

## Testy predykcyjne promieniowrażliwości tkanek prawidłowych – stan obecny i perspektywy

Dorota Słonina

*Pomimo dużego wysiłku włożonego w zrozumienie mechanizmów odpowiedzialnych za wczesne i późne reakcje popromienne tkanek prawidłowych, porównanie komórkowej promieniowrażliwości z promieniowrażliwością kliniczną u chorych na nowotwory w większości badań nie przyniosło oczekiwanych rezultatów i testy promieniowrażliwości nie znalazły dotychczas zastosowania w praktyce klinicznej. W pracy omówiono wyniki badań z zastosowaniem różnych testów oceny promieniowrażliwości komórek prawidłowych i przedstawiono potencjalne przyczyny braku korelacji z promieniowrażliwością kliniczną. W świetle przedstawionego piśmiennictwa niewątpliwie najbardziej obiecującą formą oceny parametrów biologicznych komórek jest radiogenomika. W porównaniu do klasycznych metod oceny promieniowrażliwości na podstawie przeżycia komórek czy uszkodzeń DNA, radiogenomika, oparta głównie na technologii mikromacierzy, daje możliwość oceny wielu istotnych parametrów biologicznych, co z pewnością przyczyni się do lepszego zrozumienia patogenezы odczynów popromiennych i rozwoju strategii modulowania odpowiedzi tkanek prawidłowych.*

### Predictive assays for normal tissue radiosensitivity – the current state and the prospects

*Much effort has been made to understand the molecular mechanisms underlying acute and late normal tissue reactions after radiotherapy in cancer patients. However, the data published so far about the possibility of predicting the risk of normal tissue reactions on the basis of cellular radiosensitivity of respective patients appear to be very contradictory, and no clinically applicable assay has yet been established. The paper discusses the results of numerous studies applying different radiosensitivity tests and presents the potential causes of the lack of correlation with clinical radiosensitivity. Given the complexity of the molecular pathogenesis of the normal tissue response, studies involving clonogenic assays, assays of DNA damage, chromosome damage or involving single or a few genes, appeared not to be the proper step forward in this area of research. The very promising methodologies rapidly developed for high thorough put analysis seem to be gene expression profiling and single nucleotide polymorphisms (radiogenomics). With these methods, further radiobiological research on normal tissue reactions to radiation should lead to better understanding of their pathogenesis, and enable the development of strategies directed at intervention and modulation of the normal tissue response.*

**Słowa kluczowe:** testy promieniowrażliwości, chorzy na nowotwory, radiogenomika

**Key words:** radiosensitivity assay, cancer patients, radiogenomics

Schematy radioterapii stosowane od lat w leczeniu nowotworów złośliwych zakładają podawanie takiej dawki promieniowania, która stwarza dla indywidualnego chorego największą szansę miejscowego wyleczenia nowotworu i równocześnie wiąże się z najniższym ryzykiem popromiennego uszkodzenia zdrowych tkanek. W wyniku wielu badań klinicznych i radiobiologicznych rozpoznano czynniki kliniczne, które mają decydujące znaczenie w przewidywaniu nasilenia odczynów popromiennych. Wykazano mianowicie, że ryzyko wystąpienia nasilonych

wczesnych odczynów popromiennych u chorych po radioterapii zależy od tempa akumulacji dawki promieniowania, objętości napromienianych tkanek zdrowych i lokalizacji guza, natomiast nasilenie późnych odczynów popromiennych jest uzależnione od wysokości dawki całkowitej i frakcyjnej oraz objętości napromienianych tkanek krytycznych. Ponieważ objawy wczesnych odczynów popromiennych mogą być leczone farmakologicznie w trakcie radioterapii, początkowo sądzono, że ich nasilenie nie jest tak istotne, jak w przypadku późnych odczynów popromiennych. Obecnie wiadomo, że nasilone wczesne odczyny popromienne mogą być przyczyną wystąpienia w tej samej tkance tzw. następowych późnych odczynów popromiennych (*consequential late effects*).

Możliwe do przyjęcia ryzyko wystąpienia określonego typu odczynu popromiennego ustalano empirycznie na podstawie częstości obserwowanych wczesnych i późnych odczynów u chorych, bez uwzględniania różnic w ich osobniczej tolerancji. Liczne badania kliniczne wykazały jednak, że chorzy leczeni taką samą dawką promieniowania i według takiego samego schematu frakcjonacji różnią się stopniem nasilenia wczesnych i późnych odczynów popromiennych [1, 2], a także wykazują różną reakcję nowotworu na leczenie promieniowaniem.

Na podstawie badań klinicznych uważa się, że przyczyną około 30% różnic międzyosobniczych w tolerancji na promieniowanie mogą być niedokładności w określeniu warunków napromieniania. Na przykład, nawet w grupie chorych mających teoretycznie otrzymać takie samo leczenie (identyczna dawka całkowita i frakcyjna), z powodu różnic w budowie anatomicznej objętości napromienianych tkanek mogą być różne. Z tego samego powodu indywidualny rozkład dawki w tkance powoduje, że dawka całkowita oraz dawka frakcyjna np. na poziomie skóry czy tkanki podskórnej może być różna u różnych chorych. Krzywe przeżycia dla komórek tkanek późno reagujących na promieniowanie mają stromy przebieg, co oznacza, że nawet nieznaczne różnice w dawce frakcyjnej mają wpływ na ryzyko późnych odczynów popromiennych. Na indywidualne różnice w odpowiedzi popromiennej zdrowych tkanek mogą mieć wpływ także czynniki związane bezpośrednio z chorym, jak: wiek, palenie tytoniu, poziom hemoglobiny oraz współistniejące choroby, np. cukrzyca, nadeśnienie i miażdżycowe stwardnienie naczyń. Ponieważ jednak wpływ tych czynników jest niejednoznaczny i nie został potwierdzony w badaniach dużych grup chorych, uważa się, że ich udział w powstawaniu różnic w nasileniu odczynów popromiennych pomiędzy chorymi jest niewielki [1, 2]. Poznanie zatem innych niż kliniczne przyczyn różnic w tolerancji chorych na leczenie promieniowaniem powinno przyczynić się do lepszej identyfikacji chorych z większym lub mniejszym ryzykiem wystąpienia powikłań popromiennych i do dalszej optymalizacji leczenia napromienianiem.

