

**Marta Dyszkiewicz Konwińska**

Katedra i Zakład Biomateriałów i Stomatologii Doświadczalnej Uniwersytetu Medycznego  
im. Karola Marcinkowskiego w Poznaniu

**STAN JAMY USTNEJ U PACJENTÓW  
W PRZEBIEGU CHEMIOTERAPII RAKA PŁUCA**

**Rozprawa na stopień doktora nauk medycznych**

**Promotor: Prof. dr hab.n.med. Honorata Shaw**

Poznań 2010

## **Podziękowania**

Pani Promotor

Prof. dr hab. Honoracie Shaw pragnę serdecznie podziękować za kierowanie moim doktoratem, za wsparcie i niezwykle cenne uwagi w trakcie pracy.

Dr hab. med Rodrygowi Ramlauowi, Ordynatorowi Oddziału Onkologii Klinicznej w Wielkopolskim Centrum Pulmonologii i Torakochirurgii za życzliwość i umożliwienie przeprowadzenia badań.

Mgr Hannie Piotrowskiej za pomoc w przeprowadzeniu badań laboratoryjnych i interpretacje wyników.

Niniejsza praca została częściowo sfinansowana z grantu promotorskiego Ministerstwa Nauki i Szkolnictwa Wyższego nr N403 597 438

## Wykaz ważniejszych skrótów, oznaczeń i symboli

OM – zapalenie błony śluzowej jamy ustnej w przebiegu chemioterapii

*NFκB* – czynnik jądrowy κB

TNF alfa - czynnik martwicy nowotworu

COX 2 - cyklooksygenaza indukowana

BMI - wskaźnik masy ciała

GM CSF - czynnik stymulujący tworzenie kolonii granulocytów i makrofagów

DPD - dehydrogenaza dihydropirymidyny

DPYD - gen kodujący dehydrogenazę dihydropirymidyny

MTHFR - reduktaza metylenotetrahydrofolianowa

NK – limfocyty *Natural Killers*

IL 6 - interleukina 6

IL1β - interleukina 1 Beta

Bcl 2 – chłoniak B komórkowy

PAMP - wzorce molekularne związane z patogenami

DAMP - wzorce molekularne związane z uszkodzeniem

CRAMP - wzorce molekularne związane z chemio/radioterapią

PRR - receptor rozpoznający wzorzec

STAT3 - czynnik transkrypcyjny 3, transduktor sygnału i aktywator transkrypcji 3

JAK 2 - kinaza Janusa 2

KGF - czynnik wzrostu keratynocytów

TFF – białko trójlistne 1

RAS - afty przewlekłe nawracające

NCI-CTCAE v.3.0 –National Cancer Institute Common Toxicity Criteria for Adverse Events

NRS – numeryczna skala natężenia bólu

OHI S – uproszczony wskaźnik higieny jamy ustnej

DMFT – wskaźnik zębów z próchnicą, zębów usuniętych i wypełnionych

PN - schemat cisplatyna/winorelbina

PE - schemat cisplatyna/etopozyd

DTP – trójfosforan dezoksyrybonukleotydu

DTT - dithiothreitol, odczynnik Clelanda

PCR – reakcja łańcuchowa polimerazy

mTOR - cel rapamycyny w komórkach ssaków

CARD – domena aktywacji i rekrutacji kaspaz

IAP – inhibitor białek apoptotycznych

TNFRSF21 /DR 6 – receptor śmierci 6

P53 - białko o masie cząsteczkowej 53kDa, supresor nowotworów

CASP 9 - kaspaza 9

SOCS 3 – białko hamujące sygnał pochodzący od cytokin 3

FASLG - ligand receptora Fas

c-FLIP /CFLAR – białko c-FLIP

MCL 1 - białko różnicowania komórkowego białaczki szpikowej

BBC3/ PUMA - białko wiążące Bcl-2

STAT5B – transduktor sygnału i aktywator transkrypcji 5B

## **Spis treści**

<b>1. Wstęp.....</b>	<b>8</b>
<b>2. Przegląd piśmiennictwa.....</b>	<b>10</b>
2.1 Charakterystyka Oral Mucositis (OM).....	10
2.1.1 Charakterystyka zmian patologicznych.....	11
2.1.2 Czynniki wpływające na wystąpienie OM oraz modyfikujące jego przebieg.....	13
2.2. Genetyczne aspekty OM.....	14
2.2.1 OM a zjawisko apoptozy.....	15
2.2.2 Rola <i>NF-κB</i> i TNF w procesie powstawania OM.....	16
2.3 Potencjalny wpływ mikroflory jamy ustnej na powstawanie OM.....	18
2.4 Odpowiedź immunologiczna a wystąpienie objawów OM.....	19
2.4.1 Potencjalna rola STAT3 w przebiegu OM.....	20
2.5. Leki biologiczne w terapiach OM.....	21
2.6 Aktualne wytyczne postępowania z pacjentami cierpiącymi na OM.....	22
2.6.1 Potencjalne kierunki badań nad leczeniem OM.....	25
<b>3. Cel pracy.....</b>	<b>27</b>
<b>4. Materiał i metody.....</b>	<b>28</b>

