Koncentracija cisplatina je bila $0,1\mu\text{g/ml}$	35

SLOVARČEK

PLOŠČATOCELIČNI KARCINOM

Ploščatocelični karcinom je posledica nenadzorovane rasti abnormalnih ploščatih celic, ki se nahajajo v zgornjih plasteh kože (v epidermisu). Ta oblika rakavega obolenja je ena glavnih oblik kožnega raka. Pojavlja se tudi v mukoznih tkivih ustno-žrelne votline, sečnega mehurja, prostate, vagine, pljuč ter črevesja.

HUMANI VIRUS PAPILOMA

Gre za heterogeno skupino DNA virusov iz družine *Papillomaviridae*, ki povzročajo okužbe kožnih in mukoznih epitelnih tkiv, in so glavni etiološki dejavnik za nastanek rakavega obolenja materničnega vratu. Okužba s človeškim virusom papiloma je spolno prenosljiva.

RADIOTERAPIJA

Radioterapija je medicinska stroka, ki se ukvarja z zdravljenjem malignih in nemalignih bolezni z ionizirajočim sevanjem. Radioterapijo se lahko uporablja samostojno ali pa v kombinaciji s kirurgijo in sistemskim zdravljenjem. Zaradi omejenega učinka izključno na mesto absorpcije ionizirajočih žarkov jo uvrščamo med lokalne načine zdravljenja.

KEMOTERAPIJA

Kemoterapija ali zdravljenje s citostatiki je sistemsko zdravljenje z zdravili, ki uničujejo nenormalne, bolne celice ali preprečujejo njihovo rast. Namen in domet zdravljenja s citostatiki je torej popolno uničenje bolnih celic in s tem ozdravitev ali pa vsaj zaviranje rasti nenormalnih, bolnih celic in s tem zazdravitev.

CISPLATIN

[cis-diamminochloro platinum(II)] oziroma cisplatin je kemoterapevtski agens, ki se uporablja pri sistemskem zdravljenju številnih oblik rakavih obolenj. Bil je prvi predstavnik platinovih alkilirajočih citostatikov. V celici zaradi prisotnosti platine tvori komplekse z DNA, RNA ter proteini, ki vsebujejo tiolno skupino. Posledica nastalih kompleksov je aktivacija celičnih popravljalnih mehanizmov ali celična smrt.

OKRAJŠAVE IN SIMBOLI

BAK	proapoptotični protein, homologen Bcl-2 (angl. Bcl-2 homologous cell killer)
Cdc2p	od ciklina odvisna kinaza 2 (angl. cyclin-dependent kinase 2 protein)
CDK4-6	od ciklina odvisna kinaza 4-6 (angl. cycline dependent kinase 4-6)
CFS1	receptor kolonij–stimulirajočega faktorja-1 (angl. colony stimulating factor 1)
cis- DDP	[cis-diamminodichloro platinum(II)], cisplatin
D0	interpolirana doza, pri kateri vrednost preživelih celic upade za e^{-1}
D10	doza, pri kateri preživi 10 % klonov
DNA	deoksiribonukleinska kislina (angl. deoxyribonucleic acid)
DNA-PKcs	katalitska enota od DNA odvisne proteinske kinaze (angl. DNA-dependent protein kinase)
E6AP	z virusnim proteinom E6 povezan protein (angl. E6- associated protein)
E2F	transkripcijski faktor pri višjih evkariontih
E6	Onkoprotein, prisoten v človeškem virusu papiloma tipa 16 in 18. S svojim delovanjem vpliva na razgradnjo celičnega proteina p53.
E7	Onkoprotein, prisoten v človeškem virusu papiloma tipa 16 in 18. S svojim delovanjem vpliva na razgradnjo celičnega proteina pRb.
EC50	učinkovita koncentracija, ki ima vpliv na 50 % celic (angl. half maximal effective concentration)
EC90	učinkovita koncentracija, ki ima vpliv na 90 % celic (angl. effective concentration at 90 % population)
EGFR	receptor epidermalnega ravnega faktorja (angl. epidermal growth factor receptor)

FBS	fetalni goveji serum (angl. fetal bovine serum)
G1	faza celične rasti, prva faza interfaze
G2	faza nadaljnje rasti celice in priprave na mitozo, zadnja faza interfaze
GSH	glutation
HIF-1	s hipoksijo inducirajoči faktor 1 (angl. hypoxia inducible factor)
HIV	virus, ki povzroča oslABLJeno imunost (angl. human immunodeficiency virus)
HPV	humani virus papiloma
HPV+	za HPV pozitivna rakava obolenja
HPV-	za HPV negativna rakava obolenja
IHC	imunohistokemija (angl. immunohistochemistry)
ISH	<i>in situ</i> hibridizacija (angl. <i>in situ</i> hybridization)
M	faza celične delitve celičnega cikla, sestavljena iz mitoze in citokineze
MMRp	proteini za popravilo neujemanja baznih parov (angl. mismatch repair proteins)
MT	metalotionein
NERp	proteini za popravilo z izrezovanjem nukleotidov(angl. nucleotide excision repair)
NHEJ	popravilo z nehomolognim združevanjem koncev (angl. non-homologous end joining)
p16	od ciklina odvisen kinazni inhibitor 2A (=CDKN2A, p16 ^{Ink4A}) (angl. cyclin-dependent kinase inhibitor 2A)

p21	Od ciklina odvisni kinazni inhibitor 1 (angl. cyclin-dependent kinase inhibitor 1)
p53	V človeških celicah prisoten tumor supresorski protein. V primeru poškodbe v celici zaustavi celični cikel v fazi G1.
PCKGV	ploščatocelični karcinom glave in vratu
PCR	verižna reakcija s polimerazo
PDGFbeta	receptor trombocitnega rastnega faktorja beta (angl. platelet-derived growth factor beta receptor)
PE	število izraslih kolonij (angl. plating efficiency)
pRb	V človeških celicah prisoten tumor supresorski protein, kodiran z genom RB. Ključen je pri prehodu celičnega cikla iz faze G1 v fazo S.
RNA	ribonukleinska kislina (angl. ribonucleic acid)
S	celična faza, v kateri poteka podvajanje DNA
SF	delež preživelih celic (angl. surviving fraction)
VEGF	vaskularni endotelijski rastni faktor (angl. vascular endothelial growth factor)
wt	divji tip, naravni fenotip (angl. wild-type)

1 UVOD

Glavna etiološka dejavnika za nastanek ploščatoceličnega karcinoma glave in vratu sta kajenje in alkohol. Velik delež pacientov s to obliko rakavega obolenja pa ni kadilcev in ne posegajo po alkoholu. Pri tej skupini pacientov v kateri so prevladujoči belopolti moški srednjih let, je bil kot najpomembnejši etiološki dejavnik za nastanek rakavega obolenja ugotovljen humani virus papiloma (HPV).

Izmed več kot 100 različnih oblik HPV jih ima najmanj 15 onkogeni potencial, HPV16 in HPV18 pa sta že več kot 20 let znana kot najpomembnejša dejavnika pri patogenezi raka materničnega vratu. Do vse večje prisotnosti okužbe s HPV v ustno–žrelni votlini naj bi prihajalo zaradi pogostega menjavanja predvsem oralnih spolnih partnerjev.

Kot standardno zdravljenje zgodnjih oblik ploščatoceličnega karcinoma glave in vratu se uporabljata operativni poseg ali radioterapija. Pri napredovanih karcinomih glave in vratu pa se v kombinaciji uporabljata radioterapija in kemoterapija.

Rezultati kliničnih retrospektivnih in prospektivnih raziskav so pri bolnikih s HPV pozitivnim ploščatoceličnim karcinomom glave in vratu pokazali statistično izboljšanje obvladovanja bolezni in celokupnega preživetja. Okužba s HPV je dober prognostični dejavnik za izid bolezni predvsem zaradi povečane občutljivosti za radioterapijo in kemoterapijo. HPV posreduje kancerogene učinke preko dveh onkoproteinov: E6 in E7, ki vplivata na regulacijo celičnega cikla. HPV deluje na radiosenzibilizacijo najverjetneje preko regulacije tumor supresorskega gena p53. Le-ta je pri tej obliki ploščatoceličnega karcinoma glave in vratu praviloma ohranjen v intaktni obliki. Da bi bolje razumeli molekulske mehanizme vplivanja HPV na razvoj in odziv rakavih celic, so potrebne dodatne študije *in vitro*.

2 NAMEN DELA IN DELOVNE HIPOTEZE

Namen magistrskega dela je razviti eksperimentalno metodo za oceno odziva humane celične linije ploščatoceličnega karcinoma FaDu in njenega subklona FaDu2A3, ki proizvaja onkoproteina E6 in E7 na radio in kemoterapijo. Uporabljeni kemoterapevtik je bil cisplatin [cis-diamminedichloro platinum(II)]. Za določitev vpliva na preživetje celične linije FaDu in FaDu2A3 smo testirali različne doze obsevanja in cisplatina, tako samostojno kot v različnih kombinacijah.

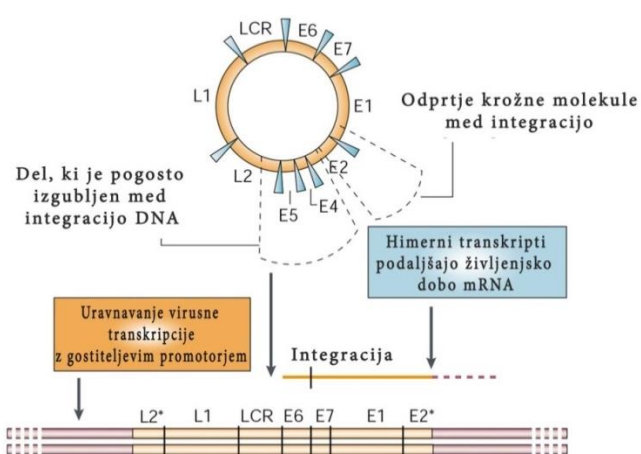
V okviru magistrskega dela smo zastavili naslednjo hipotezo:

Celice, okužene s HPV, so bolj občutljive za radio- in kemoterapijo.

3 PREGLED OBJAV

3.1 HUMANI VIRUS PAPILOMA

Humani virusi papiloma (HPV) predstavljajo heterogeno skupino epiteliotropičnih DNA virusov, ki povzročajo okužbe kožih in mukoznih epitelnih tkiv. Preferenčno je njegova tarča visoko specializiran večplastni ploščati epitelij, ki obdaja ugreznine v limfatičnem tkivu tonzile. Intrinzične lastnosti epitelijske celice, ki ga delajo občutljivega za okužbo še niso znane (Marur in sod., 2010). Življenjski cikel človeških virusov papiloma se razlikuje od vseh ostalih virusnih družin. Za okužbo so potrebne epidermalne ali mukozne epitelijske celice, ki so še vedno sposobne proliferacije (celice bazalne plasti). Organizacija genoma HPV je med različnimi virusnimi tipi dobro ohranjena. Vsi so brez ovojnice in imajo krožni, dvovijačni genom z okoli 6800–8000 baznimi pari. Ti so razdeljeni v osem odprtih bralnih okvirjev, ki kodirajo dva ključna razreda proteinov- zgodnje in pozne proteine (sl. 1).



Slika 1: Organizacija krožne DNA človeškega virusa papiloma in njega vključitev v gostiteljev genom (prirejeno po Zur Hausen, 2002; 343)

Zgodnji proteini upravljajo z regulacijo DNA (proteina E1 in E2), transkripcijo RNA (protein E2) in celično transformacijo (proteini E5, E6 in E7). Pozna proteina L1 in L2 pa sta strukturni komponenti virusne kapside. Ekspresija genov je močno povezana in regulirana s stopnjo diferenciacije okužene celice ploščatega epitelija. V celicah bazalnega sloja epitelija je ekspresija virusnih genov močno zavrta, v maloštevilnih kopijah se izražajo le specifični zgodnji virusni geni (E5, E6 in E7). Po vstopu v suprabazalne plasti epitelija se začne prepis poznih genov, takrat se podvoji virusni genom in tvorijo se strukturni proteini. V zgornjih plasteh epidermisa ali mukoze se virusni delci dokončno sestavijo in sprostijo. Virusna DNA se navadno podvaja v zunaj kromosomski obliki. Pri maligno transformiranih celicah se virusna DNA integrira v celično DNA, integracija pa pogosto povzroči delecijo velikega dela virusnega genoma. Krožna molekula se odpre znotraj E2 odprtega bralnega okvirja, kjer pride do izreza dela molekule in posledične nefunkcionalnosti tega dela genoma. Del E2 in odprti bralni okvirji, ki mu sledijo (E4, E5 in del L1), so ob integraciji navadno izgubljeni. Po deleciji ostaneta E6 in E7 glavna odprta bralna okvirja, najdena pri karcinomih. Neprestana transkripcija genov E6 in E7 v tumorjih kaže na njuno pomembno vlogo pri transformaciji normalne celice v maligno (Devaraj in sod., 2003).

Aktivnost pri stimulaciji proliferacije kažejo trije geni- E5, E6 in E7. E5 je pomemben pri zgodnjih fazah okužbe. Stimulira celično rast s tvorbo kompleksa z receptorjem epidermalnega rastnega faktorja (EGFR; epidermal growth factor receptor), receptorjem trombocitnega rastnega faktorja beta (PDGFBeta; platelet-derived growth factor- β receptor) in receptorjem kolonij-stimulirajočega faktorja-1 (CFS1; colony stimulating factor 1). E5 preprečuje apoptozo, ki bi normalno sledila poškodbi DNA. Ko s HPV okužene lezije napredujejo v rakave tvorbe, se episomalna virusna DNA integrira v gostiteljevo DNA in velik del genoma, vključujoč E5, so odstrani, kar kaže na to, da E5 ni nujno potreben pri kasnejših dogodkih s HPV posredovane karcinogeneze. Pomembnejšo vlogo pri maligni transformaciji imata gena E6 in E7. Inhibicija njune ekspresije prepreči nastanek malignega fenotipa v rakavih celicah. Vsak posebej je sposoben narediti človeške celice v tkivnih kulturah nesmrtni, a je njuna učinkovitost še povečana, če se izražata skupaj. E2 zavira izražanje E6 in E7, a ko je le-ta odstranjen ob vključitvi v genom, se poveča ekspresija E6 in E7, kar omogoča ohranitev nesmrtnega fenotipa (Goon in sod., 2009)

Glavne lastnosti proteina E6 izhajajo iz njegove interakcije s tumor supresorskim proteinom p53 in pro-apoptotičnim proteinom BAK (Bcl-2 homologous antagonist killer), ki se odražajo v rezistenci proti apoptozi in v kromosomski nestabilnosti. Razgradnja p53 je inducirana preko proteolize posredovane z ubikvitinom in vodi v izgubo aktivnosti proteina p53. Vloga p53 je ustavitev celic v G1 ali indukcija apoptoze, kar omogoča popravilo gostiteljeve DNA. Celice z izraženim E6 niso več sposobne s p53 posredovanega odziva na poškodbo DNA, s čimer se poveča dovzetnost za genomsko nestabilnost (Marur in sod., 2010).

E7 zaradi vezave na gen za tumor supresorski protein pRb povzroči razgradnjo njegovega produkta, čemur sledi sprostitvev transkripcijskega faktorja E2F, ki tako ni več inhibiran s pRb. Sledi povečana ekspresija lokusa INK4A, kjer je zapis za gen p16 (od ciklina odvisen kinazni inhibitor 2A). Zaradi povratnih zank pride do povečane ekspresije p16, katerega produkt inhibira aktivnost kompleksa ciklinD- CDK4/6 (Lassen, 2010). Visoka aktivnost E2F lahko vodi v apoptozo, E7 pa še dodatno stimulira gene za cikline faze-S, kar zavira delovanje inhibitorjev od ciklinov odvisnih kinaz (CDK; cyclin dependent kinase). Potek celičnega cikla je moten, kar vodi v proliferacijo in maligno transformacijo (Marur in sod., 2010). Preko pomnožitve centriolov E7 povzroča aneuploidijo, ki še dodatno pripomore h kancerogenezi (Zur Hausen, 2002).

Danes je izoliranih že več, kot 100 genetsko različnih podtipov HPV iz virusne družine *Papillomaviridae*, vsaj 15 pa jih ima onkogeni potencial. Ljudje so edini znani rezervoarji zanj, prenaša se z neposrednim fizičnim kontaktom s človeka na človeka.

Podtipi HPV (HPV6, 11), ki povzročajo benigne hiperproliferacije epitelijskega tkiva, papilome in bradavice, so kategorizirani kot HPV z nizkim tveganjem (low-risk). Najpogostejše jih najdemo v karcinomih tonzil in grla. Znano je, da redke benigne papilome grla preidejo v maligno transformacijo, a če do tega dogodka pride, je vedno prisoten podtip HPV11. HPV z nizkim tveganjem so prisotni tudi pri nekaterih drugih malignih tvorbah, kot sta Ackermanov in Buscke-Lowenstein tumor (Goon in sod., 2009). Podtipi HPV z visokim tveganjem (high-risk) (HPV16, 18, 31, 33, 35) pa so definirani z epidemološko povezavo z malignimi tvorbami in rakom materničnega vratu. HPV16 in 18 vplivata na transformacijo primarnih človeških keratinocitov tudi v epiteliju respiratornega trakta (Gillison, 2004).

3.2 PLOŠČATOCELIČNI KARCINOM USTNEGA ŽRELA

3.2.1 Incidenca

Rakava obolenja glave in vratu so šesta najpogostejša oblika raka na svetu. Zaradi tesne povezave med ploščatoceličnim karcinomom glave in vratu (PCKGV) in kajenjem so predvidevali, da bo incidenca PCKGV upadla v nekaj desetletjih po zmanjšanju uporabe tobaka. V 80. letih 20. stoletja se je res začela manjšati pojavnost karcinoma grla, ustnega dna, dlesni in številnih drugih rakavih obolenj ustne votline. V nasprotju s pričakovanji pa je stopnja incidence karcinomov jezika, tonzil in ostalih žrelnih regij ob prehodu v novo tisočletje začela naraščati. Ti nasprotujoči si trendi v incidenci PCKGV so vplivali na pojav ideje o novem karcinogenem dejavniku (Ang in Sturgis, 2011). V zadnjem desetletju je zaznana povečana incidenca ploščatoceličnih karcinomov mezofarinksa, še posebno jezika in palatinalnih tonzil pri belopoltnih moških, mlajših od 50 let in brez zgodovine uporabe tobaka ali alkohola. Kljub temu, da je HPV znan kot pomemben povzročitelj anogenitalnih rakavih obolenj, je vedno bolj prepoznan tudi kot vzrok za pojav PCKGV.

Tobak, alkohol, slaba ustna higiena in genetske lastnosti ostajajo pomembni dejavniki tveganja za PCKGV, vendar pa je HPV sedaj prepoznan kot eden izmed primarnih vzrokov za ploščatocelična rakava obolenja mezofarinksa. Oralna okužba s HPV je pogosta pri kadilcih in nekadilcih in je pomemben vzrok za nastanek rakavih obolenj mezofarinksa pri obeh skupinah. To je pokazatelj, da se s HPV povezane malignosti pojavljajo tudi pri ljudeh s tradicionalnimi dejavniki tveganja: uporabo tobaka in alkohola (Marur in sod., 2010). Prisotnost HPV16 je celo večja pri PCKGV kot pri raku materničnega vratu. To odraža razlike v življenjskih ciklihi različnih podtipov HPV na različnih mukoznih lokacijah (Goon in sod., 2009). Na podlagi dostopnih dokazov je International Agency for Research on Cancer leta 2007 prišla do zaključka, da je HPV16 vzrok za karcinom mezofarinksa (IARC Monograph, 2007).

V primerjavi s tradicionalnim PCKGV, ki je povezan z uporabo tobaka, se pacienti okuženi s HPV, bolje odzivajo na zdravljenje. Pacienti s to obliko rakavega obolenja imajo boljše možnosti za dolgoročno preživetje, a se pri njih večkrat pojavlja s terapijo inducirana obolevnost: poškodbe tkiva, mukozitoze. Zato so potrebne spremembe v vrednotenju, določanju stopnje napredovanja in zdravljenju za to skupino pacientov (Ang in Sturgis, 2011; Bernier in Bentzen, 2002).

3.2.2 Način okužbe s HPV

Okužba s HPV je spolno prenosljiva. Povečana incidenca pri mladih posameznikih se pripisuje spremembi spolnih norm (več oralnih spolnih partnerjev, oralni spolni odnosi pri zgodnejših starostih in pogostejše kot v preteklih generacijah). Na razliko pojavnosti HPV pozitivnih (HPV+) rakavih obolenj mezofarinksa med spoloma vpliva večja prevalenca HPV v tkivu materničnega vratu kot na penisu (Marour in sod., 2010).