Od wielu lat celem badań radiobiologicznych jest identyfikacja metod (testów predykcyjnych), które w warunkach *in vitro* oceniałyby promieniowrażliwość komórek prawidłowych i nowotworowych u indywidualnych chorych przed leczeniem [2, 3]. W przypadku komórek nowotworowych liczne badania wykazały, że ocena ich promieniowrażliwości jest niewystarczająca do przewidywania odpowiedzi nowotworu na leczenie. Odpowiedź ta zależy bowiem od wielu innych czynników, takich jak; frakcja komórek klonogennych, tempo proliferacji komórek, frakcja komórek hipoksycznych, ploidalność oraz ekspresja onkogenów czy genów supresorowych [4]. Ponieważ tkanki prawidłowe są wolne od hipoksji i innych efektów występujących w komórkach nowotworowych, wpływających na ich odpowiedź na radioterapię, testy oceniające promieniowrażliwość zdrowych komórek mogą dostarczyć bardziej wiarygodnych informacji o efektywności radioterapii i dlatego są przedmiotem niniejszego opracowania. Stwierdzenie dużej promie-

niowrażliwości komórek prawidłowych może wskazywać na większe ryzyko nasilonych odczynów popromiennych i w związku z tym powinno sugerować obniżenie dawki całkowitej lub zastosowanie frakcjonacji oszczędzającej tkanki prawidłowe (hiperfrakcjonacji) u tych osób. W przypadku chorych, których tkanki zdrowe nie wykazują dużej promieniowrażliwości (większość chorych), optymalizacja leczenia może polegać na podwyższeniu dawki na nowotwór, co mogłoby wpłynąć na częstość wyleczeń miejscowych bez nasilenia późnych odczynów popromiennych [2-4]. Warto wspomnieć, że badanie wpływu promieniowania jonizującego na komórki prawidłowe ma podstawowe znaczenie także dla ochrony radiologicznej.

### Genetyczne uwarunkowanie promieniowrażliwości

Obecnie uważa się, że 70% różnic międzyosobniczych w tolerancji na promieniowanie jest związanych z istnieniem indywidualnej wewnątrzkomórkowej promieniowrażliwości (*intrinsic cellular radiosensitivity*), uwarunkowanej genetycznie i częściowo zależnej od nieznanymi czynników epigenetycznych [2, 5]. Potwierdzeniem genetycznych uwarunkowań osobniczej promieniowrażliwości są znane dziedziczne zespoły chorobowe, takie jak: ataksja-teleangiektazja (AT – *ataxia telangiectasia*), zespół Nijmegen (NBS – *Nijmegen breakage syndrome*), niedokrwiłość Fanconiego (FA – *Fanconis anemia*), czy brak enzymu ligazy IV (*ligase IV deficiency*), z którymi jest związana nadwrażliwość na promieniowanie jonizujące i cytostatyki radiomimetyczne [6]. Przyczyną zachorowań są dziedziczne mutacje genów odpowiedzialnych za naprawę uszkodzeń DNA. Pełny zespół objawów klinicznych występuje tylko u homozygot, tj. nosicieli obu kopii zmutowanego genu. Ponieważ zachorowalność na te zespoły jest niezwykle rzadka (0,001-0,003% w populacji), chorzy ci stanowią bardzo małą i dobrze rozpoznawalną grupę wśród wszystkich nadmiernie promieniowrażliwych pacjentów [6]. Przedmiotem zainteresowania są zatem pozostali chorzy, u których nadmiernej promieniowrażliwości nie da się rozpoznać przed leczeniem, z powodu braku widocznych objawów klinicznych. U tych chorych wystąpią bardziej nasilone odczyny popromienne, ale mieszczące się jeszcze w granicach tolerancji [2, 4].

Początkowo przypuszczano, że grupę osób bez objawów wyżej wymienionych zespołów, a równocześnie wykazujących nadmierną promieniowrażliwość, mogą tworzyć przede wszystkim heterozygoty, czyli bezobjawowi nosiciele mutacji genów, będących podłożem zachorowań na te zespoły. Szacuje się, że około 1% osobników całej populacji jest heterozygotami mutacji genu *ATM* (*ataxia telangiectasia mutated*) [7], natomiast częstość heterozygotycznego nosicielstwa „słowiańskiej mutacji” (657del5) genu *NBS1* w Polsce została oszacowana na 0,5-1% w zależności od regionu [8]. Przede wszystkim wykazano, że ryzyko zachorowania na nowotwory złośliwe wśród nosicieli tych mutacji jest 2-4-krotnie większe. Szacuje się, że około 7-10% chorych na raka piersi jest nosicielami „specyficznych” mutacji (zmiany

sensu) genu *ATM* [7]. Natomiast z badań Steffena i wsp. [9, 10] populacji polskiej wynika, że 2% chorych na raka piersi, oraz około 4% chorych na czerniaka, lub chłoniaki nieziarnicze jest nosicielami „mutacji słowiańskiej” genu *NBS1*. Wyniki wielu badań potwierdzają, że komórki heterozygotycznych nosicieli mutacji genu *ATM* oraz *NBS1* są bardziej wrażliwe na promieniowanie jonizujące niż komórki ludzi nie obciążonych tym defektem. Ich promieniowrażliwość jest pośrednia pomiędzy homozygotami AT i NBS, a zdrowymi osobnikami [6]. Niestety, w większości badań nie stwierdzono zwiększonego heterozygotycznego nosicielstwa typowych mutacji genu *ATM* (prowadzących do powstania uciętej formy białka Atm) u chorych z nasilonymi odczynami popromiennymi [5]. Dopiero, kiedy zastosowano technikę denaturacyjnej, wysokosprawnej chromatografii cieczowej (DHPLC – *denaturing high-performance liquid chromatography*), która umożliwia detekcję niewielkich zmian w sekwencji nukleotydów (np. zamiana jednej zasady), Iannuzzi i wsp. [11] wykazali istotną korelację pomiędzy występowaniem mutacji zmiany sensu genu *ATM* i nasileniem późnych reakcji popromiennych u chorych na raka piersi, a Cesaretti i wsp. [12] wykryli takie mutacje u chorych na raka stercza z nasilonymi odczynami popromiennymi.

W ostatnich latach zaobserwowano, że w niektórych grupach chorych na nowotwory aż 40% osobników wykazuje większą chromosomalną promieniowrażliwość (ocenianą na podstawie uszkodzeń chromosomów) [przegląd w 13]. Dotyczy to przede wszystkim chorych na raka piersi, chociaż większą chromosomalną promieniowrażliwość, w porównaniu do grupy zdrowych dawców, stwierdzono również w grupie chorych na nowotwory dolnego odcinka przewodu pokarmowego (30% vs 9%), młodych chorych (<45 lat) na nowotwory głowy i szyi (38% vs 0%) i na inne nowotwory występujące w młodym wieku (44% vs 15%) [13]. Biorąc pod uwagę, że liczba heterozygotycznych nosicieli mutacji genu *ATM*, *NBS1* i innych zespołów genetycznych wśród chorych na nowotwory nie przekracza 10%, wywnioskowano, że tak częsta podwyższona chromosomalna promieniowrażliwość u chorych na wyżej wymienione nowotwory jest związana z mutacjami w genach o niskiej penetracji, kontrolujących naprawę DNA, a zatem wpływających na promieniowrażliwość i biorących udział w kancerogenezie [13]. Badania ostatnich lat przyczyniły się do znacznego postępu w zrozumieniu molekularnych podstaw promieniowrażliwości i na ich podstawie sugeruje się, że dysfunkcja wielu genów kodujących białka, włączone w naprawę DNA (Ku70, Ku80, Artemis, XRCC2, XRCC4, BRCA1, BRCA2), może przyczynić się do większej klinicznej promieniowrażliwości u ludzi [6]. Dotychczasowe badania wskazują jednak na brak wpływu mutacji w genach *BRCA1* i *BRCA2* na kliniczną promieniowrażliwość [5].