4.1 Charakterystyka badanej grupy.....	29
4.2 Badanie stanu jamy ustnej z oznaczeniem wskaźników epidemiologicznych.....	30
4.3 Badanie stanu błony śluzowej jamy ustnej z zastosowaniem NCI-CTCAE.....	31
4.4 Pobieranie wymazu szczoteczkowego.....	32
4.5 Badanie laboratoryjne.....	33
4.5.1 Izolacja RNA.....	34
4.5.2 Odwrotna transkrypcja.....	34
4.5.3 Amplifikacja cDNA w czasie rzeczywistym.....	35
4.6 Analiza statystyczna.....	38
<b>5. Wyniki.....</b>	<b>38</b>
5.1 Badanie kliniczne.....	38
5.1.1 Wskaźnik OHI-S.....	38
5.1.2 Wskaźnik DMFT.....	41
5.1.3 NCI-CTCAE.....	43
5.2 Badanie laboratoryjne.....	51
5.2.1 RealTime ready Human Apoptosis Panel 96 .....	51

<b>6.Omówienie wyników.....</b>	<b>55</b>
6.1 Badanie kliniczne jamy ustnej.....	55
6.1.1 Wskaźnik OHI-S.....	55
6.1.2 Wskaźnik DMFT.....	57
6.1.3 NCI-CTCAE.....	59
6.2 Badanie laboratoryjne.....	64
<b>7. Podsumowanie.....</b>	<b>72</b>
<b>8. Wnioski.....</b>	<b>73</b>
<b>9. Streszczenie.....</b>	<b>74</b>
<b>10. Spis rycin.....</b>	<b>76</b>
<b>11. Piśmiennictwo.....</b>	<b>78</b>

## 1. Wstęp

Rak płuca jest obecnie najczęstszą przyczyną zgonów z powodu nowotworów złośliwych zarówno w Polsce, jak i na świecie (1,2). Rocznie rozpoznajemy w naszym kraju od 18 do 20 tysięcy nowych zachorowań na raka płuca i tyle samo stwierdza się w tym czasie zgonów z powodu tego nowotworu. Można zatem sądzić, że leczenie tej choroby staje się kolejnym wyzwaniem dla współczesnej medycyny. Wyniki leczenia raka płuca są nadal niezadowalające, gdyż zaledwie 10% chorych przeżywa 5 lat lub więcej (2). Większość pacjentów już w momencie rozpoznania nie kwalifikuje się do zabiegu chirurgicznego, który jest podstawowym sposobem leczenia raka płuca i dlatego jedynym możliwym postępowaniem jest zastosowanie chemio i/lub radioterapii oraz w dalszych etapach - leczenia paliatywnego. Raki niedrobnokomórkowe, w tym rak płaskonabłonkowy, gruczołowy oraz wielkokomórkowy stanowią 85% wszystkich nowotworów płuca (1,2). Wybór sposobu leczenia uzależniony jest od typu histologicznego nowotworu i stopnia jego zaawansowania. Dla pacjentów z zaawansowanym rakiem płaskonabłonkowym (od stopnia IIA) chemioterapia, a rzadziej radioterapia stanowią uzupełnienie leczenia operacyjnego, a niekiedy jedyną możliwą formę leczenia (2). Podstawą chemioterapii w raku płuca są preparaty platyny (cisplatyna, karboplatyna). Leki te kojarzy się w różnych schematach leczenia z etopozydem, z winorelbiną / nawelbiną (alkaloidy Vinca) lub gemcytabiną, a ostatnio także z docetaxelem. Zastosowanie chemioterapii wiąże się z wieloma skutkami ubocznymi, w tym między innymi, z powstawaniem zmian zanikowo- zapalnych w obrębie błony śluzowej jamy ustnej (Oral Mucositis –OM). Wynika to z faktu, iż leki cytostatyczne uszkadzają szybko dzielące się komórki zarówno nowotworowe, jak i te, które cechują się w warunkach fizjologicznych licznymi podziałami. Do tego typu komórek należą komórki szpiku, rozrodcze, błony śluzowej i skóry.



Skutkiem ubocznym działania chemioterapii jest uszkodzenie komórek błony śluzowej w warstwie podstawowej nabłonka, przede wszystkim w obrębie obszarów nierogowaciejących, do których należą: powierzchnia wewnętrzna policzków i warg, podniebienie miękkie, powierzchnie boczne i dolna języka oraz dno jamy ustnej.