3.2.3 Morfologija PCKGV

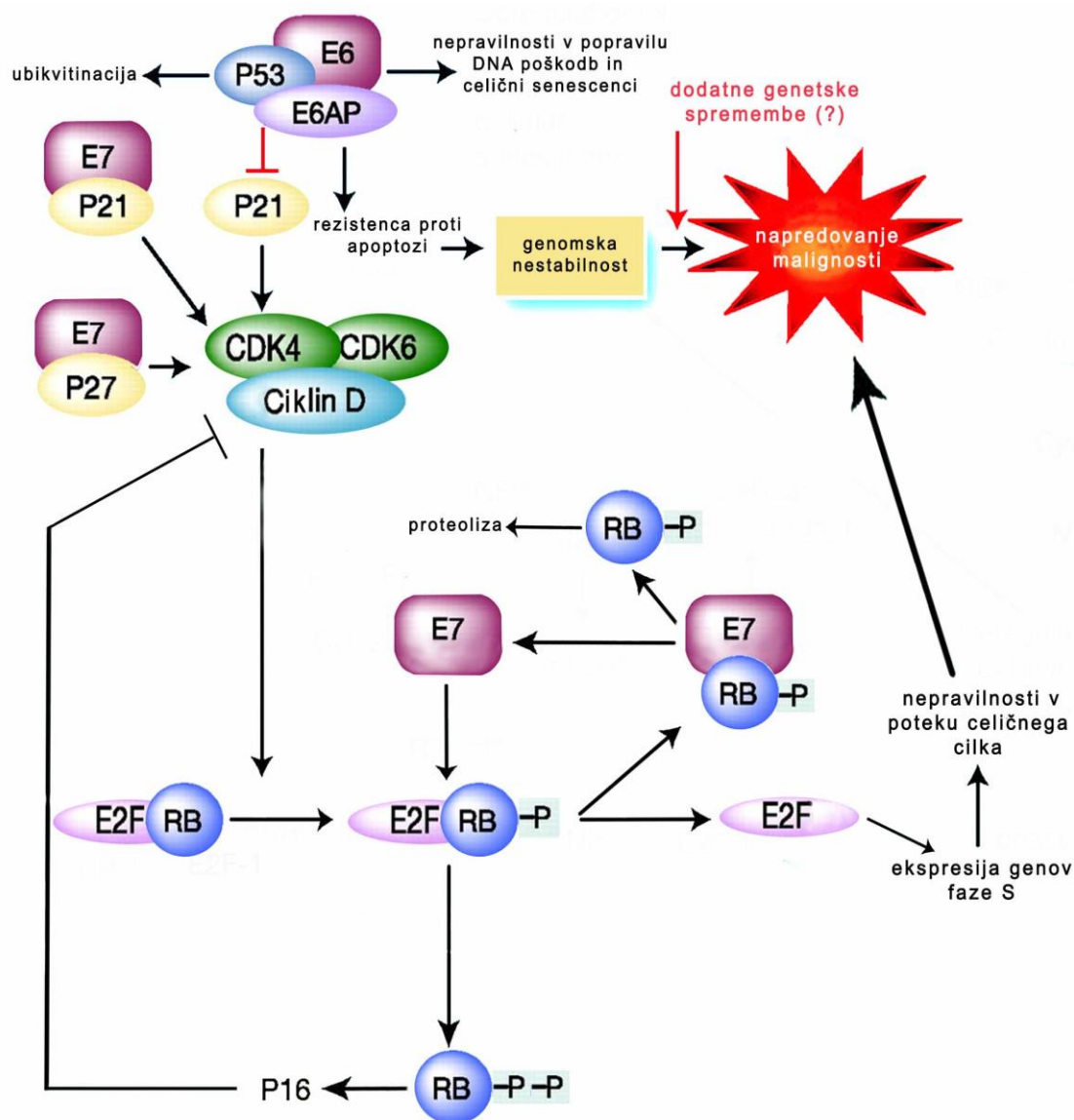
Morfološko so celice PCKGV karakterizirane kot zmerno diferencirane in keratinizirane, a HPV+ karcinomi odstopajo od te definicije. Slednji nastanejo v tonziliarnih kriptah, niso povezani z displazijo površine epitelija, kažejo lobularno rast, so infiltrirani z limfociti, pri njih ne pride do klinično značilne keratinizacije in imajo vidno bazaloidno morfologijo. HPV+ karcinom mezofarinksa je bil pogosto napačno interpretiran kot slabo diferenciran karcinom zaradi prisotnosti nezrelih tumorskih celic ali pa je bil opisan kot bazaloidni karcinom z lobularno rastjo celic s hiperkromatičnim jedrom in visokim razmerjem jedro-citoplazma. Prisotnost HPV povzroči pojav bazaloidnega ploščatoceličnega karcinoma z bolj indolentnim razvojem bolezni (Ang in Sturgis, 2011). S HPV povezana rakava obolenja mezofarinksa so lokalno napredovana (III. stopnje) ali metastazirajo (IV. stopnje), nodalne metastaze so cistične ali večstopenjske (Marur in sod., 2010). Za razliko od rakavega obolenja vratu in glave povzročenega zaradi uporabe tobaka in alkohola, pri HPV+ ni prisotna področna kancerogeneza. Zgodnjim genetskim spremembam epitelija

tako ne sledi pojav številnih neodvisnih lezij, kar je lahko razlog za boljši odziv na zdravljenje (Goon in sod., 2009).

3.2.4 Molekulski mehanizmi delovanja HPV pri kancerogenezi

Z uporabo za HPV specifične verižne reakcije s polimerazo (PCR; polymerase chain reaction) in fluorescenčne hibridizacijske *in situ* (ISH) analize so pokazali razlike v kromosomskih in genetskih profilih HPV+ in HPV negativnih (HPV-) tumorjev. HPV-tumorji imajo veliko število kromosomskih nepravilnosti in pomnožitev. Imajo več izgub na delih kromosomov 3p, 5q, 9p, 15q in 18q ter pomnožitve v regiji 11q13. Več izgub v regiji 16q pri s HPV povezanih karcinomih mezofarinksa močno determinira boljše celokupno preživetje, preživetje brez bolezni in neponovljivost tumorja (Ang in Sturgis, 2011).

V biološkem modelu PCKGV, induciranem s HPV, so pokazali, da povečano izražanje gena za p16 povzroči inaktivacijo in proteolitski razpad proteinov p53 in pRb z virusnimi onkoproteini E6 in E7 (sl. 2). To vodi do motenj v kontroli celičnega cikla in pri popravilu poškodb DNA. Ključnega pomena je, da gena pRb in p53 nista inaktivirana z mutacijo, pri čemer ta tumor supresorska gena ostaneta intaktna. Pri PCKGV, induciranih z uporabo tobaka ali alkohola, pride do mutacije genov p53 in pRb in izgube njunih signalnih poti. Ohranjen protein p53 vodi do obnovitve apoptotskih poti, kar pripomore k boljšemu odzivu na terapijo (Goon in sod., 2009). Od ciklina odvisna kinaza 4-6 in kinaza D (CDK4-6/D kinase) vodita v fosforilacijo proteina pRb kot odziv na rastne signale. To vodi v sprostitev faktorja E2F in aktivacijo ključnih genov za prehod iz G1 v S fazo celičnega cikla. Proteoliza pRb se zaradi prisotnosti proteina E7 odraža v povečani koncentraciji proteina p16, zaradi negativne povratne zanke pa je posledično manj ciklina D. Celični protein E3-ubikvitinska ligaza z virusnim proteinom E6 tvori protein E6AP (E6-associated protein) za proteolitsko razgradnjo proteina p53. Rezultat razgradnje je motena regulacija kontrolnih stopenj G1/S in G2/M celičnega cikla (Chung in Gillison, 2009). Gen 14-3-3 σ , ki ga inducira p53, ima vlogo v ohranjanju celične senescence v stratificiranem epitelu. Zmanjšanje njegovega prepisovanja poveča nesmrtnost primarnih keratinocit. Promotorska regija tega gena je pogostejše metilirana pri HPV- kot pri HPV+ PCKGV (Gillison, 2004). Pri PCKGV je p16 inaktiviran zaradi delecije, točkovne mutacije ali metilacije promotorja. Med nesmrtnostjo HPV16 inducira ekspresijo p16, njegova povečana ekspresija je močno povezana z displastičnimi lezijami materničnega vratu in toziliarnega epitelijskega. Receptor epidermalnega rastnega faktorja je tirozinska kinaza, s številnimi ligandi ter efektorji in vpliva na proteine regulatorje v razvoju rakavega obolenja. Pri PCKGV je EGFR čezmerno izražen, a njegova vloga pri tumorogenezi še ni povsem znana, tako kot ni znana njegova prognostična vrednost. Je pa povezan s povečano lokalno ponovitvijo bolezni in znižanjem preživetja. Različne študije si še vedno nasprotujejo v tem, ali je EGFR pomemben pri tumorski diferenciaciji (Mendelsohn in sod., 2010).



Slika 2: Potek maligne transformacije, povzročene s HPV onkoproteinoma E6 in E7 (prirejeno po Chung in Gillison, 2009, in Gillison, 2004)

3.2.5 Gostiteljeva kontrola okužbe s HPV

HPV se je razvil do te mere, da se izogne imunskemu sistemu, saj so pacienti s kronično okužbo imunsko tolerantni. Pri ženskah z oslabljenim imunskim sistemom je povečano pojavljanje znotrajepitelnih ploščatoceličnih lezij, ki se težje zdravijo. Iz tega lahko sklepamo o pomembnosti imunskega sistema pri kontroli okužbe s HPV. Antigen za HPV-E7 se nahaja v epitelih celicah, daleč od dosega imunskih celic. V izogib antigen predstavitvenim celicam se okužba in pomnoževanje odvijajo v bazalnem epiteliju. Langerhansove in dendritske celice dosežejo E7 samo v luščenem epiteliju ali z eksosomi.

HPV-16 E7 blokira indukcijo promotorjev genov za interferon- α in interferon- β . Pacienti z okužbo s HPV16 imajo povečan T-celični odziv proti epitopu 11-20 proteina E7. K izogibu virusa imunskemu sistemu pripomorejo tudi antigenski motivi proteina E7, ki so podobni kot pri številnih človeških proteinih. Vse to se odraža v nizki imunogenosti HPV. Problem rakavih bolnikov je tudi lokalno spremenjeno okolje citokinov in oslabljen funkcija celic T (Vu in sod., 2010). Izognitev tumorskih celic imunskemu sistemu lahko pripišemo različnim modifikacijam celičnega antigen-predstavitvenega sistema (vključujoč proteasomski transportni sistem, HLA receptorje in celični sistem prepoznavanja predstavljenih oligopeptidov), kar pomembno vpliva na napredovanje s HPV povezanih tumorjev (Zur Hausen, 2002).

Prevalenca s HPV povezanih bolezni (okužb in rakavih obolenj) je večja pri pacientih s transplantanti in HIV pozitivnih pacientih. Ti dve skupini imata oslABLjeno celično posredovano imunost. Cepiva proti HPV s potencialom za terapevtsko učinkovitost morajo ustvariti povečan za HPV specifičen celično posredovan imunski sistem (Devaraj in sod, 2003).

Imunski odziv poveča učinkovitost protitumorskega delovanja cisplatina in obsevalne terapije ter je potreben za popolno odstranitev tumorskih celic. To nam pomaga razumeti, zakaj imajo pacienti z zmanjšano imunostjo slabši odziv na terapijo (Spanos in sod., 2009).

3.2.6 Način detekcije

Detekcija virusnih partiklov HPV je zanesljiv znak prisotnosti in napredovanja bolezni, kar usmerja zdravljenje od zaznave bolezni do kasnejših tumorskih stopenj (lokalizacija izvora in izbira zdravljenja) in selekcije pacientov z boljšim odzivom na določeno vrsto zdravljenja. Prav zato bi bil potreben razvoj zanesljive metode za zaznavanje HPV. Trenutno so v uporabi številne tehnike—od konsenzusnih in vrstno specifičnih metod PCR, PCR v realnem času za zaznavo virusnega vnosa, za DNA vrstno specifična hibridizacija *in situ* (ISH), detekcija serumskih protiteles, ki delujejo neposredno proti HPV epitopom in imunohistokemijska (IHC) detekcija nadomestnih biomarkerjev (protein p16). Kot standard za odkrivanje prisotnosti HPV se uporablja PCR detekcija ekspresije virusnega onkogene E6 v zamrznjenih tkivnih vzorcih, vendar pa izbiri testov za klinično uporabo usmerjajo uspešnost, specifičnost, cena, ponovljivost in izvedljivost (Ang in Sturgis, 2011).

Hibridizacija *in situ* omogoča neposredno vizualizacijo razširjenosti HPV v tkivnem vzorcu. Zaradi razvoja ne-fluorescentnih kromogenov je možno DNA hibridizaciji slediti tudi s presevnim svetlobnim mikroskopom. Lokalizacija HPV genoma v jedrih tumorskih celic nam omogoča razločevanje med etiloško pomembno HPV okužbo in kontaminacijo. Z vključitvijo novih postopkov, ki ojačajo signal, se je močno izboljšala občutljivost te tehnike. Z ISH lahko danes zaznamo eno samo kopijo virusne DNA v posamezni celici (Ang in Sturgis, 2011). Detekcija virusa z metodami nekvantitativnega PCR ne razlikuje

med transkripcijsko aktivnimi (klinično pomembnimi) in neaktivnimi (klinično nepomembnimi) okužbami. Tako velika občutljivost hibridizacije *in situ* ne pomeni tudi specifičnosti zaznave. Pri HPV pozitivnih karcinomih mezofarinksa transkripcija virusnega onkoproteina E7 inaktivira funkcijo produkta gena Rb, kar povzroči povečano ekspresijo p16. Količine proteina p16 pa so zadostne za imunohistokemijsko zaznavo, zaradi česar je p16 pogosto imenovan kot nadomestni označevalec okužbe s HPV pri mezofaringealnih rakavih obolenjih. Zaradi omejitev posameznih testov bi se lahko uporabljalo kombinacijo komplementarnih testov. Zelo verjetna strategija vključuje imunohistokemijsko zaznavo p16 in HPV hibridizacijo *in situ*, s čimer je dosežena 100 % občutljivost. Imunobarvanje p16 je dober prvi test za eliminacijo HPV negativnih primerov iz nadaljnjih analiz. Ob skoraj 100 % specifičnosti pa HPV16 hibridizacija *in situ* izloči lažne p16 pozitivne rezultate (Marur in sod., 2010).

Primerjava testov p16 IHC in HPV16 ISH na seriji PCKGV je pokazala odstopanja, nastala predvsem zaradi vzorcev, negativnih pri HPV16 ISH in pozitivnih na p16 IHC. Z uporabo E6/E7 mRNA kot standarda za HPV okužbo se je p16 izkazala za 100 % občutljivo, a le 80 % specifično. Gen p16 se izraža tudi v bazaloidnih karcinomih, ki niso povezani z okužbo s HPV (karcinomi dojk, pljuč in kože). Prekomerno izražanje gena p16 je lahko posledica inaktivacije retinoblastomske poti z mutacijo, spremenjene metilacije ali mutacije gena p16 (Goon in sod., 2009).

Virusni vnos se med PCKGV zelo razlikuje, prisotnih je več kopij virusa kot pri rakavem obolenju materničnega vratu. Tumorji, kjer je virusna DNA episomalna, so večji kot pri pacientih z integrirano ali kombinacijo episomalne in integrirane DNA. Večja količina episomalne DNA tako najverjetneje inducira hitrejšo rast tumorjev in večjo ekspresijo onkogenov. Večji virusni vnos pa je prepoznan kot ugoden prognostični dejavnik. Z uporabo meritev virusnega vnosa HPV16 in ekspresije gena p16 lahko rakavem obolenju glave in vratu razdelimo v tri različne profile: Razred I- HPV- in malo p16, Razred II- HPV+ in malo p16 ter Razred III- HPV+ in veliko p16 (Goon in sod., 2009). Tumorji razreda III. imajo statistično boljše petletno preživetje, preživetje brez bolezni in znižano lokalno ponovitev bolezni. Imajo velik virusni vnos in nizke količine proteinov p53 in Rb. Ti tumorji so slabo diferencirani, pacienti pa imajo redko zgodovino uporabe tobaka ali alkohola. Tumorji II skupine kažejo podoben molekularni profil kot HPV- tumorji, a imajo v primerjavi z njimi večjo verjetnost lokalne ponovitve. Ta razred tumorjev se najverjetneje pojavi, ko so s tobakom ali alkoholom povezani tumorji okuženi še s HPV z visokim tveganjem. Pri razredih I in II je delež petletnega preživetja nižji v primerjavi z razredom III (Weinberger, 2006).

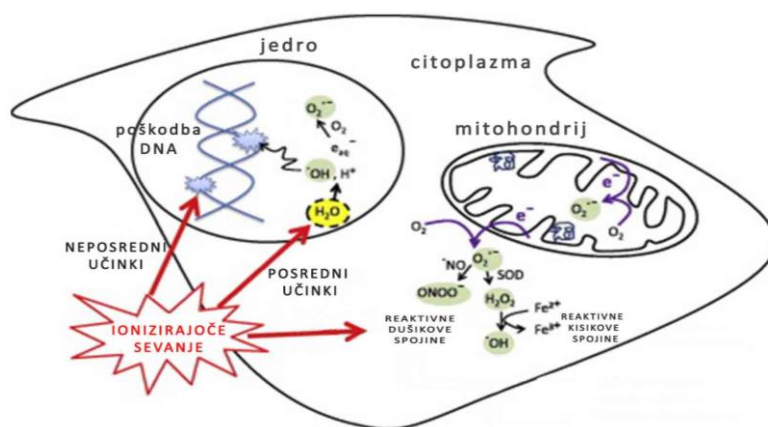
3.3 RADIOTERAPIJA

Radioterapija je medicinska stroka, ki se ukvarja z zdravljenjem malignih in nemalignih bolezni z ionizirajočim sevanjem. To je sevanje, ki ima dovolj visoko energijo, da pri

interakciji s snovjo povzroča ionizacije. Verižne reakcije zaradi interakcij z elektroni v atomih privedejo do prekinitve vezi med molekulami in do sprememb v biokemičnih poteh. Radioterapijo se lahko uporablja samostojno ali pa v kombinaciji s kirurgijo in sistemskim zdravljenjem. Zaradi omejenega učinka izključno na mesto absorpcije ionizirajočih žarkov, jo uvrščamo med lokalne načine zdravljenja. Cilj radioterapije je aplicirati natančno določen odmerek sevanja ob čim manjši okvari zdravih tkiv v neposredni okolici (Novaković in sod., 2009).

Odločilni za razvoj radioterapije so bili 5. novembra 1895 odkriti žarki X (C. W. Röntgen). Šveda Thor Stenbeck (1864 – 1914) in Tage Sjögren (1859 – 1939) sta bila leta 1900 prva, ki sta ozdravila rakavo obolenje (T. Stenbeck–bazalni celični karcinom nosu, T. Sjögren–karcinom lica) s pomočjo žarkov X (Wagener, 2009). Tehnološke izboljšave v 20. stoletju (kobalni vir sevanja, linearni pospeševalnik, dvoenergijski in dvomodalitetni linearni pospeševalnik, računalniško vodeni pospeševalniki, večlistni kolimatorski sistem, sistemi za tridimenzionalno načrtovanje obsevanj) so pripeljale do razvoja radioterapije, kakršno poznamo danes (Novaković in sod., 2009).

Ionizirajoče sevanje ima učinke na molekularni, celični oziroma tkivni ravni ter ravni organov in celotnega telesa. Prva faza razvoja sevalne poškodbe je absorpcija energije v biološki snovi, ki vodi do ionizacije–prekinitve kemičnih vezi v makromolekulah in prostih radikalov. Spremenjeni atomi in molekule nato hitro reagirajo z drugimi celičnimi sestavinami. Nastale poškodbe organskih makromolekul, predvsem DNA, ki predstavlja kritično tarčo, poskušajo popraviti celični popravljalni mehanizmi. Če je popravilo neuspešno, lahko pride do sprememb v delovanju celic, mutacij DNA ali celične smrti. Ionizacija v tkivu je naključni dogodek, zato lahko govorimo le o verjetnosti, da bo prišlo do poškodbe kritične tarče. Zaradi ionizacije gradnikov molekule DNA lahko nastajajo dvojni prelomi in takrat govorimo o neposrednih učinkih sevanja. Pri neposrednih učinkih sevanja pa prosti radikali, nastali pri radiolizi vode, povzročajo enojne prelome DNA (sl. 3) (Novaković in sod., 2009).



Slika 3: Posredni in neposredni učinki ionizirajočega sevanja na makromolekule v celici (prirejeno po Azzam in sod., 2012: 48)

Občutljivost tumorjev za radioterapijo je opisana kot odvisnost od 5 'R' – popravilo (repair), obnovitev populacije celic (repopulation), reoksigenacija (re-oxygenation), prerazporeditev (redistribution) in intrinzična radioobčutljivost (intrinsic radiosensitivity). Popravilo in obnovitev populacije se navezujeta na okoliško tkivo pri frakcionirani radiaciji, reoksigenacija in prerazporeditev pa neposredno vplivata na radioobčutljivost (Novaković in sod., 2009).