### Metody oceny promieniowrażliwości komórek

Odpowiedź komórek na promieniowanie jonizujące może być oceniana na poziomie komórki, chromosomu, DNA lub genu. Metody oceny promieniowrażliwości można

zatem podzielić na 4 grupy. Do pierwszej z nich należą testy oparte na przeżywalności komórek, między innymi test klonogeny SF2 (*surviving fraction at 2 Gy*), oceniający zdolność komórek do tworzenia kolonii po testowej dawce 2 Gy oraz testy oceniające żywotność komórek, np. na podstawie apoptozy. Drugą grupę stanowią testy oceniające promieniowrażliwość chromosomalną. Wśród nich są testy cytogenetyczne G0 i G2, badające aberracje chromosomowe w fazie G0 i chromatydowe w fazie G2, test mikrojądrowy (MN), metoda przedwczesnej kondensacji chromosomów (PCC – *premature chromosome condensation*) oraz metoda hybrydyzacji *in situ* (FISH – *fluorescence in situ hybridisation*). Trzecia grupa testów umożliwia ocenę uszkodzeń i zdolność do naprawy DNA. Należą do niej między innymi test kometowy i metoda elektroforezy w pulsującym polu elektrycznym (PFGE – *pulsed field gel electrophoresis*). Ostatnią grupę stanowią testy oceniające ekspresję genów (genomika) metodami immunohistochemicznymi lub biologii molekularnej, np. *Western blot*, *Northern blot*, mikromacierze DNA (*microarray assay*), badające polimorfizmy pojedynczych nukleotydów (SNPs – *single nucleotide polymorphisms*), czy oceniające ekspresję białek (proteomika) [4].

Testy klonogenne SF2 są powszechnie stosowane w pracach badawczych dla oceny promieniowrażliwości komórek. Dzięki zastosowaniu technik zwiększających ich czułość stało się możliwe dokładne badanie przeżycia komórek *in vitro*, nawet po bardzo niskich dawkach (0,05 Gy) promieniowania. Pomimo tego testy klonogenne nie znalazły zastosowania w praktyce klinicznej, głównie ze względu na duży nakład pracy oraz długi okres oczekiwania na wynik (w przypadku fibroblastów około 4 tygodni). Ponieważ z założenia test predykcyjny musi cechować czułość, powtarzalność, niezależna siła prognostyczna, a ponadto test taki powinien być szybki, prosty, tani i nieinwazyjny, większe szanse na zastosowanie w praktyce klinicznej mają testy nieklonogenne. Testy te polegają na ocenie promieniowrażliwości komórek w sposób pośredni, na podstawie uszkodzeń chromosomów (promieniowrażliwość chromosomalna), uszkodzeń i naprawy DNA oraz genów (promieniowrażliwość molekularna).

Zakładając, że promieniowrażliwość wewnątrzkomórkowa jest uwarunkowana genetycznie sądzono, że promieniowrażliwość komórek w hodowli będzie odzwierciedlać genetyczne właściwości osobnika, od którego pochodzi i że nadwrażliwość na promieniowanie obserwowana w jednym typie komórek prawidłowych będzie widoczna również w innym typie komórek. Niestety, chociaż w części badań doświadczalnych, obejmujących ocenę promieniowrażliwości dwóch rodzajów komórek (np. limfocytów i fibroblastów) od tych samych dawców, stwierdzono korelacje między komórkami, to brak takiego związku w większości badań [14, 15] sugeruje, że czynniki genetyczne mające wpływ na promieniowrażliwość ulegają ekspresji w różnym stopniu, w zależności od rodzaju komórek czy tkanek [1]. Tylko niektóre ulegają ekspresji w sposób widoczny w każdej tkance, jak to ma miejsce w przypadku chorych na zespoły genetyczne. Andreassen i wsp. [5] sugerują, że w dużym stopniu

odpowiedzialne za to są sztuczne warunki hodowli *in vitro*, odmienne dla różnych typów komórek (czas hodowli, rodzaj pożywki, koncentracja surowicy, dodatek czynników wzrostu), w których może dochodzić do ekspresji różnych genów, mających wpływ na promieniowrażliwość. Klinicznym potwierdzeniem tego faktu jest brak związku pomiędzy ryzykiem wystąpienia dwóch późnych odczynów popromiennych (teleangiektazji i zwłóknienia) [16, 17], czy późnego i wczesnego odczynu (zwłóknienia i rumienia lub złuszczenia na mokro) [17] oraz istotna korelacja dla tego samego odczynu popromiennego, występującego w różnych miejscach [16]. Niezwykle istotną kwestią oprócz wyboru metody jest zatem wybór rodzaju komórek prawidłowych, których promieniowrażliwość *in vitro* może korelować z promieniowrażliwością kliniczną.

Prawidłowymi komórkami z wyboru do oceny promieniowrażliwości są najczęściej limfocyty krwi obwodowej lub fibroblasty skóry. Limfocyty krwi obwodowej są przede wszystkim wykorzystywane w biodozymetrii do ustalania dawki pochłoniętej przy ekspozycji całego ciała. Po pierwsze, dlatego, że wraz z krwią krążą po całym ciele i w zasadzie nie dzielą się w organizmie (tylko w hodowli *in vitro*), po drugie, dlatego, że niektóre ich rodzaje są długożyjące. Przyjmuje się, że połowiczny okres życia limfocytów T wynosi około 3,5 roku. Na tej podstawie można oszacować wysokość dawki nawet wiele lat po napromienianiu. Limfocyty wydają się szczególnie atrakcyjne do pomiaru promieniowrażliwości ze względu na łatwość ich pozyskania od chorych i hodowli *in vitro*, która nie powoduje dodatkowego uszkodzenia chromosomów, oraz możliwość uzyskania wyników w krótkim czasie, co jest podstawowym wymaganiem stawianym testom predykcyjnym.

W porównaniu do limfocytów ocena promieniowrażliwości fibroblastów jest dużo bardziej czasochłonna. Ich pozyskanie wymaga wykonania biopsji, zwykle w znieczuleniu miejscowym. Wiąże się także z koniecznością wyprowadzenia linii w celu uzyskania odpowiedniej liczby

komórek do przeprowadzenia badań, co wymaga dłuższej hodowli *in vitro*, a więc wynik w większym stopniu zależy od rodzaju pożywki, koncentracji surowicy czy czynników wzrostu. Ponieważ jednak fibroblasty są komórkami tarczowymi tkanki łącznej, odpowiedzialnymi za powstanie późnego odczynu popromiennego, ich wybór wydaje się bardziej uzasadniony do przewidywania późnych reakcji popromiennych, np. zwłóknienia skóry [17, 18].

W myśl sugestii, aby prognozować nasilenie odczynów popromiennych na podstawie promieniowrażliwości komórek tarczowych odpowiedzialnych za te odczyny, Geara i wsp. [17] zaproponowali ocenę promieniowrażliwości keratynocytów (komórek warstwy przypodstawnej naskórka) do przewidywania nasilenia wczesnych odczynów popromiennych skóry lub błony śluzowej. Chociaż utrzymanie pierwotnych keratynocytów w hodowli *in vitro* jest trudne ze względu na ich szybkie różnicowanie się i starzenie, możliwość pozyskania keratynocytów i fibroblastów z jednego kawałka skóry oraz prognozowanie o wczesnych i późnych odczynach popromiennych na podstawie ich promieniowrażliwości jest kuszącą propozycją. Oprócz wspomnianych autorów próbę oceny promieniowrażliwości keratynocytów od chorych na nowotwory podjęli tylko Kiltie i wsp. [19] oraz Słonina i wsp. [20].

#### Związek pomiędzy promieniowrażliwością ocenianą *in vitro* i promieniowrażliwością kliniczną

Chociaż liczne badania bezspornie potwierdziły istnienie różnic międzypersonalnych w promieniowrażliwości fibroblastów [20-25], limfocytów [14, 15, 22, 26] i keratynocytów [19, 20], wyniki badań oceniających związek pomiędzy indywidualną promieniowrażliwością i odpowiedzią tkanek prawidłowych na napromienianie u chorych na nowotwory są niejednoznaczne (przegląd w Tabeli I). Istotne korelacje pomiędzy promieniowrażliwością fibroblastów (ocenianą testem SF2) i późnymi odczynami

Tab. 1. Związek pomiędzy promieniowrażliwością *in vitro* komórek prawidłowych i odczynami popromiennymi u chorych na nowotwory

Autor [poz. piśm.]	Liczba chorych	Typ nowotworu	Rodzaj komórek	Parametr <i>in vitro</i>	Odczyny popromienne	Istotność statyst.
Begg i wsp. [21]	24	rak piersi	fibroblasty	SF2	rumień	nie
Geara i wsp. [22]	20	teren głowy i szyi	fibroblasty	SF2	max. wczesne	nie
	21	teren głowy i szyi	limfocyty	SF2	max. późne max. wczesne max. późne	tak nie nie
Brock i wsp. [23]	22	rak piersi	fibroblasty	SF2	rumień telangiektazje	nie nie
Jones i wsp. [38]	16	rak piersi	limfocyty	dicentryki	późne	nie
Johansen i wsp. [17]	31	rak piersi	fibroblasty	SF3,5	rumień zwłóknienie	nie tak
Neubauer i wsp. [37]	66	gl. rak piersi	limfocyty	chromosomowe reorganizacje	max. wczesne i późne	tak*
Russel i wsp. [24]	79	rak piersi	fibroblasty	SF2	zwłóknienie	nie
Johansen i wsp. [31]	36	rak piersi	fibroblasty	mikrojądra	zwłóknienie	nie



Autor [poz. piśm.]	Liczba chorych	Typ nowotworu	Rodzaj komórek	Parametr <i>in vitro</i>	Odczyny popromienne	Istotność statyst.
Nachtrab i wsp. [32]	27	gł. rak piersi	fibroblasty	mikrojądra	wczesne późne	tak* tak*
Rached i wsp. [39]	30	różne	limfocyty	mikrojądra	wczesne	nie
Rudat i wsp. [28]	25	teren głowy i szyi	fibroblasty	SF2	późne	nie
Kiltie i wsp. [19]	32	rak piersi	keratynocyty	reszkowe DSB	wczesne późne	nie nie
Barber i wsp. [26]	19 – 123	rak piersi	limfocyty	aberracje chromatydowe mikrojądra	wczesne późne wczesne późne	tak nie nie nie
Stonina i wsp. [14]	31	rak szyjki macicy i głowy i szyi	limfocyty	mikrojądra	max. wczesne max. późne	nie nie
	8	rak szyjki macicy	fibroblasty	mikrojądra	max. wczesne max. późne	nie nie
Peacock i wsp. [25]	39+65	rak piersi	fibroblasty	D <sub>0,01</sub>	zwłóknienie	nie
Oppitz i wsp. [27]	88	gł. rak piersi	fibroblasty	SF2	wczesne późne	tak nie
Borgman i wsp. [29]	16	teren głowy i szyi	fibroblasty limfocyty	SF2, reszkowe DSB aberracje chromosomowe	późne późne	nie tak*
Dickson i wsp. [30]	88	rak piersi	fibroblasty	reszkowe DSB	późne	nie
Ruiz de Almodovar i wsp. [42]	189	rak piersi	limfocyty	początkowe DSB	wczesne	tak
Lee i wsp. [36]	38	rak prostaty	limfocyty	mikrojądra	wczesne i późne	tak
Widel i wsp. [34]	55	rak szyjki macicy	limfocyty	mikrojądra	max. wczesne max. późne	tak tak
Hoeller i wsp. [33]	86	rak piersi	limfocyty	aberracje chromosomowe	zwłóknienie	tak
Twardella i wsp. [40]	113	rak piersi	limfocyty	początkowe i reszkowe DSB	wczesne	nie
Rieger i wsp. [45]	14	różne	limfocyty	ekspresja genów	wczesne	tak
El-Awady i wsp. [41]	25	rak piersi	fibroblasty	SF2, reszkowe DSB	wczesne	nie
Sprung i wsp. [15]	25	rak piersi	limfocyty fibroblasty	mikrojądra mikrojądra	wczesne późne wczesne późne	tak* nie* nie* nie*
De Ruyck i wsp. [35]	62	rak szyjki macicy i endometrium	limfocyty	aberracje chromatydowe, SNPs	późne późne	tak tak
Chang-Claude i wsp. [48]	104	rak piersi	limfocyty	SNPs	wczesne	tak
Andreassen i wsp. [50]	120	rak piersi	fibroblasty	SNPs	zwłóknienie	nie
Hoeller i wsp. [49]	69	rak piersi	limfocyty	SNPs	zwłóknienie	tak
Svensson i wsp. [46]	21 + 17	rak prostaty	limfocyty	ekspresja genów	późne	tak
Stonina i wsp. [dane niepublikowane]	32	rak szyjki macicy	fibroblasty	mikrojądra	wczesne późne	nie nie
	27	rak szyjki macicy	keratynocyty	mikrojądra	wczesne późne	nie nie

DSB – dwuniciowa przerwa DNA

SNPs – polimorfizmy pojedynczych nukleotydów

\* – nie oceniono istotności korelacji, wykazano tylko większą promieniowrażliwość komórek od chorych z nasilonymi odczynami popromiennymi, w porównaniu do grupy bez odczynów

popromiennymi skóry u chorych na nowotwory głowy i szyi wykazali Geara i wsp. [22], natomiast u chorych na raka piersi Johansen i wsp. [17]. Russell i wsp. [24] obserwowali wprawdzie duże zróżnicowanie w promieniowrażliwości fibroblastów 79 chorych na raka piersi leczonych napromienianiem, ale nie stwierdzili istotnych korelacji pomiędzy promieniowrażliwością fibroblastów i późnym odczynem popromiennym (zwłóknienie). Podobny wynik, braku związku, uzyskał Peacock i wsp. [25], Oppitz i wsp. [27], dla dużych grup chorych na raka piersi, a także Rudat i wsp. [28] i Borgman i wsp. [29] u chorych na nowotwory terenu głowy i szyi. Dickson i wsp. [30], oceniając promieniowrażliwość fibroblastów (testem PFGE) chorych na raka piersi, także nie wykazali korelacji z późnymi odczynami popromiennymi. Również Słonina i wsp. [14] oraz inni badacze [31, 32] wykazali brak związku pomiędzy promieniowrażliwością chromosomalną fibroblastów i promieniowrażliwością kliniczną u chorych na raka szyjki macicy lub raka piersi.