Popravilo obsevalne poškodbe je kompleksen proces, ki obsega popravilo subletalne poškodbe z različnimi popravljivimi mehanizmi (Novaković in sod., 2009). Zmožnost popravila poškodbe DNA ima najverjetneje najpomembnejšo vlogo pri rezistenci na ionizirajoče sevanje. Ključne poti popravila so tiste, ki popravljajo poškodbe dušikovih baz ter enojne in dvojne prelome. Vključujejo popravilo z izrezovanjem baz (BER; base excision repair), popravilo prelomov enojnih verig (SSBR; single-strand break repair), ter dva načina popravila dvojnih prelomov – popravilo s homologno rekombinacijo (HR; homologous recombination) ter združevanje nehomolognih koncev (NHEJ; non-homologous end-joining) (Van der Kogel in Joiner, 2009).

Do obnovitve populacije celic pride zaradi delitve celic, ki so preživele med frakcioniranim obsevanjem. To pa povečuje njihovo število v obsevanem volumnu tkiva ter zmanjša učinkovitost zdravljenja (Novaković in sod., 2009; Van der Kogel in Joiner, 2009).

Zaradi uničenja dela tumorskih celic prihaja med obsevanjem do reoksigenacije hipoksičnih delov tumorja, kar jih naredi v času naslednje frakcije obsevanja bolj radiosenzibilne. Hitra reoksigenacija je povzročena zaradi ponovnega kroženja krvi po žilah ali pa zaradi znižanja celičnega dihanja, kar poveča difuzijsko razdaljo kisika. Do kasnejše reoksigenacije pa najverjetneje pride zaradi krčenja tumorja in zmanjšane razdalje med kapilarami (Novaković in sod., 2009; Joiner in van der Kogel, 2009). Prerazporeditev deležih se celic znotraj posameznih faz celičnega cikla med posameznimi frakcijami obsevanja pripomore k povečani citotoksičnosti zaradi kopičenja celic v bolj radiosenzibilnih fazah celičnega cikla. Celice so najbolj odporne proti obsevanju v fazi S ter najbolj občutljive nanj v poznih fazah G2 in M. Razlog za odpornost celic v fazi S je najverjetneje homologna rekombinacija, ki je pospešena zaradi dostopnosti nepoškodovanih sestrskih kromatid. V tej fazi je dostopnost popravljivih kompleksov zaradi konformacijskih sprememb DNA največja (Novaković in sod., 2009; Joiner in van der Kogel, 2009).

Različne sesalske celice se razlikujejo v svoji radioobčutljivosti. Tumorske celice pa so v primerjavi z normalnimi celicami nekoliko bolj občutljive za obsevanje. Na radioobčutljivost vpliva nedelovanje kontrolnih točk celičnega cikla (Novaković in sod., 2009; Joiner in van der Kogel, 2009).

Zdravljenje z ionizirajočim sevanjem spremljajo tudi neželeni učinki, ki jih delimo na akutne (nastanejo med samim obsevanjem) in na kronične (razvijejo se več mesecev ali let po koncu obsevanja). Akutni neželeni učinki se razvijejo v hitro obnavljajočih se tkivih (koža, sluznice, krvotvorni sistem), kjer ionizirajoče sevanje uniči del zarodnih celic v bazalnem sloju epitelijskega tkiva, kar zmanjša dotok celic v sloj prekurzorskih celic nad njim posledično pa je zmanjšano število celic v površinskem sloju funkcionalno zrelih celic. Kronični neželeni učinki nastanejo v tkivih brez jasno razpoznavnih celičnih razdelkov (pljuča, ledvice, centralni živčni sistem, jetra, srce). Manifestacija poškodbe je rezultat učinkovanja ionizirajočega sevanja na žilno, vezivno in parenhimsko komponento tkiva v obsevanem organu. K razvoju poškodbe pripomorejo tudi s citokini in rastnimi dejavniki posredovane interakcije med različnimi populacijami celic (Novaković in sod., 2009).

Z obsevanjem naj bi se zdravilo 50 % ali več bolnikov z rakavim obolenjem. Pri 40 % bolnikov, ki po koncu zdravljenja preživijo pet let ali več, je radioterapija eden izmed temeljnih načinov zdravljenja (Novaković in sod., 2009).

Zaradi lokalno-regionalne narave PCKGV je glavni način zdravljenja te bolezni operativni poseg, radioterapija ali kombinacija obojega. Pri pacientih z zgodnjo fazo PCKGV se uporablja eno modalni pristop, medtem ko se paciente z napredovano boleznijo zdravi s kombinacijo različnih terapij (Lassen, 2010). Z novimi raziskavami pa se razvijajo tudi nove metode zdravljenja PCKGV. Razvoj novih naprednih tehnik in optimizacija radioterapije - radioterapija z modulirano intenzivnostjo, funkcionalno slikanje in napredna brahiterapija, modifikacija tumorske hipoksije in spremenjena frakcionacija - so omogočile napredek v zdravljenju, a je celokupna doza pri kemo-radiaciji vedno omejena s toksičnostjo normalnega tkiva (Vozenin in sod., 2010; Lassen, 2010).

Spremembe frakcionacije pri radioterapiji so pripeljale do dveh glavnih modifikacij – hiperfrakcionacije in pospešene frakcionacije, ki sta definirani z razmerjem čas-doza (Bernier in Bentzen, 2003). Namen obeh je dostava visoko biološko učinkovitih doz do tumorja. Pri hiperfrakcionaciji je do celic v enakem času dostavljena višja skupna doza, brez povečanja toksičnosti je tako izboljšano celokupno preživetje (Rosenthal in Ang, 2004). Obsevanje inducira pospešeno repopulacijo klonogenih tumorskih matičnih celic, kar povzroča odpornost proti standardnemu zdravljenju PCKGV s frakcionirano radioterapijo. Pospešitev radioterapije pomeni skrajšanje intervalov med frakcijami in posledično manj časa za repopulacijo tumorskih matičnih celic. Takšno skrajšanje skupnega časa radioterapije izboljšuje odziv in povečuje tumorsko kontrolo. Brez kombinacije s kemoterapijo daje pospešena frakcionirana radioterapija boljši rezultat, tako pri p16 pozitivnih kot p16 negativnih tumorjih v primerjavi s standardno frakcionirano radioterapijo (Lassen, 2010). Skupna doza sevanja, razmerje med dozo in frakcijo ter trajanje zdravljenja vplivajo na lokalno kontrolo tumorja in na nadaljnje zaplete zaradi zapoznele toksičnosti. Največji doprinos novih tehnik radioterapije sta izboljšana kontrola na prvotnem mestu tumorja in povečana lokalna kontrola (Rosenthal in Ang, 2004).

3.3.1 Vloga HPV pri odzivu na radioterapijo

HPV na radiosenzitivnost najverjetneje vpliva preko regulacije p53 in nadaljnje kontrole celičnega cikla. Onkoproteina E6 in E7 povzročata genomsko nestabilnost, kar bi bilo lahko povezano s povečano radiosenzitivnostjo HPV-pozitivnih tumorjev. Kljub številnim raziskavam pa vpletenost E6 in E7 pri povečani občutljivosti za radioterapijo ostaja nejasna. E6 in E7 sta se pokazala tudi kot temelj kontrole receptorjev s hipoksijo inducirajočega faktorja 1 (HIF-1; hypoxia inducible factor-1) in vaskularnega endotelijskega rastnega faktorja (VEGF; vascular endothelial growth factor), zaradi česar imata morebitno vlogo pri modulaciji preskrbe tumorjev s krvjo. Inhibicija teh dveh onkoproteinov tako lahko vodi do številnih učinkov, ki vsi povečujejo tumorsko radioobčutljivost. Razlog za izboljššan odziv še ni povsem znan, se ga pa pripisuje številnim dejavnikom, tudi tumorskemu mikrookolju (Vozenin in sod., 2010).

Odgovor celic na ionizirajoče sevanje je močno odvisen od kisika, hipoksija tumorskih celic pa je potencialni vzrok za radiorezistenco. Hipoksična odpornost na ionizirajoče sevanje se razlikuje med PCKGV tumorji in je odvisna od HPV statusa. Manj izrazita odpornost je opazna pri HPV pozitivnih tumorjih, najbrž kot posledica pomanjkanja hipoksije. Število hipoksičnih matičnih celic v HPV pozitivnih tumorjih je omejeno ali pa so manj tolerantne na hipoksijo, kar zmanjšuje možnost ponovitve po obsevanju (Lassen, 2010).

Obsevanje lahko poveča imunski nadzor nad virusnimi antigeni, povečano število CD3 (cluster of differentiation 3) pozitivnih limfocitov, ki se infiltrirajo v tumor, pa je povezano z zmanjšanim pojavljanjem metastaz v bezgavkah in izboljšanim preživetjem pri HPV pozitivnih tumorjih. Radioterapija poveča učinkovitost različnih oblik imunskih terapij (dendritsko celično cepivo s tumorskimi antigeni, na citokine vezana virusna genska terapija in adoptivni prenos citotoksičnih celic T) (Vu in sod., 2010).

3.4 KEMOTERAPIJA

Izraz kemoterapija je prvi uporabil nemški raziskovalec Paul Ehrlich leta 1906 in z njim označil uporabo kemičnih substanc za zdravljenje okužb.

Uvedba kemoterapije - zdravljenje rakavih obolenj z ustreznimi kemijskimi substancami - je v 50. in 60. letih 20. stoletja pripeljala do razvoja kurativnih in paliativnih oblik zdravljenja za večino čvrstih tumorjev in malignih krvnih obolenj (Wagener, 2009). Glavni namen zdravljenja s kemoterapevtiki je omejiti delitev, invazijo in metastaziranje rakavih celic. Ker pa je delitev značilnost tako normalnih kot rakavih celic, ima večina netarčnih kemoterapevtikov toksičen učinek tudi na normalne celice, predvsem na tiste, ki se delijo hitro (kostni mozeg, celice mukoznih membran). Tako je glavni cilj pri izbiri ustreznega kemoterapevtika poiskati tistega, ki inhibira delitev rakavih celic, pri tem pa ima čim manjši vpliv na okoliško tkivo (Skeel in Khleif, 2011). Tarčna terapija deluje na ključno

mesto v celici – na DNA in omogoča koncentriranje delovanja kemoterapevtika na tumorsko tkivo brez širjenja na normalne celice (Wagener, 2009).

Sistemsko zdravljenje (uporaba učinkovin z namenom delovanja na vse rakave celice v telesu) s kemoterapevtiki se uporablja v različnih oblikah:

-primarno indukcijsko zdravljenje za razširjeno bolezen: pri napredovani metastaski bolezni je glavni cilj zdravljenja blaženje simptomov rakavih obolenj, izboljšanje kakovosti življenja ter podaljšanje časa do napredovanja tumorja in preživetja. Le pri redkih napredovanih rakavih obolenjih pa je pričakovati popolno ozdravitev,

-neoadjuvantno zdravljenje: pri omejenem rakavem obolenju, kjer operativni poseg in obsevanje sama nista dovolj. Pri nekaterih vrstah rakavih obolenj pa se ga uporabi kot prvo zdravljenje, saj tam omogoča zmanjšanje tumorja in s tem boljšo resektabilnost ali celo ohranitveno zdravljenje,

-adjuvantno zdravljenje: sledi lokalnim načinom zdravljenja (kirurgiji ali obsevanju). Glavni namen te oblike zdravljenja je zmanjšanje verjetnosti lokalne ali sistemske ponovitve. Če je rakavo obolenje hkrati zdravljeno z dvema načinoma zdravljenja, pa govorimo o konkomitantnem zdravljenju (Novaković in sod., 2009).

Na učinkovitost kemoterapevtikov močno vpliva obdobje tumorske rasti, v katerem se nahajajo celice. Najboljši učinek kemoterapevtikov je dosežen v logaritemski fazi rasti tumorja – v fazi hitre rasti, ko se število celic večkrat podvoji. V naslednji fazi, fazi platoja, tumor doseže makroskopsko velikost, zmanjša se delež delečih celic, s tem pa se zmanjša učinkovitost številnih kemoterapevtikov. Tumorska celica kot enota je za delovanje kemoterapevtikov občutljiva v vseh fazah celičnega ciklusa. Fazno nespecifični kemoterapevtiki delujejo na celice, ki so vstopile v celični ciklus, ne pa na mirujoče celice. V to skupino sodi večina alkilirajočih agensov (klorambucil, ciklofosamid, melfalan, busulfan, dakarbazin, cisplatin in karboplatin). To je obsežna skupina kemijskih substanc, ki so sposobne tvorjenja molekulskih vezi z nukleinskimi kislinami, proteini in številnimi molekulami z majhno molekulsko maso (Wagener, 2009, in Novaković in sod., 2009).

Fazno nespecifično delujejo tudi protitumorski antibiotiki (daunorubicin, deksorubicin, idarubicin, daktinomycin). S svojim delovanjem povzročajo cepitev DNA ali pa upočasnijo ali povsem ustavijo sintezo DNA. Druga vrsta kemoterapevtikov pa so fazno specifični kemoterapevtiki, ki najbolj učinkujejo v določeni fazi celičnega cikla in uničijo le omejeno število celic, ki so v času delovanja v občutljivi fazi cikla. Število uničenih rakavih celic se ne izboljša s povečanim odmerkom, temveč s podaljšanjem izpostavljenosti kemoterapevtiku ali z njegovo ponovno uporabo. Antimetaboliti (metotreksat, pemetreksed, azacitidin, fluorouracil, klaribidin) v prvi vrsti delujejo na sintezo DNA, in so najbolj učinkoviti v aktivno delečih se celicah, so večinoma fazno specifični kemoterapevtiki. Glavna lastnost antimetabolitov je majhna molekulska teža, ki

deluje zaviralno na tumorsko rast zaradi strukturne in funkcionalne podobnosti z metaboliti, ki so vključeni v sintezo DNA. Kemoterapevtiki, ki niso specifični za celični ciklus, pa delujejo tako na celice v celičnem ciklu kot na mirujoče celice (Novaković in sod., 2009).

Ob uporabi kombinacije kemoterapevtikov je pogosto dosežen boljši protitumorski učinek kot ob zaporednem induciranju istih zdravil saj je verjetnost pojava rezistence proti obem kemoterapevtikom hkrati zelo majhna. Pri uporabi kemoterapevtikov z neodvisnimi mehanizmi delovanja je zmanjšana možnost pojava rezistentnih klonov in verjetnost ozdravitve se poveča. Izboljšan rezultat zdravljenja se pojavi tudi ob kombiniranju kemoterapevtikov, specifičnih za celični cikel, s tistimi, ki zanj niso specifični. Kombiniranje dveh učinkovin lahko tudi biokemično potencira delovanje ene učinkovine zaradi delovanja na različne biokemične poti ali različne stopnje v isti poti. Tudi z namenom doseganja težje dostopnih tkiv (centralni živčni sistem) ter za blaženje stranskih učinkov se uporablja kombinacija kemoterapevtikov (Novaković in sod., 2009).

Tumorske celice so lahko proti določenemu kemoterapevtiku naravno odporne, kar pomeni njihovo neodzivnost na učinkovino že ob prvi izpostavitvi, ali pa odpornost pridobijo sčasoma. Glavni vzroki za odpornost so: celična kinetika (delež celic, ki vstopajo v delitev; časovni razpored kemoterapevtskih aplikacij; fazna specifičnost kemoterapevtika), biokemijski vzroki (nesposobnost tumorskih celic za pretvorbo kemoterapevtika v aktivno obliko; zmožnost inaktivacije kemoterapevtika; prisotnost snovi, ki preprečijo letalno delovanje kemoterapevtika) ter farmakološki vzroki (slaba prekrvavitev tumorja; nezadostna absorpcija zdravil ter njihovo povečano izločanje; interakcija kemoterapevtikov) (Novaković in sod., 2009).

Ne samo kombiniranje različnih kemoterapevtikov, uporablja se tudi kombinacija različnih oblik zdravljenja. Terapevtski učinek kemoradioterapije je dosežen zaradi sodelovanja dveh modalitet, saj je radioterapija učinkovita proti loko-regionalni bolezni, kemoterapija pa deluje sistemsko. Učinek je povečan tudi zaradi dveh neodvisnih načinov ubijanja celic in zaradi ojačanja delovanja radiacije s pomočjo kemoterapije (Bernier in Bentzen, 2002). Predhodno tretiranje s cisplatinom vpliva na popravilo z ionizirajočim sevanjem povzročenih dvojnih prelomov verig DNA. Nizke koncentracije cisplatina stimulirajo njihovo popravilo, medtem ko ga visoke doze inhibirajo (Boeckman in sod., 2005).

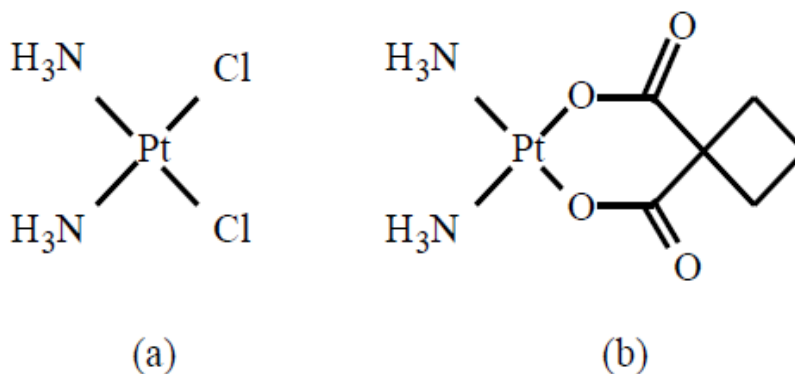
Sočasna kemoradioterapija je standardna oblika zdravljenja za bolnike z napredovano obliko rakavega obolenja grla, pri čemer se želi ohraniti funkcija organa. Izboljšana je lokalna kontrola, glavni problem tega pristopa pa predstavlja toksičnost (mukozitoze, supresija kostnega mozga, fibroza) in pojav oddaljenih metastaz (Goon in sod., 2009). Prednosti te oblike terapije so izboljšani privzem kemoterapevtika zaradi radiacije, boljša lokalna kontrola zaradi delovanja nekaterih kemoterapevtikov, ki povečajo občutljivost na obsevanje ter ohranitev celokupnega trajanja terapije brez podaljševanja (Bernier in Bentzen, 2002).

Sistemska kemoterapija znižuje verjetnost metastaziranja. Zaradi tega dejstva se kot oblika zdravljenja naprednega PCKGV uporablja indukcijsko/neoadjuvantno kemoterapijo, ki ji sledi kemoradioterapija. Pri predhodni kemoterapiji se pojavi zmanjšanje volumna makroskopskih tumorjev in njihova reoksigenacija, kar pripomore k boljšemu odzivu na radioterapijo. Ob dolgem intervalu med začetkom kemoterapije in končnim obsevanjem se lahko pojavi pospešena repopulacija, kar pojasni zmanjšanje lokalno-regionalne kontrole (Bernier in Bentzen, 2002 in Goon in sod., 2009).

Dostava zdravil je izboljšana pri adjuvantni kemoterapiji, saj je velikost tumorja predhodno zmanjšana z radioterapijo. Tudi tu je lokalno-regionalna kontrola zmanjšana, saj lahko med radioterapijo selekcioniramo kemo rezistentne klone in pojavi se toleranca na kemoterapijo (Bernier in Bentzen, 2002).

3.5.1 Cisplatin

Cisplatin [cis-diamminedichloro platinum(II)] ali cis-DDP in njegov analog karboplatin [cis-diammine-1,1-cyclobutanedicarboxylate platinum(II)] (sl. 4) sta med najpogosteje uporabljenimi protitumorskimi zdravili (Alderden in sod., 2006).



Slika 4: Strukturni prikaz cisplatina (a) in karboplatina (b) (Cepeda, 2007: 4)

Za inhibicijo celičnega cikla je ključna le cis oblika platina (IV) kompleksa [PtCl₄(NH₃)₂] (cis-[PtCl₄(NH₃)₂]; cisplatin), medtem ko se je trans oblika kompleksa, ki prav tako nastaja v procesu sinteze cisplatina, pokazala za neučinkovito (trans-[PtCl₄(NH₃)₂]; transplatin) (Alderden in sod., 2006)

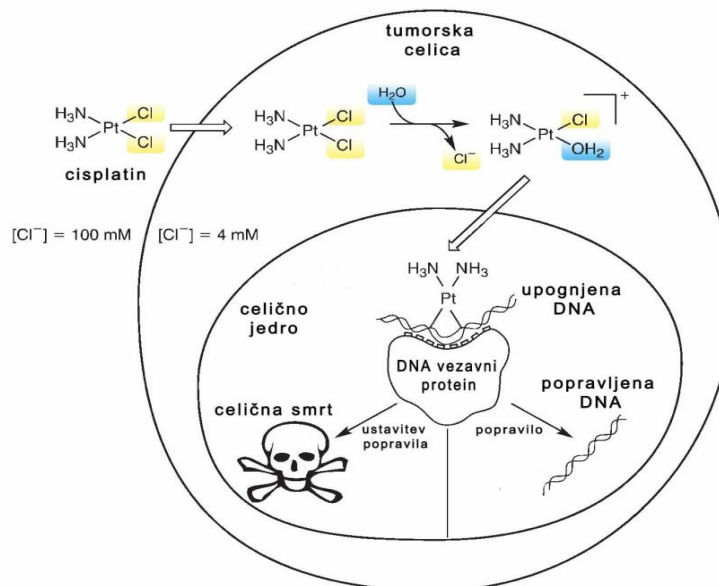
Cisplatin je zelo učinkovit pri zdravljenju rakavega obolenja mod in jajčnikov, pogosto pa se uporablja tudi pri kemoterapiji rakavega obolenja mehurja, materničnega vratu, glave in

vratu, požiralnika in pri drobnoceličnem pljučnem raku. Kljub svoji uspešnosti pa ima cisplatin številne stranske učinke: nefrotoksičnost, nevrotoksičnost, ototoksičnost, slabost in bruhanje, ki so omejujoč dejavnik za določitev doze (Alderden in sod., 2006).

Biokemijski mehanizmi citotoksičnosti cisplatina vključujejo vezavo na DNA in druge tarče, kar kasneje vodi do celične smrti z apoptozo in/ali nekrozo znotraj heterogene populacije celic, ki tvorijo tumorsko maso. Učinkovitost zdravljenja s cisplatinom omejuje prirojena ali pridobljena neobčutljivost tumorskih celic za cisplatin. Številni tumorji so intrinzično rezistentni proti cisplatinu (na primer rakavo obolenje debelega črevesja in nedrobnocelični rak pljuč), medtem ko ostali zaradi izpostavitve razvijejo rezistenco skozi čas (rakavo obolenje jajčnikov in drobnocelični rak pljuč). Rezistenca proti cisplatinu je posledica večjih dejavnikov: zmanjšana akumulacija zdravila, inaktivacija s tiolnimi skupinami, povečana sposobnost popravila Pt-DNA aduktov, povečana toleranca na cis-DDP adukte ter nepravilnosti v poteh celične smrti. Mehanizmi rezistence so odvisni od vrste tumorja (Cepeda, 2007; Alderden in sod., 2006).

3.5.1.1 Delovanje

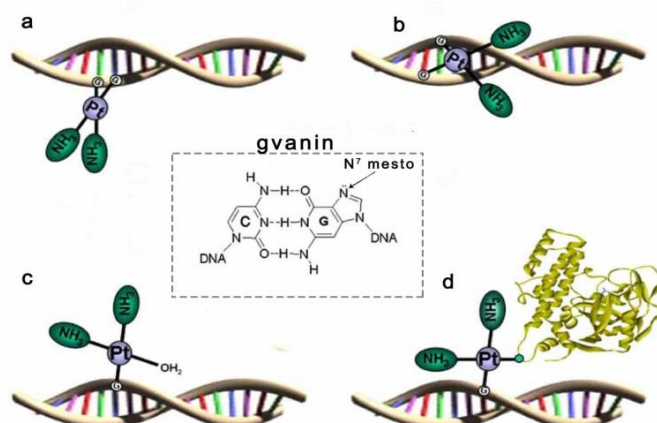
Vezava cisplatina na DNA v celičnem jedru je glavni dogodek, odgovoren za protitumorske lastnosti. Poškodbe, inducirane z vezavo cisplatina na DNA, lahko inhibirajo prepisovanje in/ali podvojevalne mehanizme, nato pa te spremembe v procesiranju DNA sprožijo celične dogodke, ki vodijo v celično smrt.



Slika 5: Shematski prikaz citotoksične poti cisplatina po reakciji z molekulo vode (prirejeno po Alderden, 2006: 730)

Cisplatin se po vstopu v krvni obtok trdno veže na plazemske proteine, kar je rezultat velike reaktivnosti platine z žveplom na tiolnih skupinah aminokislin (cistein). Zaradi tega je 90 % cisplatina v krvi vezanega na albumin in ostale plazemske proteine, kar vodi v inaktivacijo velikega števila molekul cisplatina. Pred vezavo je potrebna odstranitev vsaj ene kloridne skupine, ki je nadomeščena z molekulo vode (sl. 5). Zamenjava molekul je omejena z relativno visoko koncentracijo (približno 100 mM) klorida v krvni plazmi. Formirata se $[\text{Pt}(\text{H}_2\text{O})\text{Cl}(\text{NH}_3)_2]^+$ in $[\text{Pt}(\text{H}_2\text{O})_2(\text{NH}_3)_2]^{2+}$ kationa. Takšna mono- ali diaquo-oblika cisplatina je zelo reaktivna proti nukleofilnim centrom biomolekul. Cisplatin, ki ostane nevezan, vstopi v tumorske celice predvsem z difuzijo skozi celično membrano, transportiran pa naj bi bil tudi s pomočjo Cu-transportnih proteinov. V celici je koncentracija klorida relativno nizka (približno 4 mM), zato je tam večja verjetnost zamenjave kloridne skupine z molekulo vode. Tako nastala pozitivno nabita molekula težje zapusti celico. Molekule cisplatina, ki imajo vezano eno molekulo vode, so odgovorne za 98 % vezave platine na DNA znotraj celičnega jedra (Cepeda, 2007).

V citoplazmi imajo številne molekule nukleofilna področja, ki reagirajo s cisplatinom. Takšne molekule so RNA, citoskeletni mikrofilamenti, peptidi in proteini, ki vsebujejo tiol. Najpomembnejše ne-DNA tarče cisplatina so tripeptid glutation (GSH) in metalotioneini (MT). Ob vezavi nanje se poveča rezistenca proti cis-DDP. Cis-DDP pa lahko spremeni tudi aktivnost encimov, receptorjev in drugih proteinov preko koordinacije žveplovih atomov cisteinskih in/ali metioninskih ostankov ter dušikovih atomov histidinskih ostankov.



Slika 6: Glavni adukti, ki nastanejo po vezavi cis-DDP na DNA: 1,2-znotrajverižni adukt DNA (a), medverižna povezava (b), monofunkcijski adukt (c) in protein- DNA povezava (d). Glavno mesto vezave cis-DDP je N7 mesto gvanina (prirejeno po Cepeda, 2007: 6)

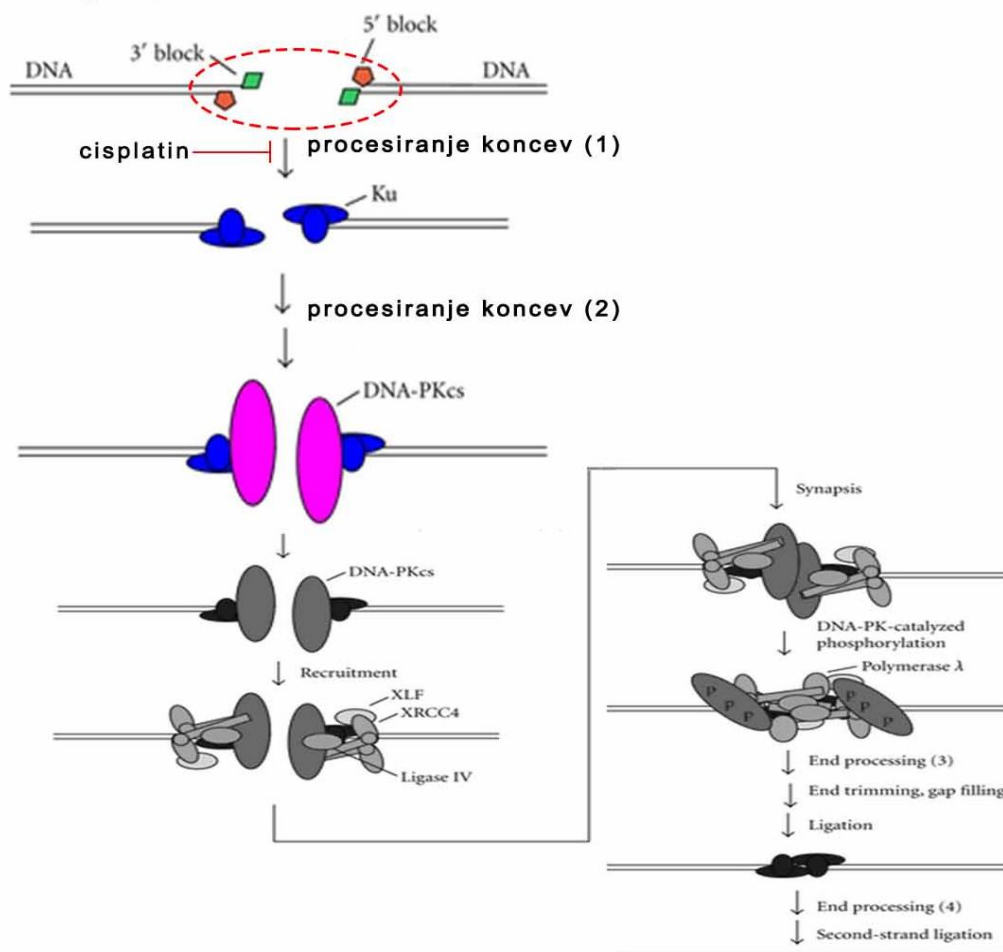
N7 atomi gvanina in adenina, ki se nahajajo v velikem žlebu dvojne vijačnice, so najbolj reaktivna nukleofilna in dostopna mesta za delovanje platine na DNA. Cisplatin lahko tvori na DNA številne strukturno različne adukte. Kinetika vezave cis-DDP na DNA se začne s tvorbo monofunkcionalnih aduktov cis-[Pt(NH₃)₂(H₂O)]:DNA, večina cis- Pt(III) centrov pa reagira še naprej in tvori bifunkcionalni adukt cis-[Pt(NH₃)₂]:DNA, ki tvori navzkrižne povezave med verigama vijačnice. Takšna povezava pa preprečuje replikacijo in/ali preprečuje transkripcijo. 1,2-medverižni adukt DNA, ki ukrivi dvojno vijačnico proti velikemu žlebu naj bi bil glavni vzrok za citotoksičnost cisplatina, pripomorejo pa še navzkrižne povezave med verigami DNA in povezave med DNA in proteini (sl. 6).

Cisplatin- DNA adukte popravljajo številni proteini. Najpomembnejši so proteini za popravilo z izrezovanjem nukleotidov (NERp; nucleotide excision repair proteins), proteini za popravilo neujemanja baznih parov (MMRp; mismatch repair proteins) in katalitska enota od DNA odvisne proteinske kinaze (DNA-PKcs; DNA- dependent protein kinase, catalytic subunit) (Cepeda, 2007; Alderden in sod., 2006).

3.5.1.2 Radiosenzitivizacija

V zgodnjih 80. letih je bil cisplatin spoznan kot zdravilo, ki lahko ojača poškodbe, ki jih na celicah v tumorju povzroči ionizirajoče sevanje. Najverjetnejši mehanizmi pri tem so radiosenzitivizacija hipoksičnih celic, inhibicija popravila subletalnih ali potencialno letalnih poškodb, povečana indukcija kromosomskih nepravilnosti in vezava na tiole (Schaake-König in sod., 1992).

dvojni prelom DNA



Slika 7: Popravilo dvojnega preloma verig DNA (prirejeno po Povirk, 2012: 5)

Številne študije kažejo, da se inhibicija popravila DNA odraža v radiosenzitizaciji. Pri zdravljenju s kombinacijo cisplatina in ionizirajočega sevanja lahko opazimo dodatne učinke, ki kažejo na radiosenzitivno sposobnost cisplatina. Na to naj bi vplivale popravilne poti DNA, ki popravljajo poškodbe, povzročene s cisplatinom ali radiacijo. Celice uporabijo različne popravilne poti DNA za različne načine nastanka poškodbe. Pot popravila s homologno rekombinacijo je pomembna pri procesiranju poškodbe, povzročene s cisplatinom. Popravilo z NHEJ je aktivno pri radiacijski poškodbi in neaktivno ob delovanju cisplatina (Raaphorst in sod., 2005). Jasno sinergistično delovanje med cisplatinom in ionizirajočim sevanjem se je pokazalo pri celicah, sposobnih popravila dvojnih prelomov verig (DSB; double strand break) z NHEJ. Za popravilo dvojnih prelomov verig z NHEJ je potrebna skupina proteinskih kompleksov. Na konec DNA se veže heterodimer Ku, ki olajša vezavo katalitične podenote od DNA odvisne proteinske

kinaze (DNA- PK_{cs}) Pri celicah, v katerih zaradi dodatka cisplatina nastanejo mestno specifični adukti cisplatin-DNA blizu terminalnega dela DNA, je popolnoma onemogočeno popravilo DSB z NHEJ, saj je inhibirana translokacija heterodimera Ku na DNA (sl. 7) (Boeckman in sod., 2005).

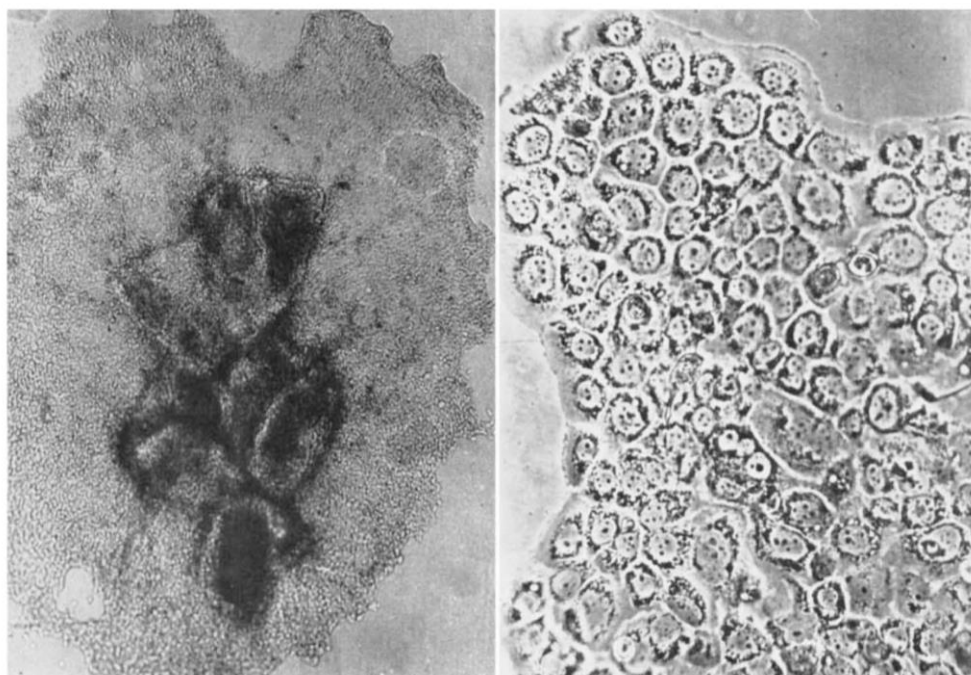
4 MATERIALI IN METODE

4.1 CELIČNI LINIJI

Pri praktičnem delu smo uporabili celični kulturi ploščatoceličnega karcinoma ustnega žrela FaDu in FaDu2A3.

4.1.1 Celična linija FaDu

FaDu je humana epitelna celična linija ploščatoceličnega karcinoma ustnega žrela II stopnje (lokalno napredovan), ki so jo leta 1968 izolirali pri 56-letnemu moškemu v Chittarangan Cancer Hospital, Kalkuta. Morfološko celice v kulturi ohranjajo epiteljske lastnosti (sl. 8) (Rangan, 1972). Celično linijo je Oddelek za eksperimentalno biologijo Onkološkega inštituta v Ljubljani dobil iz zbirke ATCC (American Type Culture Collection; Manassas, VA, ZDA).

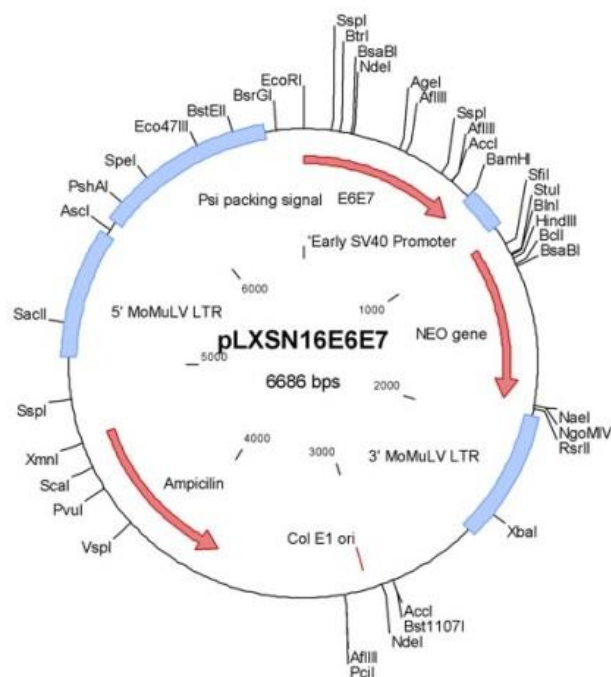


Slika 8: Eksplant prve pasaže celične linije FaDu po osmih dneh, vidne so epitelne celice, ki se razraščajo radialno (slika levo). Del enosloja po tridesetih dneh rasti, opazna je granuliranost citoplazme (slika desno) (Rangan, 1972: 18)

4.1.2 Celična linija FaDu 2A3

Celična linija FaDu2A3 je stabilno transformirana s HPV16+ vektorjem pLXSN16E6E7 (sl. 9), njena osnova pa je celična linija FaDu. Vektor pLXSN16E6E7 vsebuje gena E6 in E7 iz humanega virusa papiloma podtipa 16. Gena sta pod kontrolo promoter–ojačevalnih zaporedij Moloney murine leukemia virusa (MoMuLV). Vektor vsebuje tudi zapis za

rezistenco proti neomicinu (Harris in sod., 2011). Celično linijo FaDu2A3 je Oddelek za eksperimentalno onkologijo Onkološkega Inštituta v Ljubljani prejel v dar od prof. dr. Ekaterine Dadachove.



Slika 9: Shema vektorja pLXSN16E6E7 (http://labs.fhcrc.org/galloway/Maps_and_Figures.html)

Prisotnost vektorja pLXSN16E6E7 v celični liniji FaDu2A3 so na Inštitutu za mikrobiologijo in imunologijo medicinske fakultete Univerze v Ljubljani preverili z verižno reakcijo s polimerazo. Prisotnost gena E7 HPV16 so preverjali s pomnoževanjem 80-bp velikega dela mRNA E7 HPV16. Ker so dokazali prisotnost mRNA E7, so posredno dokazali tudi prisotnost vektorja pLXSN16E6E7 v celicah. V starševski celični liniji FaDU mRNA E7 ni bila prisotna.

4.1.3 Gojenje celičnih linij

Celični liniji FaDu in 2A3 smo gojili v 75 cm² (T-75) platenkah za gojenje celičnih kultur (TPP, Trasadingen, Švica). Celično linijo FaDu smo gojili v gojišču RPMI (GIBCO, Invitrogen, Paisley, VB) z dodatkom 10 % fetalnega govejega seruma (FBS, ang. fetal bovine serum) (GIBCO, Invitrogen, Paisley, VB). Celično linijo 2A3 pa smo gojili v gojišču DMEM (GIBCO, Invitrogen, Paisley, VB), prav tako z dodatkom 10 % fetalnega govejega seruma. V gojišče za celično linijo pa smo dodali še 1 mg/ml antibiotika geneticina (Neomycin, GIBCO, Invitrogen, Paisley, VB).

4.2. IZRAČUNAVANJE RASTNIH KRIVULJ CELIČNIH LINIJ FaDu IN FaDu2A3

Da smo preverili generacijski čas in rast celičnih linij, smo za obe celični liniji izračunali neodvisno rastno krivuljo. Za izračun podvojitvenega časa smo uporabili računalno Doubling Time (Roth V. 2006; <http://www.doubling-time.com/compute.php>), ki podvojitveni čas izračuna po enačbi za eksponentno regresijo.

a) Umeritvena krivulja

S pomočjo tripsina smo celice odlepili s plastenke, jih zbrali in prešteli na hemocitometru. Po 100 μ l celične suspenzije smo nasadili v posamezno vdolbinico mikrotiterske plošče s 96 vdolbinicami (TPP, Trasadingen, Švica, 96-well). Število celic na vdolbinico v posameznih stolpcih je bilo: 500, 1000, 3000, 6000, 10.000, 15.000, 25.000, 35.000, 50.000, 60.000, 70.000, 80.000 (pri čemer 1000 celic na vdolbinico ustreza koncentraciji 1×10^4 celic/ml). Vdolbinici 1A in 1B sta predstavljali slepo kontrolo gojišča brez celic, zato smo vanju vnesli le 100 μ l gojišča.