Badania związku pomiędzy promieniowrażliwością limfocytów i późnymi odczynami popromiennymi u chorych na nowotwory także nie dają jednoznacznej odpowiedzi. W przeciwieństwie do fibroblastów promieniowrażliwość limfocytów najczęściej ocenia się testami nieklonogennymi, badającymi uszkodzenia chromosomowe (promieniowrażliwość chromosomalna). Istotną korelację u chorych na nowotwory głowy i szyi wykazała Borgman i wsp. [29], u chorych na raka piersi Hoeller i wsp. [33], u chorych na raka szyjki macicy Widel i wsp. [34] oraz De Ruyck i wsp. [35], a u chorych na raka stercza Lee i wsp. [36]. Neubauer i wsp. [37] wykazali wprawdzie, że limfocyty izolowane od chorych na nowotwory, u których wystąpiły nasilone reakcje po radioterapii, były bardziej promieniowrażliwe od limfocytów pobranych od chorych bez odczynów popromiennych, ale nie oceniali istotności tego związku. Brak istotnych korelacji pomiędzy promieniowrażliwością chromosomalną limfocytów i późnymi odczynami popromiennymi u chorych na raka piersi wykazali natomiast Jones i wsp. [38], Barber i wsp. [26] oraz Sprung i wsp. [15], u chorych na nowotwory terenu głowy i szyi oraz raka szyjki macicy Rached i wsp. [39] oraz Słonina i wsp. [14], a u chorych na nowotwory głowy i szyi testem SF2 Geara i wsp. [22].

Znane są tylko dwie prace dotyczące związku promieniowrażliwości keratynocytów z promieniowrażliwością kliniczną u chorych na nowotwory. Kiltie i wsp. [19] wykazali brak zależności pomiędzy promieniowrażliwością keratynocytów, ocenianą testem PFGE i późnymi odczynami popromiennymi dla grupy 32 chorych na raka piersi. Natomiast Słonina i wsp. (dane niepublikowane) stwierdzili brak związku pomiędzy indukcją mikrojąder w keratynocytach i późnymi odczynami popromiennymi u 27 chorych na raka szyjki macicy.

Wyniki większości badań wykazują brak związku pomiędzy promieniowrażliwością komórek prawidłowych, ocenianą *in vitro* i wczesnymi odczynami popromiennymi [14, 17, 21-23, 40, 41], chociaż w kilku badaniach takie korelacje znaleziono [26, 27, 34, 36, 42].

Pomimo ogromnego wysiłku włożonego w zrozumienie mechanizmów odpowiedzialnych za wczesne i późne reakcje popromienne, porównanie komórkowej promieniowrażliwości z odczynami popromiennymi w większości badań nie przyniosło oczekiwanych rezultatów i testy promieniowrażliwości nie znalazły dotychczas zastosowania w praktyce klinicznej. W wielu przypadkach przyczyną braku korelacji z pewnością było włączenie do badanej grupy chorych o różnym stopniu zaawansowania choroby, u których stosowano różne schematy leczenia napromienianiem, a także wspólne analizowanie różnych odczynów popromiennych, obserwowanych w różnym czasie po radioterapii. Andreassen i wsp. [5] sugerują natomiast, że sztuczne warunki *in vitro*, w jakich przeprowadza się testy promieniowrażliwości, mogą indukować ekspresję takich genów, które mają wpływ na promieniowrażliwość komórek *in vitro*, natomiast nie mają wpływu na promieniowrażliwość kliniczną. Na tej podstawie można zaryzykować pesymistyczne stwierdzenie, że większość testów promieniowrażliwości *in vitro* stosowanych do tej pory może nigdy nie uzyskać dostatecznej siły predykcyjnej.

Wiarygodne wyjaśnienie braku korelacji promieniowrażliwości komórkowej z promieniowrażliwością kliniczną przedstawił Dikomey i wsp. [43]. Podstawą do tego była praca Junga i wsp. [44], którzy, analizując kinetykę powikłań popromiennych w dużych grupach chorych, wykazali, że ryzykiem wystąpienia nasilonych późnych odczynów popromiennych zagrożeni są wszyscy chorzy po radioterapii. To oznacza, że chorzy, u których wystąpiły powikłania popromienne, niekoniecznie muszą charakteryzować się nadmierną promieniowrażliwością komórkową i wyjaśnia widoczny w wielu badaniach brak istotnych różnic w promieniowrażliwości komórkowej pomiędzy grupami chorych, u których wystąpiły nasilone późne odczyny popromienne i bez odczynów [24-26, 28]. W związku z powyższym Dikomey i wsp. [43] założyli, że chociaż ryzyko wystąpienia powikłań popromiennych istnieje dla wszystkich chorych, to będzie ono różne dla grup chorych wyodrębnionych na podstawie ich komórkowej promieniowrażliwości, większe w przypadku grupy promieniowrażliwych chorych i mniejsze w przypadku promienioopornych chorych. Dlatego autorzy ci zaproponowali nową metodę analizy danych uzyskanych z testów promieniowrażliwości i korelacji z odczynami popromiennymi. Według nich istotne korelacje pomiędzy promieniowrażliwością komórkową i promieniowrażliwością kliniczną można uzyskać tylko wtedy, gdy ryzyko późnych odczynów popromiennych analizuje się oddzielnie dla każdej grupy chorych, wyodrębnionej na podstawie ich komórkowej promieniowrażliwości, czyli oddzielnie dla grupy osób o wysokiej, średniej i niskiej promieniowrażliwości. Wstępne wyniki badań potwierdzają słuszność powyższych założeń. Hoeller i wsp. [33] wykazali 2,3-krotnie większe roczne ryzyko wystąpienia zwłóknienia skóry u chorych na raka piersi z dużą chromosomalną promieniowrażliwością, w porównaniu do pozostałych chorych, a De Ruyck i wsp. [35] wykazali 9,2-krotnie większe roczne ryzyko późnych powikłań popromiennych dla grupy chorych na raka szyjki macicy

z dużą chromosomalną promieniowrażliwością. Wydaje się, że wyniki tych badań mogą skłonić niektórych badaczy do powtórnej analizy swoich danych, z uwzględnieniem podziału na grupy chorych według ich komórkowej promieniowrażliwości. Należy jednak pamiętać, że proponowany przez Dikomeya i wsp. [43] typ analizy wymaga włączenia do badań bardzo dużej liczby chorych, oraz że w tym typie analizy testy promieniowrażliwości służą do oceny ryzyka powikłań dla poszczególnych grup chorych i na jej podstawie nie można zidentyfikować chorego, u którego wystąpi nasilony odczyn popromienny.