Nasajene celice smo inkubirali 2 uri pri 37 °C, 5 % CO₂ in 95 % vlažnosti, da so se prilepile na podlago. Po dveh urah smo v vsako vdolbinico dodali 10 % reagenta Presto Blue (PrestoBlue® Cell Viability Reagent, Invitrogen, VB) (10 μ l/vdolbinica) in inkubirali še 20 minut. Po preteku inkubacijskega časa smo pomerili fluorescenco s spektrofotometrom Tecan Infinite M200 s programom Magellan pri ekscitacijski valovni dolžini 560 nm in emisijski valovni dolžini 595 nm. Vrednost slepe kontrole smo odšteli dobljenim vrednostim intenzitete fluorescence in s tem viabilnost pri posameznem številu celic. PrestoBlue deluje kot indikator celične viabilnosti, saj v metabolno aktivnih celicah reducira resazurin v resofurin, pri čemer iz nefluorescentno modre postane rdeč in močno fluorescira.

b) Rastna krivulja in generacijski čas

Iz preštetege števila celic smo na mikrotitersko ploščo nasadili po 1000 celic na vdolbinico (1×10^4 celic/ml). V vsako vdolbinico smo vnesli po 100 μ l celične suspenzije s primerno gostoto. V prvi vrstici smo v vdolbinice vnesli samo 100 μ l gojišča, saj je le-ta predstavljala slepo kontrolo. Da so se celice prilepile na podlago, smo jih po nasaditvi inkubirali 2 uri pri 37 °C, 5 % CO₂ in 95 % vlažnosti. Po preteku dveh ur smo v prva dva stolpca, ki ustrežata dnevu 0, dodali 10 % reagenta PrestoBlue (10 μ l/vdolbinica). Ploščo smo inkubirali še 20 minut, nato pa pomerili fluorescenco s spektrofotometrom Tecan Infinite M200 s programom Magellan. Postopek dodajanja reagenta in merjenja fluorescence smo na 24 ur ponavljali naslednje štiri dni (do preteka 120 ur), med posameznimi meritvami pa smo ploščo hranili v inkubatorju, celicam pa v tem času nismo menjali gojišča ali jih presajali.

S pomočjo dobljenih rezultatov intenzitete fluorescence in ob primerjavi z umeritveno krivuljo smo lahko preračunali število celic v posameznem dnevu, izračunali podvojitveni oziroma generacijski čas ter izrisali rastno krivuljo za obe celični liniji.

4.3 OPTIMIZACIJA ŠTEVILA CELIC ZA IZVEDBO TESTA KLONOGENOSTI

Pod vplivom različnih dejavnikov lahko celice ohranijo reproduktivno sposobnost ter zmožnost tvorjenja kolonij normalnih velikosti. Celice, ki ne ohranijo te sposobnosti, odmrejo ali zrastejo v abortivne kolonije. S pomočjo testa klonogenosti smo ugotovili povprečno število izraslih kolonij (PE; plating efficiency), ter delež preživelih celic (SF; surviving fraction) za vsako od celičnih linij ob izbranih pogojih (Franken in sod., 2006). Citotoksičnost testiranih pogojev smo določili glede na delež preživelih celic, ki so bile zmožne tvoriti kolonije ob normalizaciji na kontrolno netretirano skupino. Za posamezne pogoje smo vsako skupino testirali v treh vzporednicah in treh ponovitvah.

Celice, nasajene v 75 ml plastenkah, smo s pomočjo tripsina odlepili in zbrali v 50 ml plastičnih epruvetah. Po centrifugiranju (5 minut pri 1500 obratih/minuto in 20°C) smo celice prešteli na hemocitometru. V plastičnih epruvetah smo pripravili 14 ml celične suspenzije v mediju, specifičnem za vsako izmed celičnih linij. V petrijevke smo celice nasajali z gostoto 200, 300 in 400 celic na petrijevko (kar ustreza 14,3; 21,4 in 28,6 celic/ml). Celice smo nato inkubirali pri 37 °C, 5 % CO₂ in 95 % vlažnosti, čas inkubacije smo določili iz rastne krivulje za vsako celično linijo posebej. Celično linijo FaDu smo tako inkubirali 9–12 dni, linijo 2A3 pa 13–16 dni.

Po inkubaciji smo celice fiksirali in pobarvali z barvilom kristal vijolično z metanolom (Invitrogen, VB) ter prešteli kolonije (pri čemer kot kolonija šteje skupek več kot 50 celic).

Za izračun deleža preživelih celic smo dobljeno vrednost prešteti kolonij delili s povprečnim številom izraslih kolonij kontrolne skupine (1).

$$\text{Delež preživelih celic} = \frac{\text{število kolonij}}{\text{število kolonij kontrolne skupine}} \dots (1)$$

4.4 RADIOTERAPIJA

Za ugotavljanje odziva posamezne celične linije na radioterapijo smo uporabili test klonogenosti.

V petrijevke smo nasadili različno število celic, določeno glede na dozo sevanja, kateri je bila petrijevka izpostavljena. Za kontrolno skupino ter dozi 2 in 3 Gy smo nasadili 300 celic/petrijevko, za doze 4, 5 in 6 Gy smo nasadili 400 celic/petrijevko, ter 800 celic/petrijevko za dozi 8 in 10 Gy. Nasajene celice smo 5 ur inkubirali pri 37 °C, 5 % CO₂ in 95 % vlažnosti, ter jih nato obsevali. Po obsevanju smo celice vrnili v inkubator za 9–12 oziroma 13–16 dni, v tem času celic nismo niti presajali niti jim nismo menjali gojišča.

Zrasle kolonije smo pobarvali, prešteli ter izračunali delež preživelih celic. Za vsako celično linijo smo določili D0 (interpolirana doza, pri kateri število preživelih klonov vpade za e^{-1}) in D10 (doza, pri kateri se preživetje celic zmanjša na 10 %).

Vrednost D10 smo izračunali po enačbi

$$D10 = 2,3 \times D0 \quad \dots(2)$$

Za obsevanje smo uporabili rentgenski aparat DARPAC 2000XE (Gulmay Medical Ltd, Shepperton, VB; filter 0.55 Cu, 1.80 Al, hitrost doze 2.16 Gy/min).

4.5 KEMOTERAPIJA

Citotoksičnost cisplatina (z založno koncentracijo 50 $\mu\text{g/ml}$) in odziv celičnih linij nanj smo ugotovili s testom klonogenosti. Pred nasaditvijo celic v petrijevke smo celični suspenziji dodali cisplatin v različnih koncentracijah (pregl. 1).

Preglednica 1: Število nasajenih celic pri posameznih koncentracijah cisplatina ($\mu\text{g/ml}$)

Koncentracija cisplatina ($\mu\text{g/ml}$)	Število celic/ petrijevko
Kontrola	200
0,05	300
0,1	400
0,2	500
0,3	600
0,4	600

Celični liniji smo inkubirali pri 37 °C, 5 % CO_2 in 95 % vlažnosti, 9–12 dni linijo FaDu in 13–16 dni linijo FaDu2A3. Iz prešteti kolonij smo za vsako celično linijo izračunali vrednost učinkovite koncentracije 50 (EC50; half maximal effective concentration), ki je koncentracija cisplatina, pri kateri se preživetje celic zmanjša na 50 %. Izračunali smo tudi koncentracijo, pri kateri je bil opazen citotoksičen učinek na 90 % celične populacije (EC90; effective concentration at 90 % population).

4.6 KOMBINACIJA RADIO- IN KEMOTERAPIJE

Tudi pri kombinaciji radio- in kemoterapije smo uporabili test klonogenosti za ugotavljanje njunega skupnega delovanja na celični liniji.

Uporabili smo dve različni koncentraciji cisplatina (založna koncentracija 50 µg/ml) – 0,05 µg/ml in 0,1 µg/ml ter pri vsaki celični liniji še obsevali z dozami 1, 2, 3, 4, 5 in 6 Gy. Za obsevanje z različnimi dozami smo nasadili različno število celic (pregl. 2).

Preglednica 2: Število nasajenih celic pri kombinaciji radio- in kemoterapije

IR Doza (Gy)	Koncentracija CDDP (µg/ml)	Število celic/petrijevko
Kontrola	0,05 ali 0,1	300
1		400
2		400
3		600
4		800
5		1000
6		1200

Pred nasaditvijo ustreznega števila celic v petrijevko smo v plastične epruvete dodali cisplatin. Celice smo nato 6 ur inkubirali pri 37 °C, 5 % CO₂ in 95 % vlažnosti in jih potem obsevali. Po obsevanju smo celice inkubirali še nadaljnjih 9–12 oziroma 13–16 dni. Po barvanju in štetju kolonij smo za vsako celično linijo izračunali delež preživelih celic.

Kot kontrolo smo uporabili celice, ki smo jih samo obsevali in jim nismo dodali cisplatina. Za različne doze obsevanja smo nasadili različno število celic (pregl. 3).

Preglednica 3: Število nasajenih celic, ki so bile samo obsevane in so služile kot kontrola pri kombinaciji radio in kemoterapije

IR Doza (Gy)	Število celic/petrijevko
Kontrola	300
1	300
2	300
3	400
4	600
5	800
6	1000

Za fotografiranje celičnih kolonij smo uporabili invertni mikroskop Olympus IX71 (Olympus, Hamburg, Nemčija), s kamero DP70 (Olympus) in program Cell sense (Olympus).

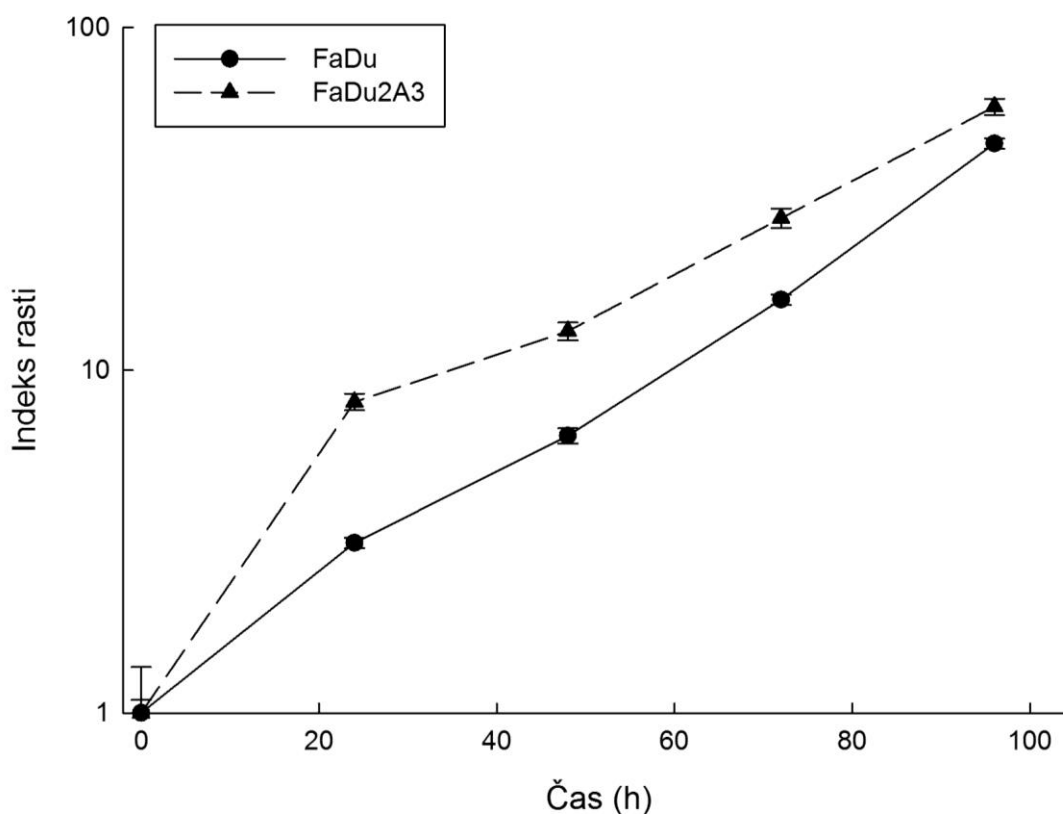
4.7 OBDELAVA PODATKOV IN STATISTIČNA ANALIZA REZULTATOV

Dobljene rezultate smo statistično obdelali s programom SigmaPlot (Systat Software, Inc., London, VB).

5. REZULTATI

5.1. DOLOČANJE RASTNIH KRIVULJ CELIČNIH LINIJ FaDu IN FaDu2A3

Rastne krivulje za vsako izmed celičnih linij smo naredili za določitev njenega podvojitvenega časa. Glede na dobljeno rastno krivuljo (sl. 10) smo izračunali podvojitveni čas celičnih linij FaDu in FaDu2A3, ki je bil za FaDu 17,5 ur in za FaDu2A3 22,5 ur.



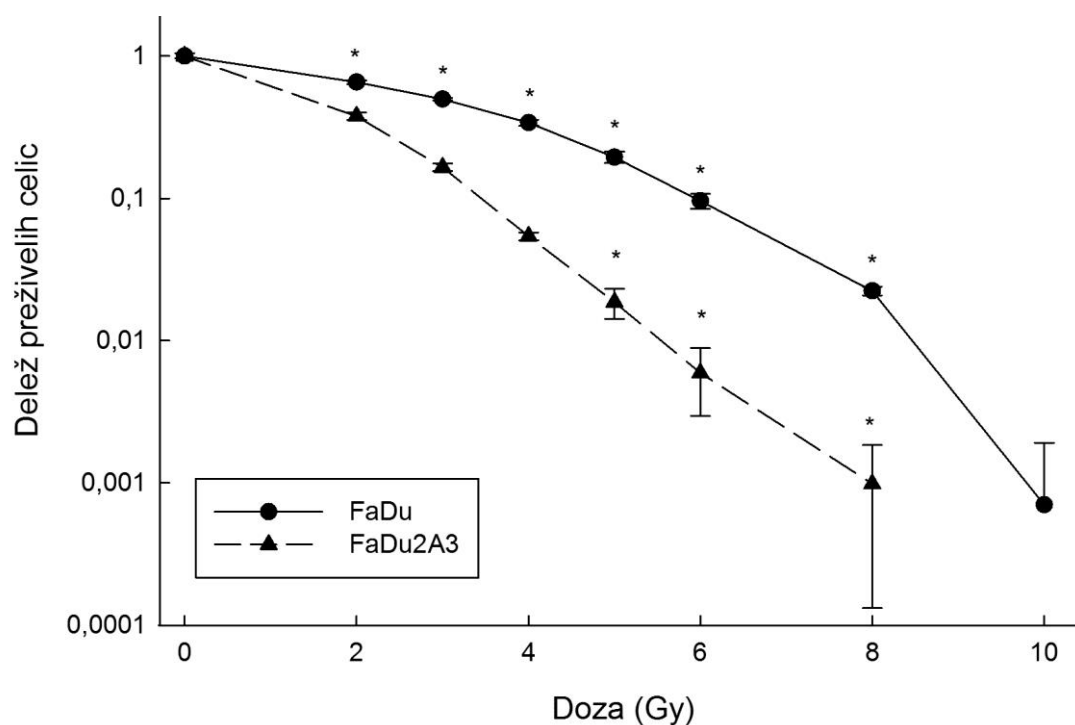
Slika 10: Rastni krivulji celičnih linij FaDu in FaDu2A3

Graf prikazuje rastni krivulji za celični liniji FaDu in FaDu2A3. Na osi X je prikazan čas inkubacije celic v urah, na osi Y pa je prikazan indeks rasti celic. Število celic, ki smo ga preračunali s pomočjo umeritvene krivulje glede na intenziteto fluorescence ob določenem času, smo normirali na začetno nasajeno število celic z indeksom rasti 1. Podvojitveni čas celične linije FaDu znaša 17,5 ur, celične linije FaDu2A3 pa 22,5 ur.

5.2 OBSEVANJE CELIČNIH LINIJ FaDu in FaDu2A3

Z obsevanjem celičnih linij FaDu in FaDu2A3 smo želeli preveriti in primerjati njuno občutljivost za obsevanje. Za vsako celično linijo smo naredili tri neodvisne ponovitve, katerih vrednosti smo nato povprečili in določili standardno napako. Glede na dobljene rezultate (sl. 11) smo kasneje določili vrednost obsevalnih doz za kombinacijo obsevanja in kemoterapije. Razlika v številu izraslih celičnih kolonij na petrijevi plošči pri različnih dozah (kontrola, 2 Gy in 8 Gy) je vidna na sliki 12. Vrednost D0 (interpolirana doza, pri kateri število preživelih celic upade za e^{-1}) smo odčitali iz grafa za vsak posamezen poskus. Za FaDu vrednost D0 znaša $4,2 \pm 0,6$ Gy, za celično linijo FaDu2A3 pa $2,1 \pm 0,3$ Gy

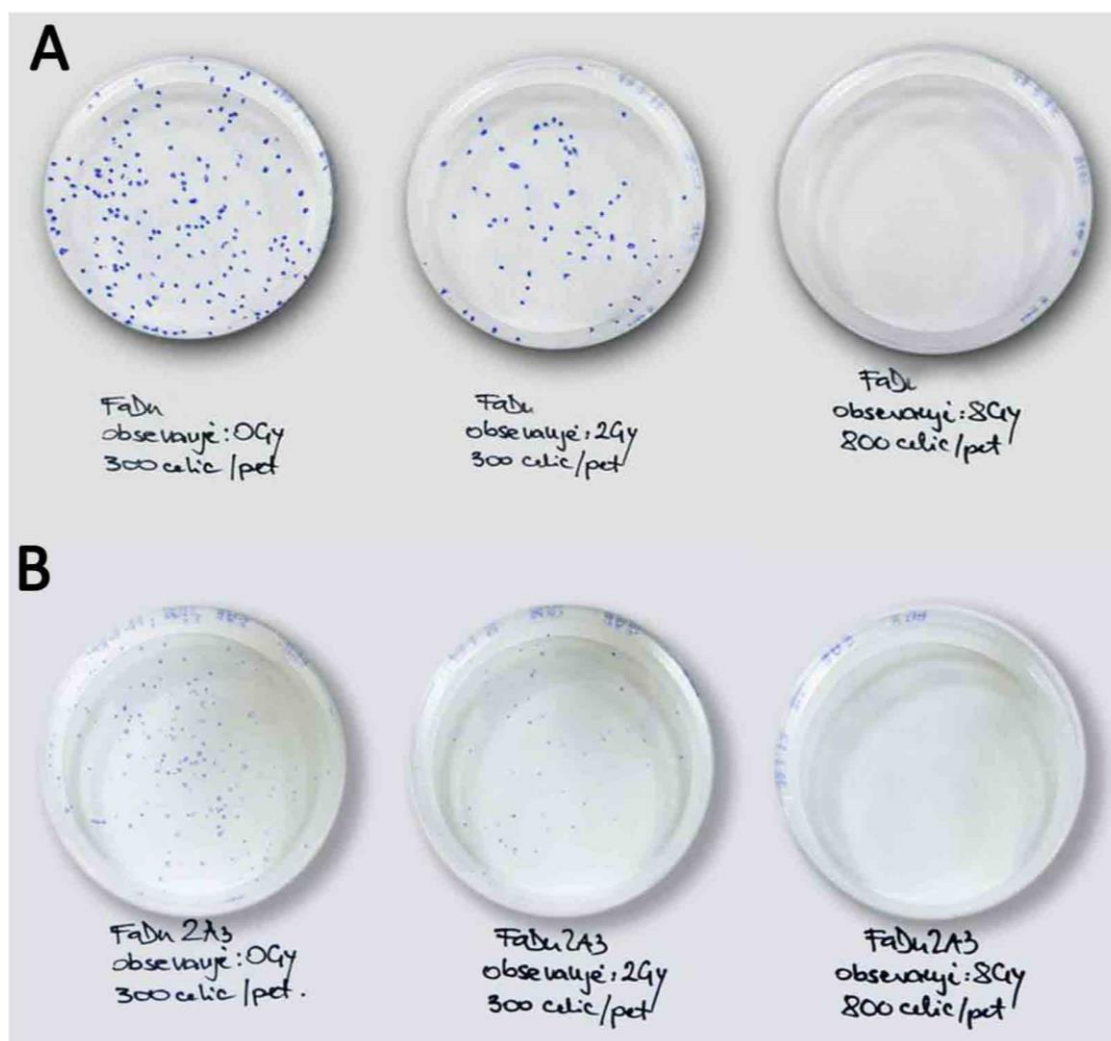
Po enačbi (2) izračunana vrednost D10 za celično linijo FaDu znaša $9,6 \pm 1,5$ in za celično linijo FaDu2A3 $4,9 \pm 0,6$. Glede na dobljene rezultate so se celice linije FaDu2A3 pokazale kot bolj občutljive za obsevanje kot celice linije FaDu.



Slika 11: Primerjava občutljivosti celičnih linij FaDu in FaDu2A3 za obsevanje

Krivulji na grafu kažeta odziv celičnih linij FaDu in FaDu2A3 na obsevanje, pri dozah 2 Gy, 4 Gy, 6 Gy, 8 Gy in 10 Gy. Večjo radiosenzitivnost kažejo celice linije FaDu2A3. Delež preživelih celic je normiran na kontrolo.

*: $P < 0,05$; statistično značilna razlika v primerjavi z vrednostjo deleža preživelih celic linije FaDu2A3 pri posamezni dozi.

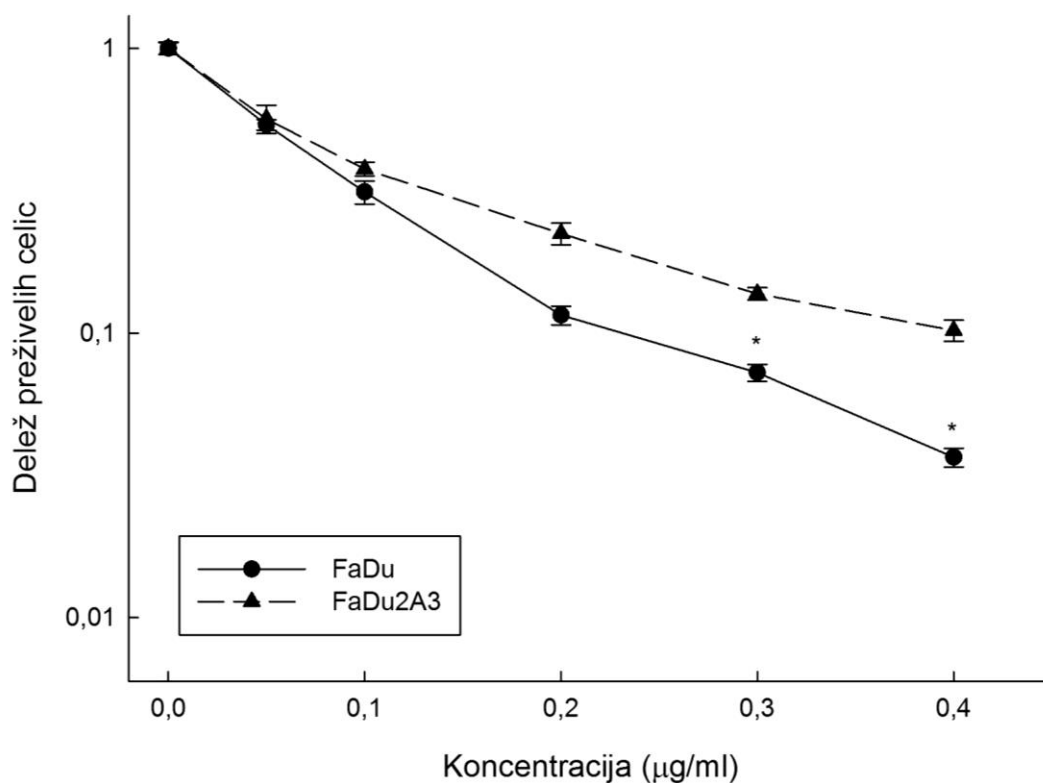


Slika 12: Primerjava zraslih kolonij celičnih linij FaDu(A) in FaDu2A3(B) pri različnih dozah obsevanja – kontrolna skupina, 2 Gy in 8 Gy

5.3 KEMOTERAPIJA CELIČNIH LINIJ FaDu in FaDu2A3

Celični liniji FaDu in FaDu2A3 naj bi bili različno občutljivi za cisplatin. Njuno občutljivost smo preverili tako, da smo ju trikrat neodvisno izpostavili petim različnim koncentracijam cisplatina. Iz dobljenih rezultatov smo nato izračunali povprečje in standardno napako preživetja celic pri posamezni koncentraciji cisplatina (sl. 13). Za vsako celično linijo smo nato grafično določili vrednost EC90 (koncentracija, pri kateri je imel cisplatin učinek na 90 % celične populacije) in EC50 (koncentracija, pri kateri je imel cisplatin učinek na 50 % celične populacije). Vrednost EC90 za linijo FaDu znaša $0,3 \pm 0,1$ $\mu\text{g/ml}$, za linijo FaDu2A3 pa je pri izbranih vrednostih koncentracij ni bilo mogoče določiti, ker se pri izbranih koncentracijah cisplatina preživetje celic ni zmanjšalo pod 10 %. Vrednosti EC50 pa sta blil za celično linijo FaDu $0,05 \pm 0,006$ in FaDu2A3 $0,07 \pm$

0,005. Ugotovili smo, da so celice FaDu bolj občutljive za cisplatin kot njihov subklon FaDu 2A3.



Slika 13: Odziv celičnih linij FaDu in FaDu2A3 na različne koncentracije cisplatina

Grafa celični linij FaDu in FaDu2A3 kažeta različno občutljivost za cisplatin. Izpostavili smo ju koncentracijam 0,05; 0,1; 0,2; 0,3 in 0,4 µg/ml. Kot bolj občutljive so se pokazale celice linije FaDu. Delež preživelih celic je normiran na kontrolo.*: $P < 0,05$; statistično značilna razlika v primerjavi z vrednostjo deleža preživelih celic celične linije FaDu2A3 pri posamezni koncentraciji.

5.4 OBČUTLJIVOST CELIČNIH LINIJ FaDu in FaDu2A3 ZA KOMBINACIJO RADIO- IN KEMOTERAPIJE

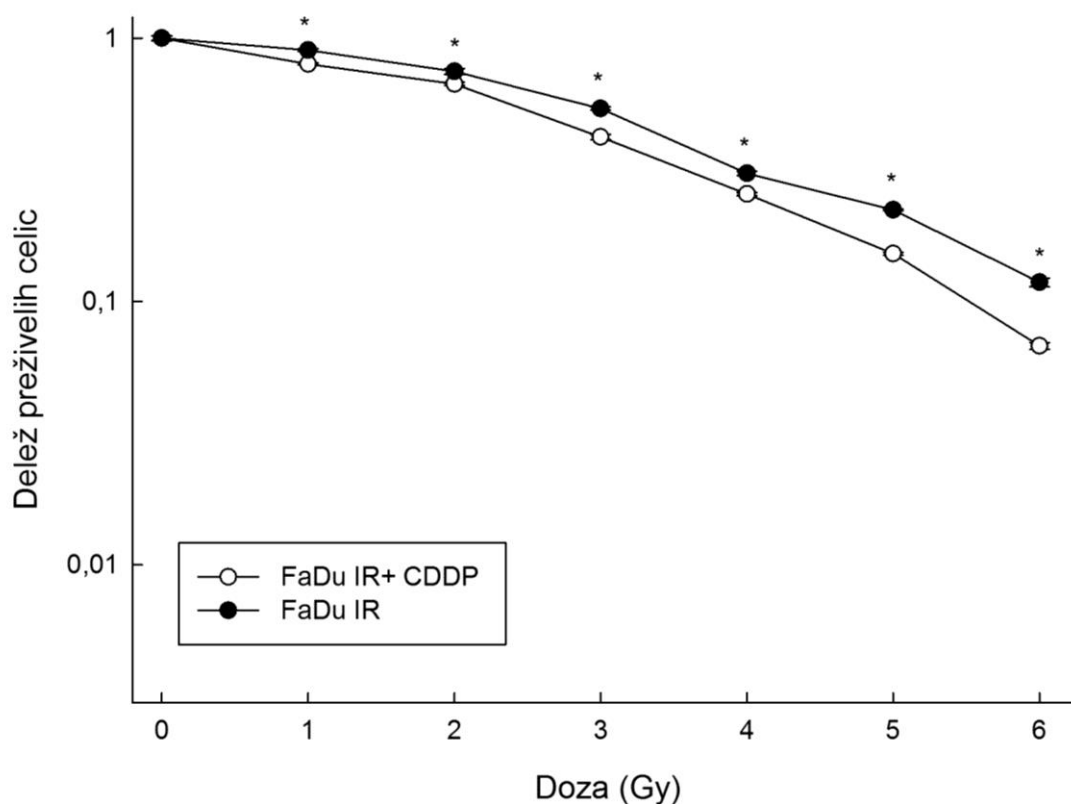
Na podlagi neodvisnih poskusov obsevanja in kemoterapije na celičnih linijah FaDu in FaDu2A3 smo določili doze in koncentracije za kombinirano terapijo. Izbrane doze za obsevanje so bile 1, 2, 3, 4, 5 in 6 Gy, saj je umrljivost celic pri višjih dozah prevelika, število zraslih kolonij pa bi bilo prenizko. Izbrali smo tudi dve različni koncentraciji cisplatina. Prva vrednost je bila določena kot koncentracija najbližja EC50 obeh linij, in sicer 0,05 µg/ml. Druga izbrana koncentracija pa je bila 0,1 µg/ml, saj je tu razlika med občutljivostjo celičnih linij za kemoterapevtik večja, vendar pa preživetje celic ni bilo zelo zmanjšano in tako ne zakrije učinka dodane radioterapije. Pri tej koncentraciji lahko še vedno zaznamo interakcijo med terapijama.

5.4.1 Kombinacija radio- in kemoterapije pri koncentraciji 0,05 µg/ml cisplatina

Pri kombinaciji terapij, pri kateri smo uporabili koncentracijo 0,05 µg/ml cisplatina, smo grafično določili vrednost D0 za vsako izmed treh ponovitev in izračunali povprečno vrednost. Vrednost D10 smo določili po enačbi (2). Kot kontrola so nam služile ponovitve, pri katerih smo celice samo obsevali brez dodatka cisplatina. Pri celični liniji FaDu je cisplatin povečal učinek obsevanja pri vseh testiranih dozah (sl. 14), medtem ko pri celični liniji FaDu2A3 dodatek cisplatina učinka obsevanja ni statistično značilno povečal.

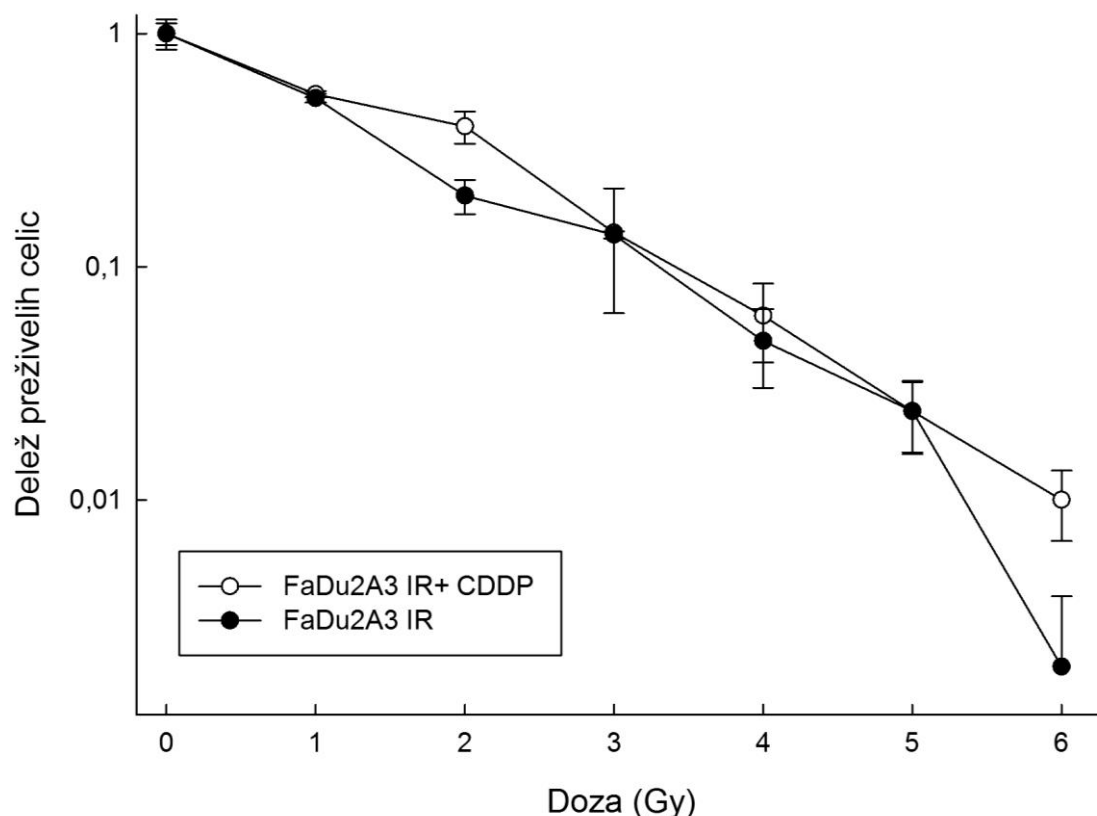
Preglednica 4: Vrednosti D0 in D10 ($\pm$ SE) za celični liniji FaDu in FaDu2A3 pri kombinirani terapiji (IR in CDDP) s koncentracijo cisplatina 0,05 µg/ml in kontrolnih skupinah (IR)

	FaDu		FaDu2A3	
	IR	IR in CDDP	IR	IR in CDDP
D0 (Gy)	3,6 $\pm$ 0,15	3,2 $\pm$ 0,15	1,0 $\pm$ 0,07	1,6 $\pm$ 0,36
D10 (Gy)	8,4 $\pm$ 0,53	7,4 $\pm$ 0,35	2,3 $\pm$ 0,15	3,6 $\pm$ 0,83



Slika 14: Krivulji odziva celične linije FaDu na kombinacijo radio- in kemoterapije (koncentracija cisplatina 0,05 µg/ml) ter kontrola samo z obsevanjem

Graf prikazuje vrednosti relativne celične viabilnosti pri posameznih dozah obsevanja celične linije FaDu v primerjavi s kombinirano terapijo. Delež preživelih celic, izpostavljenih cisplatinu in obsevanju je bil manjši v primerjavi z ustrežajočimi ponovitvami samega obsevanja. *: $P < 0,05$; statistično značilna razlika v primerjavi z vrednostjo deleža preživelih celic celične linije FaDu pri posamezni dozi.



Slika 15: Krivulji odziva celične linije FaDu2A3 na kombinacijo radio- in kemoterapije (koncentracija cisplatina 0,05 µg/ml) ter kontrola samo z obsevanjem

Med krivuljama na grafu ni statistično značilnih razlik pri posameznih vrednostih doz obsevanja. Manjša, a še vedno ne statistično značilna odstopanja, se pojavljajo pri koncentracijah 2 Gy in 6 Gy. Koncentracija cisplatina 0,05 µg/ml tako ni povečala umrljivosti celic celične linije FaDu2A3 v primerjavi s kontrolo.

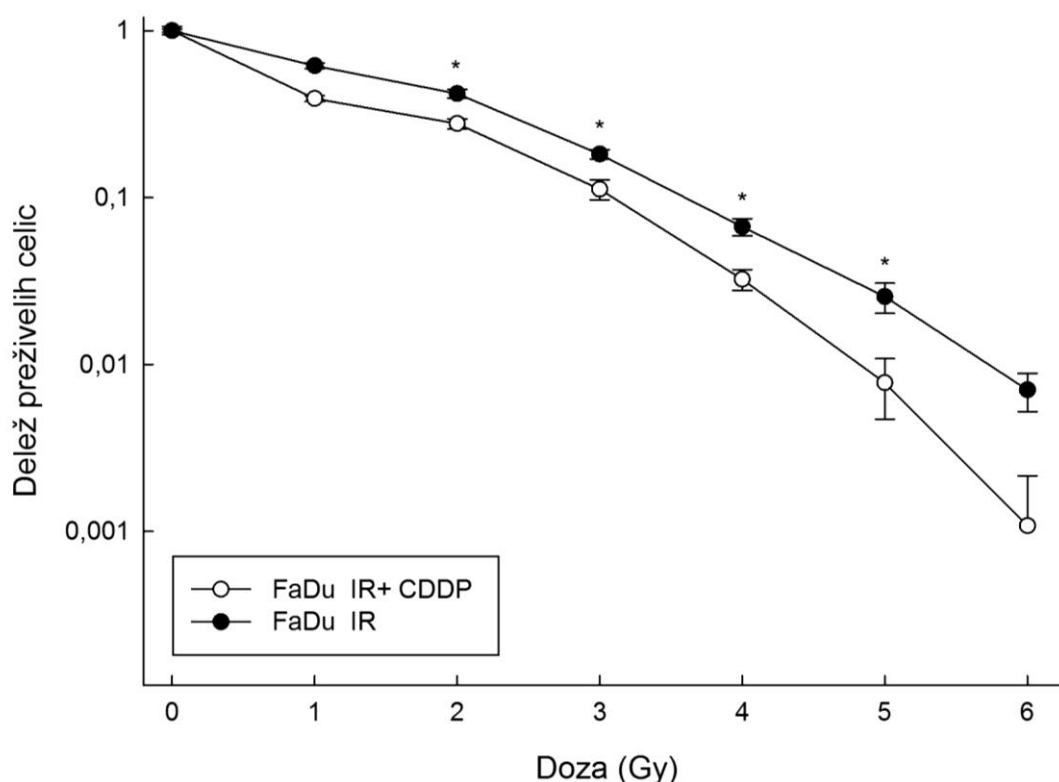
5.4.2 Kombinacija radio- in kemoterapije pri koncentraciji 0,1 µg/ml cisplatina

Tako kot pri prvi kombinaciji terapij smo pri kombinaciji s koncentracijo 0,1 µg/ml cisplatina grafično določili vrednost D0 za vsako izmed treh ponovitev in izračunali povprečno vrednost. Vrednost D10 smo določili po enačbi (2). Tudi tu smo imeli kontrolno skupino, v kateri so bile celice, ki smo jih samo obsevali. Cisplatin je povečal učinek obsevanja pri vseh testiranih dozah obeh celičnih linij (sl. 16 in 18). Zmanjšan učinek je opazen zgolj pri obsevalni dozi 4 Gy pri celični liniji FaDu2A3, ki pa ga pripisujemo eksperimentalni napaki. Vrednosti D0 in D10 kažejo na podobno odzivnost celic obeh celičnih linij na kombinacijo radio- in kemoterapije (pregl. 5).

Sliki 17 in 19 prikazujeta slike celičnih kolonij celičnih linij FaDu in FaDu2A3 pri kontroli in dveh različnih dozah (1 Gy in 6 Gy). Pri obsevalni dozi 6 Gy je dobro viden nastanek abortivnih kolonij.

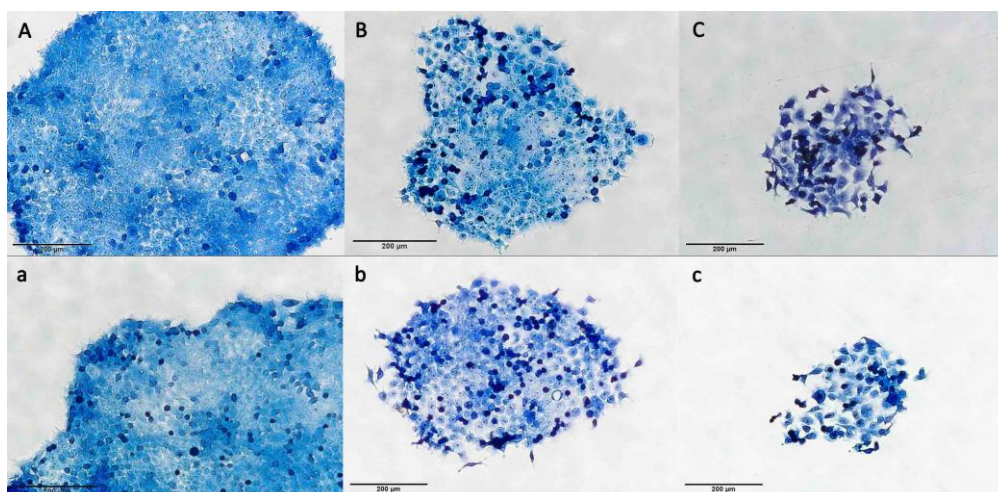
Preglednica 5: Vrednosti D0 in D10 ($\pm$ SE) za celični liniji FaDu in FaDu2A3 pri kombinirani terapiji (IR in CDDP) in kontrolnih skupinah (IR). Koncentracija cisplatina je bila 0,1 μ g/ml.

	FaDu		FaDu2A3	
	IR	IR in CDDP	IR	IR in CDDP
D0 (Gy)	2,2 $\pm$ 0,11	1,0 $\pm$ 0,77	1,9 $\pm$ 0,16	0,9 $\pm$ 0,37
D10 (Gy)	5,0 $\pm$ 0,26	2,2 $\pm$ 1,77	4,3 $\pm$ 0,37	2,1 $\pm$ 0,86



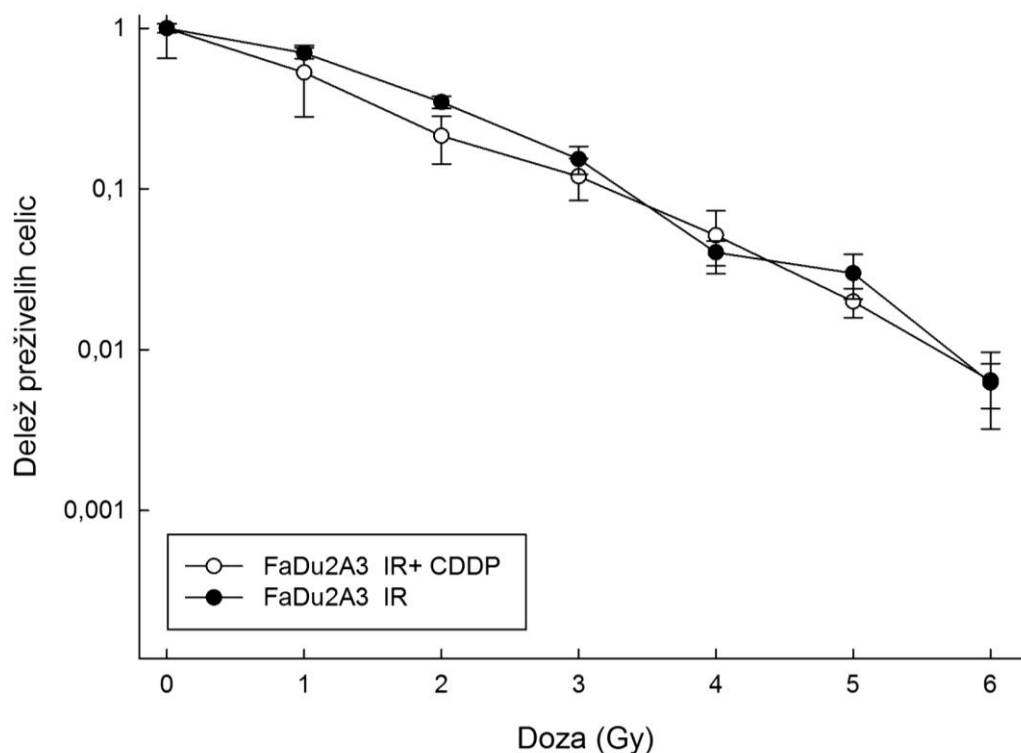
Slika 16: Krivulji odziva celične linije FaDu na kombinacijo radio- in kemoterapije (koncentracija cisplatina 0,1 μ g/ml) ter kontrola samo z obsevanjem

Na grafu so prikazane vrednosti relativne celične viabilnosti pri posameznih dozah obsevanja celične linije FaDu v primerjavi s kombinirano terapijo obsevanja in kemoterapije. Relativna viabilnost celic, izpostavljenih cisplatinu in ionizirajočem sevanju, je bila manjša v primerjavi z ustrežajočimi ponovitvami samega obsevanja. *: $P < 0,05$; statistično značilna razlika v primerjavi z vrednostjo relativne celične viabilnosti celične linije FaDu kombinaciji radio- in kemoterapije.