### Nowe wyzwania – radiogenomika

Najnowszy kierunek badań nad promieniowrażliwością opiera się na założeniu, że kliniczna promieniowrażliwość tkanek prawidłowych jest złożoną cechą (*complex trait*) i że różnice międzyosobnicze w nasileniu odczynów popromiennych są uwarunkowane osobniczą zmiennością genetyczną w wielu genach [5]. Do rozwoju tego kierunku badań, któremu nadano nazwę radiogenomika (*radiogenomics*) [3, 5], przyczynił się duży postęp w technikach biologii molekularnej, przede wszystkim rozwój technologii mikromacierzy DNA (*microarray assay*), dzięki którym możliwa jest ocena ekspresji wielu tysięcy genów równocześnie. Jest kilka kategorii genów, których zmienność genetyczna może mieć wpływ na promieniowrażliwość kliniczną. Do tej pory zidentyfikowano około 130 genów włączonych w naprawę uszkodzeń DNA, kontrolę cyklu komórkowego i apoptozę. Oprócz tego wpływ na promieniowrażliwość mają geny cytokin związanych z procesem zapalnym i zwłóknieniem popromiennym (*TGF-β*), oraz geny kodujące enzymy-antyutleniacze (katalaza, dysmutaza ponadtlenkowa (*SOD – superoxid dismutase*), peroksydaza glutationu), które wyłapują reaktywne rodniki tlenowe (*ROS – reactive oxygen species*). Zwiększoną aktywność enzymatyczną manganowej dysmutazy ponadtlenkowej (*MnSOD*) wykazano w ludzkich limfocytach po napromienianiu [5]. Także czynniki wpływające na metabolizm i homeostazę mogą mieć udział w klinicznej promieniowrażliwości.

Wstępne badania ekspresji genów w tkankach prawidłowych (limfocytach lub fibroblastach) chorych na nowotwory, mające na celu predykcję odczynów popromiennych, są zachęcające (Tab. I). Rieger i wsp. [45] wykazali korelacje pomiędzy ekspresją 24 genów w liniach limfoblastów 14 chorych na nowotwory po napromienianiu *in vitro* i wczesnymi odczynami popromiennymi. Svensson i wsp. [46] wykazali natomiast istotny związek pomiędzy nasileniem późnych odczynów popromiennych w grupie 38 chorych na raka stercza i łączną ekspresją wielu genów (*gene sets*) w limfocytach napromienianych *in vitro*. Co ciekawe, w obydwu badaniach wykazano korelacje z ekspresją podobnych grup genów (apoptozy, metabolizmu białek i ubikwitynacji, przekazywania sygnałów). Zachęcające są także wyniki badań Quaruby i wsp. [47], którzy wykorzystali mikromacierze DNA do zbadania ekspresji cytokin (*cytokin gene array*) w fibroblastach chorych na raka piersi i wykazali większą eks-

presję cytokin w komórkach chorych z nasilonym późnym odczynem popromiennym (zwłóknieniem), niż u chorych bez odczynów.

Z projektu badania genomu ludzkiego wiadomo, że istnieją duże różnice genetyczne pomiędzy osobnikami. Za około 90% naturalnie występujących różnic w sekwencji DNA genomu ludzkiego są odpowiedzialne polimorfizmy pojedynczych nukleotydów (SNPs) [5]. Uważa się, że SNPs są obecne w jednej na 1000 par zasad, co daje liczbę kilku milionów SNPs w genomie ludzkim. To dało podstawę do sugestii, że SNPs w genach związanych z odpowiedzią biologiczną na promieniowanie jonizujące mogą mieć wpływ na kliniczną promieniowrażliwość [5]. Zaletą badań polimorfizmów jest to, że występują we wszystkich tkankach i mogą być badane nawet w łatwo dostępnych limfocytach.

Wstępne badania sugerują, że występowanie polimorficznych alleli genów związanych z promieniowrażliwością może być przyczyną różnic międzyosobniczych w nasileniu odczynów popromiennych [przegląd w 5]. De Ruyck i wsp. [35] znaleźli korelacje pomiędzy promieniowrażliwością kliniczną chorych na nowotwory ginekologiczne i polimorfizmami genów naprawy DNA; *XRCC1* (mniejsze ryzyko późnego odczynu jelit), *XRCC3* (większe ryzyko późnego odczynu jelit) w limfocytach, natomiast Chang-Claude i wsp. [48] zaobserwowali mniejsze ryzyko wystąpienia nasilonego wczesnego odczynu u chorych na raka piersi (z prawidłową masą ciała), z równoczesnymi polimorfizmami w genach *XRCC1* i *APEX*. Hoeller i wsp. [49] również w badaniach na limfocytach wykazali związek pomiędzy promieniowrażliwością kliniczną chorych na raka piersi a polimorfizmami genów *TGFβ1* (większe ryzyko zwłóknienia), *ATM* i *SOD2* (mniejsze ryzyko zwłóknienia). Andreassen i wsp. [50] chociaż początkowo zaobserwowali związek pomiędzy polimorfizmami genów *TGFβ1*, *XRCC1*, *XRCC3*, *SOD2* w fibroblastach a zwłóknieniem, to w ostatnich badaniach na większej grupie chorych na raka piersi stwierdzili brak takiego związku.

O dużym zainteresowaniu rolę polimorfizmów (badanych zarówno w limfocytach, jak i fibroblastach) w promieniowrażliwości klinicznej świadczą dwa duże wielośrodkowe badania prowadzone w Europie; projekty „GENEPI” i „RAPPER” oraz amerykańsko-europejski projekt „Gene-PARE”, mające na celu ocenę występowania polimorfizmów w wielu genach związanych z promieniowrażliwością u 2-4 tys. chorych na nowotwory. Tak duża liczba chorych włączonych do badań jest niezbędna z uwagi na opinię, że różnice w promieniowrażliwości klinicznej mogą być silnie uwarunkowane rzadko występującymi polimorfizmami, albo uwarunkowane licznymi polimorfizmami, z których każdy ma nieznaczny wpływ na promieniowrażliwość kliniczną. Podstawowym zadaniem w tych badaniach jest wybór chorych i zgromadzenie o nich jak największej ilości informacji. Przede wszystkim chorzy włączeni do badań powinni być leczeni w podobny sposób i mieć bardzo dobrze przygotowaną dozymetrię tak, aby znana była dokładna dawka promieniowania pochłonięta przez tkanki prawidłowe oraz obję-

tość napromienionej tkanki krytycznej, w których ocenia się nasilenie odczynu popromiennego. Biorąc pod uwagę, że pewne geny mogą ulegać ekspresji tylko w niektórych tkankach lub odpowiadać tylko za pewne typy reakcji popromiennej, w badanej grupie chorych niezbędna jest ocena nasilenia odczynów popromiennych w wielu tkankach prawidłowych (różne *clinical endpoints*), ale tych samych dla każdego chorego. Niezwykle istotna jest częsta, regularna i precyzyjna ocena nasilenia wczesnych odczynów popromiennych, z uwagi na ich rolę w następnych późnych odczynach popromiennych w pewnych tkankach prawidłowych. Chociaż tak zaplanowane badania wymagają wieloletniej, ogromnej i ścisłej współpracy lekarzy, biologów i fizyków, wydaje się, że jest to jedyna droga do poznania genetycznych czynników warunkujących kliniczną promieniowrażliwość. Dopiero na tej podstawie i dysponując testami o dużej sile predykcyjnej będzie można uzyskać odpowiedź na pytanie, czy znajomość indywidualnego profilu genetycznego przyczyni się i w jakim stopniu do precyzyjniejszego przewidywania odpowiedzi tkanek prawidłowych i optymalizowania leczenia promieniowaniem u chorych na nowotwory.