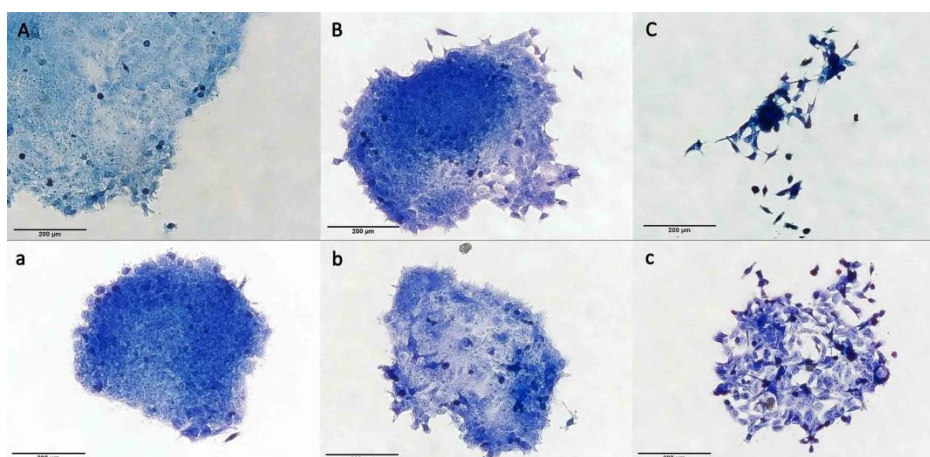
Slika 17: Kolonije celične linije FaDu po tretiranju z radio- in kemoterapijo (koncentracija cisplatina 0,1 µg/ml) (A-C) ter kontrola, tretirana samo z obsevanjem (a-c)

Kolonije celične linije FaDu: A, a- kontrola brez obsevanja, B, b- 1Gy, C, c- 6Gy.



Slika 18: Krivulji odziva celične linije FaDu2A3 na kombinacijo radio in kemoterapije (koncentracija cisplatina 0,1 µg/ml) ter kontrola samo z obsevanjem

Na grafu so prikazane vrednosti relativne celične viabilnosti pri posameznih dozah obsevanja celične linije FaDu2A3 v primerjavi s kombinirano terapijo obsevanja in kemoterapije. Celice, ki so bile izpostavljene cisplatinu in ionizirajočem sevanju, so imele znižan delež preživelih celic v primerjavi z ustrežajočimi ponovitvami samega obsevanja. Rezultati nobene izmed ponovitev kombinirane terapije niso bili statistično značilno različni od rezultatov kontrolnega obsevanja.



Slika 19: Kolonije celične linije FaDu2A3 po tretiranju z radio- in kemoterapijo (koncentracija cisplatina 0,1 µg/ml) (A-C) ter kontrola, tretirana samo z obsevanjem (a-c)

Kolonije celične linije FaDu2A3: A, a- kontrola brez obsevanja, B, b- 1Gy, C, c- 6Gy.

6 RAZPRAVA

Ploščatocelični karcinomi ustnega dela žrela in grla so z incidenco 500.000 novih primerov vsako leto glede na svojo pogostost na šestem mestu med rakavimi obolenji (Jemal in sod., 2007). Glavni vzrok za nastanek te vrste rakavega obolenja je kajenje, a ker število kadilcev upada, je danes vedno bolj pomemben tudi način spolnega življenja. Vedno večje število oralnih spolnih partnerjev je na drugem mestu med dejavniki tveganja, saj sta to in poljubljanje, kjer pride do prenosa sline, načina prenosa HPV. Slednji pa v sluznici ustne votline povzroča nastanek ploščatoceličnega karcinoma (D'Souza in sod., 2009).

Factor	Prevalence of HPV, ^b total no. (%) ^c	Factor	Prevalence of HPV, ^b total no. (%) ^c
Demographic		<u>Tobacco and alcohol use</u>	
Sex		Ever smoked tobacco	
Female	81 (1.2)	No	184 (4.9)
Male	251 (6.0)	Yes	
Race and ethnicity		Former user	105 (1.0)
Non-Hispanic		<u>Current user</u>	<u>44 (13.6)</u>
White	276 (4.7)	Intensity of current smoking, cigs/day	
Black	34 (8.8)	<20	33 (12.1)
Asian or Middle Eastern	13 (0.0)	20–39	7 (14.3)
Hispanic	9 (0.0)	<u>≥40</u>	<u>4 (25.0)</u>
Age, years		Ever drank	
<40	31 (6.5)	No	80 (3.8)
40–54	120 (6.7)	Yes	
55–64	95 (4.2)	Former user	46 (6.5)
≥65	86 (2.3)	Current user	207 (4.8)
Risk per each year after age >30 years	...	Days of drinking per week, ⁱ no.	
Sexual behavior		<1	74 (5.4)
Sexual orientation		1–6	101 (5.0)
Heterosexual	318 (4.7)	All	24 (4.2)
Homo- or bisexual	14 (7.1)	Ever used marijuana	
<u>Oral sex partners,^f lifetime no.</u>		No	284 (4.2)
0–1	156 (1.9)	Yes	50 (8.0)
2–10	136 (5.9)		
<u>≥11</u>	<u>40 (12.5)</u>		
Barrier use ^h			
Yes or no oral sex	100 (3.0)		
No	232 (5.6)		
Sex partners, lifetime no.			
0–5	193 (3.1)		
6–25	98 (5.1)		
≥26	40 (12.5)		

Slika 20: Primerjava med različnimi dejavniki in okužbo s humanim virusom papiloma

V študiji, kjer so v dveh neodvisnih skupinah pacientov med letoma 2000 in 2006 spremljali pojavnost ploščatoceličnega karcinoma glave in vratu, je bila med 332 odraslimi pacienti okužba s HPV zaznana pri 4,8 % pacientov. Povprečna starost pacientov je bila 57 let (z razponom med 25 in 87 let). Večina pacientov je bila moškega spola (76 %) in so bili prebivalci zvezne države Maryland, ZDA. Možnost okužbe močno naraste z večjim številom oralnih spolnih partnerjev in pri rednih kadilcih. Po tridesetem letu starosti z vsakim letom upade možnost pojavljanja za 6 %, bolezen je pogostejša pri moških (prirejeno po D'Souza in sod. 2009:1264, 1265).

HPV+ rakava obolenja mezofarinksa naj bi bila bolj odzivna na kemoterapijo in radioterapijo, kot HPV negativna, s tem pa se jim pripisuje boljša prognoza zdravljenja (Marur in sod., 2010). Različne študije ugotavljajo, kaj so vzroki za boljšo odzivnost te oblike rakavega obolenja, saj je s tem povezano načrtovanje in prilagajanje zdravljenja. V več različnih kliničnih študijah na skupinah pacientov s ploščatoceličnim karcinomom ustnega žrela je bilo standardno zdravljenje spremenjeno na podlagi predpostavke, da HPV poveča odzivnost rakavih celic na spremenjen režim obsevanja in na kombinacijo s kemoterapevtiki.

Že leta 2000 so Mellin in sodelavci z retrospektivno študijo vzorcev HPV pozitivnih in negativnih vzorcev tonziliarnega karcinoma ugotovili povezavo med virusno okužbo s HPV in izboljšanim odzivom na radioterapijo. Boljša prognoza se je pokazala tako v zmanjšani ponovitvi bolezni kot v izboljšanem petletnem preživetju.

Prilagojena oblika radioterapije – pospešena radioterapija, ki skrajša celokupni čas zdravljenja ob povečanju doze, je agresivni postopek zdravljenja, ki poveča stranske učinke, ki se kažejo kot posledična pozna toksičnost. Takšni rezultati so se pokazali v velikih prospektivnih študijah (Rosenthal in Ang, 2004). DAHANCA (Danish Head and Neck Cancer Group) 6&7 naključno zdravljenje faze III je bilo izvedeno na 1476 pacientih s primarnim invazivnim ploščatoceličnim karcinomom grla (stopnja I–IV). Skrajšan je bil celokupni čas zdravljenja, saj je bila uporabljena pospešena frakcionirana radioterapija. Rezultati so pokazali boljšo lokalno regionalno tumorsko kontrolo in izboljšano preživetje brez bolezni pri HPV p16 pozitivnih tumorjih. Slaba stran skrajšane terapije z večjo dozo obsevanja pa je zgodnji pojav mukozitoz (Lassen in sod., 2011). Razliko v petletnem preživetju pacientov s karcinomom mezofarinksa, zdravljenih s standardno ali pospešeno radioterapijo, so ugotavljali tudi v GORTEC 94-02 (Radiotherapy Oncology Group for head and neck cancer) naključni klinični študiji. Tudi tu se je pri pacientih, ki so prejeli pospešeno obsevanje, pojavila akutna toksičnost, izboljšala se je lokalna kontrola bolezni, celokupno preživetje pa je ostalo nespremenjeno (Bourhis in sod., 2000). Študija EORTC (European Organisation for Research and Treatment of Cancer) je z pospešeno frakcionacijo prišla do boljše lokalne in regionalne kontrole v primerjavi s standardno. Pri 14 % pacientov, ki so prejeli pospešeno obsevanje so se kasneje pokazale funkcionalne radiacijske poškodbe ter akutna in pozna toksičnost (Horiot in sod., 1997).

Zdravljenje ploščatoceličnega karcinoma ustnega žrela s kombinacijo indukcijske kemoterapije in frakcionirane radioterapije so izvedli v retrospektivni študiji ECOG (Eastern Cooperative Oncology Group) zdravljenja faze II. Intravenoznemu vnosu paclitaksela in karboplatina je sledila sočasna kemoterapija samo s paclitakselom in standardna frakcionirana radioterapija. Boljši odziv na zdravljenje – statistično značilni napredek v preživetju ter celokupno preživetje so pokazali pacienti s HPV pozitivnimi tumorji (Fakhry in sod., 2008). Bilo je opravljenih še devet naprednih zdravljenj faze III s kombinacijo sočasne kemoterapije in radioterapije in pri vseh so uporabili kemoterapevtik

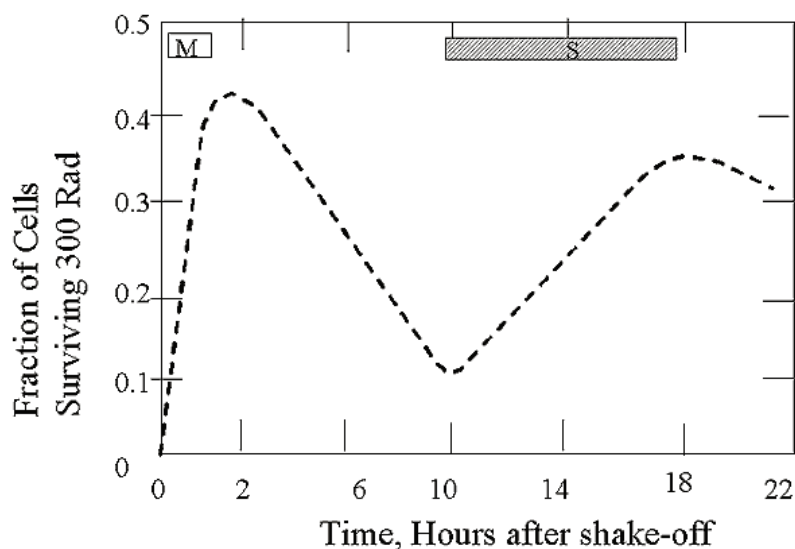
na osnovi platine (najpogosteje cisplatin). Pri kombiniranem zdravljenju se je pokazalo izboljšanje v lokalni kontroli, hkrati pa tudi izboljšano preživetje brez bolezni in/ali celokupno preživetje. A tudi pri tej obliki terapije se je pojavila nesprejemljiva toksičnost (Rosenthal in Ang, 2004).

Kljub številnim študijam še vedno ni ugotovljena najboljša oblika zdravljenja ploščatoceličnega karcinoma glave in vratu, ki bi hkrati izboljšala lokalno-regionalno tumorsko kontrolo, celokupno preživetje in hkrati ne bi povzročala akutne ali pozne toksičnosti. Ker naj bi HPV pripomogel k boljšemu odzivu na kombinacijo kemo- in radioterapije, so potrebne *in vitro* študije, ki bi razkrile molekulske mehanizme boljšega odziva.

Harris in sodelavci (2013) so opravili študijo na HPV16+ celičnih linijah materničnega vratu (celična linija CasKi) in ploščatoceličnega karcinoma ustnega žrela (FaDu2A3). V svoji študiji, opravljeni na miših, so uporabili kombinacijo cisplatina in imunoterapije, ugotavljali pa so dostopnost onkoproteina E6 za radioimunoterapijo po predhodnem tretiranju celic s cisplatinom. Učinek kombinirane terapije se je izkazal za boljšega kot pri posameznih terapijah. V svoji študiji pa niso opravili primerjave s HPV- tumorji, prav tako kot niso ugotavljali učinka teleradioterapije. Primerjave vpliva kombinacije radio- in kemoterapije na HPV+ in HPV- celične linije ploščatoceličnega karcinoma ustnega žrela v naši raziskavi je bila tako prva te oblike. Glede na dosedaj znane podatke o HPV, njegovih onkogenih in njihovem delovanju na celični cikel rakavih celic smo pričakovali boljši odziv HPV pozitivnih celic na kombinirano terapijo.

Ker gre pri celični liniji FaDu2A3 za transfeciran subklon celične linije FaDu in ne za celično linijo, pridobljeno iz okuženega pacienta, so na Inštitutu za mikrobiologijo medicinske fakultete Univerze v Ljubljani najprej preverili izražanje gena E7 HPV16 v tej liniji. Ker so pokazali prisotnost onkogenega E7, je bila v celični liniji posredno dokazana tudi prisotnost onkogenega E6, saj oba ležita na vektorju pLXSN16E6E7, s katerim je transfecirana celična linija FaDu.

Poleg popravljalnih mehanizmov poškodb DNA je regulacija faz celičnega cikla ključna determinanta občutljivosti za ionizirajoče sevanje. Največja radiosenzitivnost celic je na prehodu iz faze G2 v fazo M, manjša v G1 fazi in najmanjša v pozni S fazi (sl. 21). Najboljši rezultat radioterapije je dosežen, če je čimvečji delež celic ustavljen v G2 in M fazi. Poškodbe DNA, povzročene z ionizirajočim sevanjem, sprožijo signale, ki lahko vodijo v popravilo poškodb ali pa v ustavitev rasti in celično smrt (nekrozo ali apoptozo) (Pawlik in Keyomarsi, 2004).



Slika 21: Preživetje frakcij celic HeLa pri obsevanju z dozo 300 Rad (=3 Gy) v različnih fazah celičnega cikla, pri čemer čas 0 predstavlja začetek mitoze

Od začetka faze S proti njenemu koncu postajajo celice vedno bolj rezistentne. Po prehodu v fazo G2 senzitivnost močno narašča vse do začetka mitoze. Fazi G1 in začetek faze S sta po radiosenzitivnosti med obema ekstremoma (Hall in Giaccia, 2012: 60).

Prehod iz G2 v M fazo in s tem začetek mitoze je nadzorovan z od ciklina odvisno kinazo 2 (Cdc2p). Cdc2p je kot monomer neaktivna, zato je potrebna vezava ciklinskega partnerja – ciklina tipa B. Številne reverzibilne fosforilacije nadzorujejo Cdc2p/ciklin B kompleks. Ključna je fosforilacija kinaznega tirozina na mestu 15 (Y15), ki jo posredujejo tirozinske kinaze (primer: Weelp). Defosforilacija Y15 pa je pod vplivom tirozinskih fosfataz (primer: Cdc25p) (Raleigh in O'Connell, 2000). Na aktivnost Cdc2p/ciklin B kompleksa vpliva tudi protein p21. Slednji je inhibitor celičnega cikla in v nefosforilirani obliki zavira prehod iz faze G2 v M. Fosforilacija p21 je pod vplivom proteinske kinaze B (Akt) (Dash in El-Deiry, 2005). p21 je tarča tumor supresorskega proteina p53. Če je v celici prisotna divja oblika p53 (wt p53; wild-type p53), ta močno stimulira sintezo proteina p21, ki zavira delovanje kompleksa Cdc2p/ciklin B in s tem zaustavi celični cikel v fazi G2 (Agarwall in sod., 1995).

Pri celicah z wt p53 nizke doze radioterapije povečajo izražanje gena p53 in posledično gena p21, kar ustavi celice v fazah G1 in G2. Tudi pri celicah, ki izražajo E6 virusni onkogen je pri nizkih obsevalnih dozah celični cikel ustavljen v G1 in G2 fazah. Pri celicah, ki izražajo oba virusna gena E6 in E7, pa je celični cikel ustavljen samo v G2 fazi. Tako naj vsaj pri nizkih dozah E6 in E7 ne bi imela vpliva na radiosenzitivnost celic (Vozenin in sod., 2010). Pim in sod. (2005) pa so ugotovili vpliv HPV E7 na povečano fosforilacijo proteinske kinaze B (Akt). Pod njenim vplivom se poveča fosforilacija proteina p21, ki pa preko delovanja na kompleks Cdc2p/ciklin B poveča prehod iz G2 v fazo M. Rezultati dosedanjih raziskav so si torej nasprotujoči.

Celična linija FaDu ima mutacijo v genu za tumor supresorski protein p53 (Sommers in sod., 1992), in sicer v kodonu 248 (Caamano in sod., 1993). Izkazalo se je, da je bila izražena polovična količina proteina p53 zaradi transkripcije le enega izmed alelov (Reis in sod., 1992 in Caamano in sod. 1993). Ker je celična linija FaDu2A3 zgolj transfeciran subklon linije FaDu, je tudi pri njej prisoten mutiran gen p53, a je zaradi mutacije zgolj na enem alelu nekaj funkcije wt p53 ohranjene. Naši rezultati obsevanja obeh celičnih linij kažejo na večjo radiosenzitivnost celic linije FaDu2A3 (sl. 11). Glede na to, da je razlika med celičnima linijama le prisotnost onkogenov E6 in E7 v celični liniji FaDu2A3, imata le ta očitno vpliv na radiosenzitizacijo celic. Večja radiosenzitivnost naj bi bila dosežena z ustavitvijo celic v fazi G2, kar pa si nasprotuje z ugotovitvami, do katerih so prišli Pim in sod. (2005). Do slednjih bi lahko prišlo zato, ker so pri svojem poskusu s HPV16 transformirali humane keratinocite, v katerih je ohranjen wt p53. Celična linija FaDu2A3 se je tako izkazala za model celic ploščatoceličnega karcinoma ustnega žrela, kjer je mutiran tudi p53. Na podlagi naših rezultatov naj bi bila za povečano občutljivost za obsevanje odgovorna proteina E6 in E7. Protein E7 se veže na protein pRb, povzroči njegovo fosforilacijo in sprostitev kofaktorja E2F. Sproščeni E2F omogoča transkripcijo genov, odgovornih za prehod celičnega cikla iz faze G1 v fazo S, pRb pa je razgrajen (Giarre in sod., 2001). Niculescu in sodelavci (1998) so ugotovili da so se pRb negativne celice ustavile v fazi G2 celičnega cikla. Torej bi lahko na podlagi naših rezultatov sklepali, da je v celični liniji FaDu2A3 prisoten protein E7 vplival na zmanjšanje količine pRb v celicah, kar je povzročilo da se je več celic ustavilo v fazi G2 celičnega cikla. Celice v tej fazi pa so bolj občutljive za ionizirajoče sevanje, zato boljši odziv na radioterapijo v primerjavi s celicami FaDu.