Podsumowując, w świetle przedstawionego piśmiennictwa, w którym notujemy sprzeczne informacje na temat tych samych parametrów promieniowrażliwości, w chwili obecnej żaden test oceny promieniowrażliwości nie może być rekomendowany do zastosowania w praktyce klinicznej. W dalszym ciągu zatem to czynniki kliniczne mają decydujące znaczenie w przewidywaniu odpowiedzi tkanek prawidłowych u chorych na nowotwory. Niewątpliwie najbardziej obiecującą formą oceny parametrów biologicznych komórek jest radiogenomika, a w przyszłości także proteomika i transkryptomika. W porównaniu do klasycznych metod oceny promieniowrażliwości na podstawie przeżycia komórek czy uszkodzeń DNA, radiogenomika, oparta głównie na technologii mikromacierzy, daje możliwość oceny wielu istotnych parametrów biologicznych, co z pewnością przyczyni się do lepszego zrozumienia patogenezy odczynów popromiennych i rozwoju strategii modulowania odpowiedzi tkanek prawidłowych.

#### Podziękowania

Dziękuję Pani Prof. Annie Gasińskiej i Panu Prof. Janowi Skołyszewskiemu za krytyczne uwagi i dyskusję.

#### Dr Dorota Słonina

Zakład Radiobiologii Klinicznej  
Centrum Onkologii – Instytut im. Marii Skłodowskiej-Curie  
ul. Garncarska 11, 31-115 Kraków  
e-mail: zslonin@cyf-kr.edu.pl

#### Piśmiennictwo

- Bentzen SM, Overgaard J. Patient-to-patient variability in the expression of radiation-induced normal tissue injury. *Semin Radiat Oncol* 1994; 4: 68-80.
- Burnet NG, Johansen J, Turesson I i wsp. Describing patients' normal tissue reactions: concerning the possibility of individualising radiotherapy dose prescriptions based on potential predictive assays of normal tissue radiosensitivity. *Int J Cancer (Pred Oncol)* 1998; 79: 606-13.
- Russel NS, Begg AC. Radiotherapy and oncology: Predictive assays for normal tissue damage. *Radiother Oncol* 2002; 64: 125-9.
- Gasińska A. *Biologiczne podstawy radioterapii*. Wyd. 1. Kraków: Wydawnictwo Jak; 2001.
- Andreassen CN. Can risk of radiotherapy-induced normal tissue complications be predicted from genetic profiles? *Acta Oncol* 2005; 44: 801-15.
- Gatti RA. The inherited basis of human radiosensitivity. *Acta Oncol* 2001; 40: 702-11.
- Gatti RA, Tward A, Concannon P. Cancer risk in ATM heterozygotes: A model of phenotypic and mechanistic differences between missense and truncating mutations. *Mol Genet Metab* 1999; 68: 419-23.
- Ziółkowska I, Mosor M, Nowak J. Regional distribution of heterozygous 657del5 mutation carriers of the *NBS1* gene in the Wielkopolska province (Poland). *J Appl Genet* 2006; 47: 269-72.
- Steffen J, Varon R, Mosor M i wsp. Increased cancer risk of heterozygotes with *NBS1* germline mutations in Poland. *Int J Cancer* 2004; 111: 67-71.
- Steffen J, Nowakowska D, Nawińska A i wsp. Germline mutations 657del5 of the *NBS1* gene contribute significantly to the incidence of breast cancer in Central Poland. *Int J Cancer* 2006; 119: 472-5.
- Iannuzzi CM, Antecio DP, Green S i wsp. ATM mutations in female breast cancer patients predict for an increase in radiation-induced late effects. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 2002; 52: 606-13.
- Cesaretti JA, Stock RG, Lehrer S i wsp. ATM sequence variants are predictive of adverse radiotherapy response among patients treated for prostate cancer. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 2005; 61: 196-202.
- Scott D. Chromosomal radiosensitivity and low penetrance predisposition to cancer. *Cytogenet Genome Res* 2004; 104: 365-70.
- Slonina D, Klimek M, Szpytma T, Gasińska A. Comparison of the radiosensitivity of normal-tissue cells with normal-tissue reactions after radiotherapy. *Int J Radiat Biol* 2000; 76: 1255-64.
- Sprung CN, Chao M, Leong T, McKay MJ. Chromosomal radiosensitivity in two cell lineages derived from clinically radiosensitive cancer patients. *Clin Cancer Res* 2005; 11: 6352-8.
- Bentzen SM, Overgaard J, Overgaard M. Clinical correlations between late normal tissue endpoints after radiotherapy: Implications for predictive assays of radiosensitivity. *Eur J Cancer* 1993; 29A: 1373-6.
- Johansen J, Bentzen SM, Overgaard J, Overgaard M. Relationship between the *in vitro* radiosensitivity of skin fibroblasts and the expression of subcutaneous fibrosis, telangiectasia and skin erythema after radiotherapy. *Radiother Oncol* 1996; 40: 101-9.
- Geara FB, Peters LJ, Ang KK i wsp. Radiosensitivity measurement of keratinocytes and fibroblasts from radiotherapy patients. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 1992; 24: 287-93.
- Kiltie AE, Barber JBP, Swindell R i wsp. Lack of correlation between residual radiation-induced DNA damage in keratinocytes assayed directly from skin, and late radiotherapy reactions in breast cancer patients. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 1999; 43: 481-7.
- Slonina D, Biesaga B, Urbański K, Kojas Z. Low-dose radiation response of primary keratinocytes and fibroblasts from patients with cervix cancer. *Radiat Res* 2007; 167: 251-9.
- Begg AC, Russell NS, Knaken H i wsp. Lack of correlation of human fibroblast radiosensitivity *in vitro* with early skin reactions in patients undergoing radiotherapy. *Int J Radiat Biol* 1993; 64: 393-405.
- Geara FB, Peters LJ, Ang KK i wsp. Prospective comparison of *in vitro* normal cell radiosensitivity and normal tissue reactions in radiotherapy patients. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 1993; 27: 1173-9.
- Brock WA, Tucker SL, Geara FB i wsp. Fibroblasts radiosensitivity versus acute and late normal skin responses in patients treated for breast cancer. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 1995; 32: 1371-9.
- Russel NS, Grummels A, Hart AAM i wsp. Low predictive value of intrinsic fibroblast radiosensitivity for fibrosis development following radiotherapy for breast cancer. *Int J Radiat Biol* 1998; 73: 661-70.
- Peacock J, Ashon A, Bliss J i wsp. Cellular radiosensitivity and complication risk after curative radiotherapy. *Radiother Oncol* 2000; 55: 173-8.
- Barber JBP, Burrill W, Spreadborough AR i wsp. Relationship between *in vitro* chromosomal radiosensitivity of peripheral blood lymphocytes and