Pri ugotavljanju razlike vpliva cisplatina na celični liniji (sl. 13) so rezultati pokazali večjo občutljivost celične linije FaDu (FaDu EC50: $0,05 \mu\text{g/ml} \pm 0,006$; FaDu2A3 EC50: $0,067 \mu\text{g/ml} \pm 0,005$). Rezultati se ujemajo z ugotovitvami, da je v obeh celičnih linijah prisoten mutiran protein p53, predvidevamo pa lahko, da je v celični liniji FaDu2A3 zaradi prisotnosti proteina E7 razgrajen tudi protein pRb. Predpostavimo lahko, da so v celični liniji FaDu2A3 celice lahko kljub poškodbam napredovale iz G1 v S fazo celičnega cikla, medtem ko se je preživetje celic linije FaDu zmanjšalo zaradi apoptoze.

Glavni namen naše raziskave pa je bil razviti eksperimentalno metodo za oceno odziva celične linije FaDu in njenega subklona FaDu2A3 na kombinacijo radio in kemoterapije. Glede na rezultate dosedanjih kliničnih študij smo pričakovali, da se bodo na kombinacijo terapij bolje odzivale celice linije FaDu2A3. Cisplatin poveča občutljivost na obsevanje, saj onemogoča popravilo dvojnih prelomov verig z nehomolognim združevanjem koncev (Boeckman in sod., 2005). Sorenson in sodelavci (1990) so v svoji raziskavi ugotovili, da je tretiranje s cisplatinom celice ustavilo v G2 fazi celičnega cikla, kjer so ostale nekaj dni, nato pa sta bili možni dve poti: ali so celice popravile poškodbo in vstopile v fazo mitoze ali pa je sledila apoptoza. Ustavitev celic v G2 fazi jih naredi bolj radiosenzitivne, zato je dosežen boljši odziv na radioterapijo. Pri vseh naših ponovitvah kombinacije kemo- in

radioterapije so se celice odzivale v skladu s tem. Pri koncentraciji cisplatina 0,05 µg/ml, je bilo pri celični liniji FaDu2A3 preživetje celic skoraj povsem enako tako pri samem obsevanju kot pri kombinaciji s kemoterapijo. Pri dozi 2 Gy je prišlo do razmika krivulj grafa, a razlika je zgolj navidezna in je rezultat eksperimentalne napake. Razmik krivulj pri obsevalni dozi 6 Gy je najverjetneje posledica majhnega števila izraslih kolonij pri tej dozi (sl. 15). Velika razlika v vrednostih D0 in D10 med celičnima linijama (pregl. 4) je posledica eksperimentalne napake pri celični liniji FaDu2A3, saj je bila vrednost D0 odčitana ravno na mestu razmika krivulj. Tudi pri koncentraciji 0,1 µg/ml pri celični liniji FaDu2A3 (sl. 18) ni prišlo do statistično značilnih razlik med vrednostmi dobljenimi s samim obsevanjem in v kombinaciji s kemoterapijo, a je pri tej koncentraciji razmik med krivuljama bolj jasen, kot pri koncentraciji cisplatina 0,05 µg/ml. Zmanjšan učinek je opazen zgolj pri obsevalni dozi 4 Gy, ki pa ga pripisujemo eksperimentalni napaki

Vrednost D0 celic celične linije FaDu2A3 je bila v primerjavi s celično linijo FaDu pri ponovitvah tako s koncentracijo cisplatina 0,05 µg/ml, kot 0,1 µg/ml nižja. Že pri kontrolnih ponovitvah, kjer so bile celice tretirane samo z obsevanjem, se je celična linija FaDu2A3 izkazala za bolj občutljivo, kar potrjuje naše predhodne ugotovitve po tretiranju celičnih linij samo z obsevanjem. Glede na spremembe vrednosti D0 med kontrolami in celicami tretiranimi s kombinacijo radio- in kemoterapije pa lahko ugotovimo, da je cisplatin povečal učinek obsevanja pri celični liniji FaDu. To pa je v skladu z našo ugotovitvijo, da so celice celične linije FaDu bolj občutljive za tretiranje s cisplatinom.

Z našo raziskavo smo tako pokazali, da prisotnost proteinov E6 in E7 najverjetneje vpliva na povečano radiosenzitivnost celic, ne glede na prisotnost ostalih molekularnih lastnosti, značilnih za HPV pozitivne celice. Obe naši celični liniji sta nosili mutacijo p53, razlika je bila le v prisotnosti proteinov E6 in E7 v celični liniji FaDu2A3. Slednji pa preko proteina pRb povzroči zaustavitev celic v celični fazi G2, ki je najbolj radiosenzitivna faza.

7 SKLEPI

V naši raziskavi smo prišli do sledečih sklepov:

- Celična linija FaDu2A3 je model celic ploščatoceličnega karcinoma ustnega žrela, ki vsebujejo onkoproteina E6 in E7 in nosi mutacijo na genu p53.
- Celice linije FaDu2A3 so bolj občutljive za obsevanje kot celice linije FaDu.
- V primerjavi z deležem preživelih celic linije FaDu2A3 ima kemoterapevtik cisplatin večji vpliv na zmanjšanje deleža preživelih celic linije FaDu.
- Cisplatin je bolj povečal učinek radioterapije pri celicah FaDu kot pri celicah FaDu2A3.
- Povečano občutljivost za obsevanje najverjetneje posredujejo onkoproteina E6 in E7, ki povečata radiosenzitivnost celic ob ustavitvi v celični fazi G2.

8 POVZETEK

Rakavo obolenje je eden vodilnih vzrokov smrtnosti v razvitih državah. Rakava obolenja glave in vratu so po pogostosti na šestem mestu med različnimi oblikami rakavih obolenj na svetu. Ploščatocelični karcinom je rakavo obolenje sluznice ustne votline, najpomembnejša etiološka dejavnika za nastanek ploščatoceličnega karcinoma glave in vratu sta kajenje in alkohol. Kot zelo pomemben etiološki dejavnik pa se ugotavlja tudi humani virus papiloma, ki je glavni etiološki dejavnik za nastanek raka materničnega vratu. Do vse pogostejše okužbe s HPV prihaja zaradi sprememb v spolnih normah (več oralnih spolnih partnerjev, oralni spolni odnosi pri zgodnejših starostih ter njihova večja pogostost). Rezultati kliničnih retrospektivnih študij so pokazali povečano občutljivost pacientov s ploščatoceličnim karcinomom glave in vratu, okuženih s HPV, za radio- in kemoterapijo. Izboljšan odziv na zdravljenje naj bi posredovala virusna onkoproteina E6 in E7, ki povečata genomsko nestabilnost. Kot standardno zdravljenje zgodnjih oblik ploščatoceličnega karcinoma glave in vratu se uporabljata operativni poseg ali radioterapija. Pri napredovanih karcinomih glave in vratu pa se v kombinaciji uporabljata radioterapija in kemoterapija. Onkoproteina E6 in E7 s svojim delovanjem povečata občutljivost okuženih celic za radioterapijo. Z razumevanjem delovanja HPV na okužene celice bi lahko razvili nove napredne tehnike zdravljenja, pri čemer bi ob čim manjši poškodbi zdravega tkiva dosegli izboljšano petletno preživetje in preživetje brez ponovitve bolezni.

Da bi razumeli delovanje HPV na rakave celice, je potrebno izvesti *in vitro* študije. Naša raziskava vpliva kombinacije radio- in kemoterapije na HPV pozitivne in negativne celice ploščatoceličnega karcinoma glave in vratu je bila prva raziskava te oblike. Uporabili smo dve celični liniji ploščatoceličnega karcinoma ustnega žrela: celično linijo FaDu in njen transfeciran subklon FaDu2A3. Celično linijo FaDu2A3 so pripravili z vnosom vektorja pLXSN16E6E7, ki vsebuje gena E6 in E7 iz HPV podtipa 16, v celično linijo FaDu. Namen naše raziskave je bil razvoj eksperimentalne metode za oceno odziva humane celične linije ploščatoceličnega karcinoma FaDu in njenega subklona FaDu2A3 na radio in kemoterapijo. Odziv celičnih linij smo preverjali pri različnih dozah obsevanja in koncentracijah cisplatina tako samostojno kot v različnih kombinacijah. Za določitev deleža preživelih celic po izvedeni terapiji smo uporabili test klonogenosti.

Našo raziskavo smo zaključili s sklepi, da lahko celično linijo FaDu2A3 uporabimo kot model celic ploščatoceličnega karcinoma ustnega žrela, ki vsebujejo onkoproteina E6 in E7, hkrati pa nosijo mutacijo na genu p53, ki jo imajo že osnovne celice linije FaDu. Celice linije FaDu2A3 so se izkazale za bolj občutljive za obsevanje ter na kombinacijo radio- in kemoterapije. Večjo občutljivost za kemoterapevtik cisplatin pa so pokazale celice linije FaDu. Cisplatin je tudi povečal učinek obsevanja pri celicah FaDu kot pri FaDu2A3.

9 VIRI

- Agarwal L. M., Agarwal A., Taylor R. W., Stark R. G. 1995. p53 controls both the G2/M and the G1 cell cycle checkpoints and mediates reversible growth arrest in human fibroblasts. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 92, 18: 8463-8497
- Alderden A. R., Hall D. M., Hambley W. T. 2006. The discovery and development of cisplatin. *Journal of Chemical Education*, 83, 5: 728-734
- Ang K. K., Sturgis M. E. 2011. Human papillomavirus as a marker of the natural history and response to therapy of head and neck squamous cell carcinoma. *Seminars in Radiation Oncology*, 22, 2: 128-142
- Azzam E. I., Jay-Gerin J. P., Pain D. 2012. Ionizing radiation- induced metabolic oxidative stress and prolonged cell injury. *Cancer Letters*, 327, 1-2: 48
- Bernier J., Bentzen S. M. 2002. Altered fractionation and combined radio-chemotherapy approaches: pioneering new opportunities in head and neck oncology. *European Journal of Cancer*, 39, 5: 560-571
- Boeckman J. H., Trego S. K., Henkels M. K., Turchi J. J. 2005. Cisplatin sensitizes cancer cells to ionizing radiation via inhibition of non- homologous joining. *Molecular Cancer Research*, 3, 5: 277-285
- Bourhis J., Lapeyre M., Tortochaux J., Rives M., Bourdin S., Benassa T., Dubois J. B., Lesaunier F., Goeffrois L., Verelle P., Daly-Schveitzer N., Barder E., Wibault P., Ecshwege F., Benhamosa E. 2000. Very accelerated radiotherapy in HNSCC: Results of Gortec 94-02 randomized trial. *International Journal of Radiation Oncology Biology•Physics*, 48, 3: 111
- Caamano J., Zhang S. Y., Rosvold E. A., Bauer B., Klein- Szanto A. J. P. 1993. p53 alterations in human squamous cell carcinomas and carcinoma cell lines. *American Journal of Pathology*, 142, 4: 1131-1139
- Cepeda V., Fuertes M. A., Castilla J., Alonso C., Quevedo C., Perez J. M. 2007. Biochemical mechanisms of cisplatin cytotoxicity. *Anti- Cancer Agents in Medicinal Chemistry*, 7, 1: 3-17
- Chung H. C., Gillison L. M. 2009. Human papillomavirus in head and neck cancer: Its role in pathogenesis and clinical implications. *Clinical Cancer Research*, 15: 6758-6762
- Dash C. B., El-Deiry W. 2005. Phosphorylation of p21 in G2/M promotes cyclin B Cdc2 kinase activity. *Molecular Cell Biology*, 25, 8: 3364-3387

- Devaraj K., Gillison L. M., Wu T.-C. 2003. Development of HPV vaccines for HPV-associated head and neck squamous cell carcinoma. *Critical Reviews in Oral Biology & Medicine*, 14, 5: 345-362
- D'Souza G., Agraal Y., Halpern J., Bodison S., Gillison L. M. 2009. Oral sexual behaviours associated with prevalent oral human papillomavirus infection. *The Journal of Infectious Diseases*, 199, 9: 1263-1269
- Fakhry C., Westra H. W., Li S., Cmelak A., Ridge A. J., Pinto H., Forastiere A., Gillison L. M. 2008. Improved survival of patients with human papillomavirus-positive head and neck squamous cell carcinoma in a prospective trial. *Journal of the National Cancer Institute*, 100, 4: 261-269
- Franken N., Rodermond H., Stap J., Haveman J., van Bree C. 2006. Clonogenic assay of cells in vitro. *Nature protocols*, 1, 5: 2315-2319
- Giarrè M., Caldeira S., Malanchi I., Ciccolini F., João-Leão M., Tommasino M. 2001. Induction of pRb degradation by the human papillomavirus type 16 E7 protein is essential to efficiently overcome p16^{INK4a}- imposed G1cell cycle arrest. *Journal of Virology*, 75, 10: 4705-4712
- Gillison L. M. 2004. Human papillomavirus- associated head and neck cancer is a distinct epidemiologic, clinical and molecular entity. *Seminars in Oncology*, 31, 6: 744-754
- Goon KC P., Stanley A. M., Ebmeyer J., Steinsträsser L., Upile T., Jerjes W., Bernal-Sprekelsen M., Görner M., Sudhoff H H. 2009. HPV & head and neck cancer: a descriptive update. *Head & Neck Oncology*, 1: 36
- Harris M., Wang X. G., Jiang Z., Goldberg G. L., Casadevall A., Dadachova E. 2011. Radioimmunotherapy of experimental head and neck squamous cell carcinoma (HNSCC) with E6- specific antibody using a novel HPV- 16 positive cell line. *Head & Neck Oncology*, 3, 1: 9
- Harris M., Wang X. G., Jiang Z., Koba W., Goldberg G. L., Casadevall A., Dadachova E. 2013. Combined treatment of the experimental human papillomavirus 16-positive cervical and head and neck cancers with cisplatin and radioimmunotherapy targeting viral E6 oncoprotein. *British Journal of Cancer*, 108: 859-865
- Hall E. J., Giaccia A. J. 2011. *Radiobiology for the radiologist*. 7th ed. Philadelphia, Lippincott Williams & Wilkins: 546 str.

Horiot J. C., Bontemps P., van den Bogaert W., Le Fur R., van der Weijngaert D., Bolla M., Barnier J., Lusinchi A., Stuschke A., Stuschke M., Lopez-Torrecilla J., Begg A. C., Piereart M., Collete L. 1997. Accelerated fractionation (AF) compared to conventional fractionation (CF) improves loco-regional control in the radiotherapy of advanced head and neck cancers: results of the EORTC 22851 randomized trial. *Radiotherapy Oncology*, 44, 2: 111-121

http://labs.fhcrc.org/galloway/Maps_and_Figures.html, Fred Hutchinson Cancer Research Center (15. julij 2013)

IARC Monograph on The Evaluation of Carcinogenic Risks to Humans 200, 90 Human papillomaviruses: 47-179

Jemal A., Siegel R., Ward E., Murray T., Xu J., Thun M. J. 2007. Cancer statistics. *CA Cancer Journal for Clinicals*, 57, 1: 43-66

Lassen P. 2010. The role of human papillomavirus in head and neck cancer and the impact on radiotherapy outcome. *Radiotherapy and Oncology*, 95, 3: 371-380

Lassen P., Eriksen G. J., Krogdahl A., Hamilton- Therkildsen M., Ulhøi P. B., Overgaard M., Specht L., Andersen E., Johansen J., Andersen J. L., Grau C., Overgaard J. 2011. The influence of HPV-associated p16-expression on accelerated fractionated radiotherapy in head and neck cancer: Evaluation of the randomised DAHANCA 6&7 trial. *Radiotherapy and Oncology*, 100, 1: 49-55.

Marur S., D'Souza G., Westra W. H., Forastiere A. A. 2010. HPV-associated head and neck cancer: a virus related cancer epidemic. *Lancet Oncology*, 11, 8: 781-89

Mellin H., Friesland S., Lowensohn R., Dalianis T., Wikland E. M. 2000. Human papillomavirus (HPV) DNA in tonsillar cancer: Clinical correlates, risk of relapse, and survival. *International Journal of Cancer*, 89, 3: 300-304

Mendelsohn A. H., Lai C. K., Shintaku P., Elashoff D. A., Dubinett S. M., Abemayor E., St. John M. A. 2010. Histopathologic findings of HPV and p16 positive HNSCC. *The Laryngoscope*, 120, 9: 1788-1794

Niculescu A. B. III, Chen X., Smeets M., Hengst L., Prives C., Reed S. I. 1998. Effects of p21^{Cip1/Waf1} at both the G₁/S and the G₂/M cell cycle transitions: pRb is a critical determinant in blocking DNA replication and in preventing endoreduplication. *Molecular Cell Biology*, 18, 1: 629-643

Novaković S., Hočevan M., Novaković J. B., Strojjan P., Žgajnar J. 2009. ONKOLOGIJA: raziskovanje, diagnostika in zdravljenje raka. 1st ed. Ljubljana, Mladinska knjiga: 425 str.

- Pawlik T. M., Keyomarsi K. 2004. Role of cell cycle in mediating sensitivity to radiotherapy. *International Journal of Radiation Oncology Biology•Physics*, 59, 4: 928-942
- Pim D., Massimi P., Dilworth M. S., Banks L. 2005. Activation of the protein kinase B pathway by the HPV-16 E7 oncoprotein occurs through a mechanism involving interaction with PP2A. *Oncogene*, 24, 53: 830-7838
- Povirk L. F. 2012. Processing of Damaged DNA Ends for Double-Strand Break Repair in Mammalian Cells. *ISRN Molecular Biology*, 2012: 1-16
- Raaphorst G. P., Leblanc M. J., Li L. F. 2005. A comparison of response to cisplatin, radiation and combined treatment for cells deficient in recombination repair pathways. *Anticancer research*, 25, 1A: 53-58
- Raleigh M. J., O'Connell J.M. 2000. The G2 DNA damage checkpoint targets both Wee1 and Cdc25. *Journal of Cell Science*, 113: 1727-1736
- Rangan S. R. S. 1972. A new human cell line (FaDu) from a hypopharyngeal carcinoma. *Cancer*, 29, 1: 117-121
- Rosenthal I. D., Ang K. K. 2004. Altered radiation therapy fractionation, chemoradiation, and patient selection for the treatment of head and neck squamous carcinoma. *Seminars in Radiation Oncology*, 14, 2: 153-166
- Roth V. 2006 <<http://www.doubling-time.com/compute.php>>
- Schaake-Konig C., van der Bogaert W., Dalesio O., Festen J., Hoogenhout J., van Houtte P., Kirkpatrick A., Koolen M., Maat B., Nija A., Renaud A., Rodrigus P., Schuster-Uitterhoeve L., Sculier J. P., van Zandwijk N., Bartelink H. 1992. Effects of concomitant cisplatin and radiotherapy inoperable non-small-cell lung cancer. *The New England Journal of Medicine*, 326, 8: 524- 530
- Skeel R .T., Khleif S. N. 2011. *Cancer chemotherapy*. 8th ed. Philadelphia, Lippincott Williams & Wilkins: 881 str
- Sommers D. K., Memck M. A., Lopez E. M., Incognito S. L., Schechter L. G., Casey G. 1992. Frequent p53 mutations in head and neck cancer. *Cancer Research*, 52: 5997-6000
- Sorenson C. M., Barry M. A., Eastman A. 1990. Analysis of events associated with cell cycle arrest at G2 phase and cell death induced by cisplatin. *Journal of the National Cancer Institute*, 82, 9: 749-755
- Spanos C. W., Nowicki P., Lee D. W., Hoover A., Hostager B., Gupta A., Anderson E. M., Lee H. J. 2009. Immune response during therapy with cisplatin and radiation for human

papillomavirus- related head and neck cancer. Archives of Otolaryngology- Head & Neck Surgery, 135, 11: 1137-1146

Van der Kogel A., Joiner M. 2009. Basic clinical radiobiology. 4th ed. London, Hodder education: 375 str.

Vozenin C. M., Lord H. K. , Hartl D., Deutsch E. 2010. Unravelling the biology of human papillomavirus (HPV) related tumours to enhance their radiosensitivity. Cancer Treatment Reviews, 36, 8: 629-636

Vu L. H., Sikora G. A., Fu S., Kao J. 2010. HPV- induced oropharyngeal cancer, immune response and response to therapy. Cancer Letters; 288, 2: 149-155

Wagener D. J. Th. 2009. The history of oncology. 1st ed. Houten, Springer Uitgeverij: 305 str.

Weinberger M. P., Yu Z., Haffty G. B., Kowalski D., Harigopal M., Brandsma J., Sasaki C., Joe J., Camp L. R., Rimm L. D., Psyrri A. 2006. Molecular classification identifies a subset of human papillomavirus- associated oropharyngeal cancers with favorable prognosis. Journal of Clinical Oncology, 24, 5: 736-747

Zur Hausen H. 2002. Papillomaviruses and cancer: from basic studies to clinical application. Nature Reviews, 2: 342-350

ZAHVALA

Najprej bi se rada zahvalila svoji mentorici prof. dr. Maji Čemažar, saj mi je omogočila opravljanje magistrke naloge na Oddelku za eksperimentalno onkologijo Onkološkega inštituta.

Rada bi se zahvalila tudi ekipi mladih raziskovalcev in zaposlenih na Oddelku za eksperimentalno onkologijo. Še posebna zahvala pa gre Tanji Blagus, za vso pomoč, spodbudo in potrpežljivost pri nastajanju magistrskega dela.

In seveda- največja zahvala mojim staršem, moji sestri, mojemu Igorju in vsem ostalim, ki ste verjeli vame, me vzpodbujali in mi stali ob strani.