- the expression of normal tissue damage following radiotherapy for breast cancer. *Radiother Oncol* 2000; 55: 179-86.
27. Oppitz U, Baier K, Wulf J i wsp. The *in vitro* colony assay: A predictor of clinical outcome. *Int J Radiat Biol* 2001; 77: 105-10.
  28. Rudat V, Dietz A, Nollert J i wsp. Acute and late toxicity, tumour control and intrinsic radiosensitivity of primary fibroblasts in vitro of patients with advanced head and neck cancer after concomitant boost radiochemotherapy. *Radiother Oncol* 1999; 53: 233-45.
  29. Borgmann K, Röper B, El-Awady RA i wsp. Indicators of late tissue response after radiotherapy for head and neck cancer: Fibroblasts, lymphocytes, genetics, DNA repair and chromosome aberrations. *Radiother Oncol* 2002; 64: 141-52.
  30. Dickson J, Magee B, Stewart A, West CML. Relationship between residual radiation-induced DNA double-strand breaks in cultured fibroblasts and late radiation reactions: a comparison of training and validation cohorts of breast cancer patients. *Radiother Oncol* 2002; 62: 321-6.
  31. Johansen J, Streffer C, Fuhrmann C i wsp. Radiosensitivity of normal fibroblasts from breast cancer patients assessed by the micronucleus and colony assays. *Int J Radiat Biol* 1998; 73: 671-8.
  32. Nachtrab U, Oppitz U, Flentje M, Stopper H. Radiation-induced micronucleus formation in human skin fibroblasts of patients showing severe and normal tissue damage after radiotherapy. *Int J Radiat Biol* 1998; 73: 279-87.
  33. Hoeller U, Borgmann K, Bonacker M i wsp. Individual radiosensitivity measured with lymphocytes may be used to predict the risk of fibrosis after radiotherapy for breast cancer. *Radiother Oncol* 2003; 69: 137-44.
  34. Widel M, Jędrus S, Łukaszczyk B i wsp. Radiation-induced micronucleus frequency in peripheral blood lymphocytes is correlated with normal tissue damage in patients with cervical carcinoma undergoing radiotherapy. *Radiat Res* 2003; 159: 713-21.
  35. De Ruyck K, Van Eijkeren M, Claes K i wsp. Radiation-induced damage to normal tissues after radiotherapy in patients treated for gynecologic tumors: association with single nucleotide polymorphisms in *XRCC1*, *XRCC3*, and *OGG1* genes and *in vitro* chromosomal radiosensitivity in lymphocytes. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 2005; 62: 1140-9.
  36. Lee TK, Allison RR, O'Brien KF i wsp. Lymphocyte radiosensitivity correlated with pelvic radiotherapy morbidity. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 2003; 57: 222-9.
  37. Neubauer S, Dunst J, Gebhart E. The impact of complex chromosomal rearrangements on the detection of radiosensitivity in cancer patients. *Radiother Oncol* 1997; 43: 189-95.
  38. Jones LA, Scott D, Cowan R, Roberts SA. Abnormal radiosensitivity of lymphocytes from breast cancer patients with excessive normal tissue damage after radiotherapy: Chromosome aberrations after low dose-rate irradiation. *Int J Radiat Biol* 1995; 67: 519-28.
  39. Rached E, Schindler R, Beer KT i wsp. No predictive value of the micronucleus assay for patients with severe acute reaction of normal tissue after radiotherapy. *Eur J Cancer* 1998; 34: 378-83.
  40. Twardella D, Popanda O, Helmbold I i wsp. Personal characteristics, therapy modalities and individual DNA repair capacity as predictive factors of acute skin toxicity in an unselected cohort of breast cancer patients receiving radiotherapy. *Radiother Oncol* 2003; 69: 145-53.
  41. El-Awady RA, Mahmoud M, Saleh EM i wsp. No correlation between radiosensitivity or double-strand break repair capacity of normal fibroblasts and acute normal tissue reaction after radiotherapy of breast cancer patients. *Int J Radiat Biol* 2005; 81: 501-8.
  42. Ruiz de Almodóvar JM, Guirado D, Núñez MI i wsp. Individualization of radiotherapy in breast cancer patients: possible usefulness of a DNA damage assay to measure normal cell radiosensitivity. *Radiother Oncol* 2002; 62: 327-33.
  43. Dikomey E, Borgmann K, Peacock J i wsp. Why recent studies relating normal tissue response to individual radiosensitivity might have failed and how new studies should be performed. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 2003; 56: 1194-1200.
  44. Jung H, Beck-Bornholdt HP, Svoboda V i wsp. Quantification of late complications after radiation therapy. *Radiother Oncol* 2001; 61: 233-46.
  45. Rieger KE, Hong WJ, Tusher VG i wsp. Toxicity from radiation therapy associated with abnormal transcriptional responses to DNA damage. *Proc Natl Acad Sci USA* 2004; 101: 6635-40.
  46. Svensson JP, Stalpers LJA, Esveldt-van Lange REE i wsp. Analysis of gene expression using gene sets discriminates cancer patients with and without late radiation toxicity. *PLoS Med* 2006; 3: e422. doi: 10.1371/journal.pmed.0030422.
  47. Quarmby S, West C, Magee B i wsp. Differential expression of cytokine genes in fibroblasts derived from skin biopsies of patients who developed minimal or severe normal tissue damage after radiotherapy. *Radiat Res* 2002; 157: 243-8.
  48. Chang-Claude J, Popanda O, Tan XL i wsp. Association between polymorphisms in the DNA repair genes, *XRCC1*, *APE1*, and *XPD* and acute side effects of radiotherapy in breast cancer patients. *Clin Cancer Res* 2005; 11: 4802-9.
  49. Hoeller U, Zschenker O, Borgmann K i wsp. Association of SNP's in five selected genes with breast cancer risk and clinical radiosensitivity. Abstract book of 53rd Annual Meeting of Radiation Research Society; 5-8 Nov. 2006; Philadelphia: USA; 2006, S103.
  50. Andreassen CN, Alsner J, Overgaard M i wsp. Risk of radiation-induced subcutaneous fibrosis in relation to single nucleotide polymorphisms in *TGFBI*, *SOD2*, *XRCC1*, *XRCC3*, *APEX* and *ATM*; a study based on DNA from formalin fixed paraffin embedded tissue samples. *Int J Radiat Biol* 2006; 82: 577-86.

Otrzymano: 12 kwietnia 2007 r.

Przyjęto do druku: 4 lipca 2007 r.