W piśmiennictwie przeważa pogląd, że zarówno częstość jak i nasilenie opisywanych zmian zależą od rodzaju choroby nowotworowej, długotrwałości i intensywności leczenia oraz rodzaju zastosowanych w leczeniu środków chemioterapeutycznych (3,4). W ostatnim czasie zwrócono również uwagę na genetyczne uwarunkowania tego zjawiska.

Oral mucositis w zaawansowanym stadium pogarsza w znacznym stopniu komfort życia chorego powodując zaburzenia smaku, ból w obrębie jamy ustnej utrudniający żucie i połykanie, co w konsekwencji doprowadza do obniżenia masy ciała. Wystąpienie tych objawów może być powodem zmiany schematu leczenia lub w skrajnych przypadkach prowadzi do zaprzestania stosowania chemioterapii. Ogniska zapalne w jamie ustnej łatwo ulegają nadkażeniu bakteriami i grzybami. W grupie pacjentów otrzymujących chemioterapię jakiegokolwiek ogniska potencjalnej infekcji w jamie ustnej stanowią ogromne zagrożenie dla życia pacjenta. Jeśli zatem dochodzi do ograniczenia chemioterapii z powodu wystąpienia silnych objawów OM, to można spodziewać się pogorszenia efektów leczenia choroby podstawowej.

Nie bez znaczenia jest również aspekt ekonomiczny tego zjawiska. Z badań przeprowadzonych w USA pod patronatem American Cancer Society wynika, że koszty leczenia pacjenta, u którego w trakcie leczenia choroby podstawowej rozwinęło się OM mogą wzrosnąć nawet o 13000 dolarów.

## 2. Przegląd piśmiennictwa:

### 2.1 Charakterystyka Oral Mucositis (OM)

Częstość występowania OM szacuje się na 85-100% u pacjentów leczonych radioterapią w obrębie głowy i szyi, na 75-100% w grupie pacjentów po przeszczepie szpiku oraz na 5-40 % u pacjentów leczonych z powodu guzów litych (4).

Zmiany pojawiają się najczęściej na nierogowaczącej błonie śluzowej jamy ustnej - policzków, warg, dna jamy ustnej, bocznych i dolnej powierzchni języka oraz podniebieniu miękkim (5).

Niektórzy autorzy wskazują na pojawianie się OM w innych obszarach jamy ustnej i wówczas konieczne jest pobranie wymazu w celu szerszej diagnostyki i wykluczenia innych chorób np. o podłożu wirusowym, które także mogą dawać objawy zapalenia jamy ustnej (6).

Ostatnie badania potwierdzają, że OM wywołane chemioterapią pojawia się najczęściej pomiędzy 3 a 5 dniem cyklu chemioterapii i osiąga szczyt około dziesiątego dnia. W okresie 21 dni od podania chemioterapii stan błony śluzowej normalizuje się, natomiast utrzymujące się drugorzędowe zmiany w obrębie nabłonka pozostają, zwiększając tym samym ryzyko wystąpienia zmian przy następnym cyklu chemioterapii (7).

### 2.1.1 Charakterystyka zmian patologicznych

Zapalenie błony śluzowej jamy ustnej jako powikłanie leczenia chemio i radioterapią jest w ostatnich latach zagadnieniem szeroko opisywanym w literaturze. Badania prowadzone nad OM nie dają jasnego poglądu na przyczyny występowania tego powikłania i możliwości jego zapobiegania. Natomiast dzięki wieloletnim badaniom prowadzonym przez zespół Sonis'a przebieg powstawania tych zmian na poziomie tkankowym został stosunkowo dobrze poznany. Wynika z nich, że chemio lub/i radioterapia uszkadzają komórki podstawne nabłonka błony śluzowej upośledzając zdolności regeneracyjne tej tkanki. Prowadzi to do zmniejszenia grubości nabłonka na drodze ograniczenia tworzenia nowych komórek, podczas gdy już istniejące migrują w kierunku powierzchni. W najnowszych publikacjach Sonis wskazuje jednak, że zapalenie błony śluzowej jamy ustnej obejmuje swym zasięgiem nie tylko nabłonek, ale również warstwę podśluzową (8).

Prowadzone nad tym zagadnieniem badania wykazały obecność zmian w śródbłonku naczyń warstwy podśluzowej i w obrębie tkanki łącznej warstwy podśluzowej, które powstają jeszcze zanim nastąpi uszkodzenie nabłonka. W obrazie mikroskopowym jest to widoczne, jako pogrubienie błony wewnętrznej z towarzyszącym zmniejszeniem światła naczynia wraz ze zniszczeniem włókien mięśniowych i elastycznych ścian naczyń. Dla lepszego zrozumienia całości procesu Sonis i współpracownicy podzielili go na 5 etapów składających się z: inicjacji, pierwszorzędowej odpowiedzi na uszkodzenie, wzmocnienia sygnału, owrzodzenia i gojenia (8). Wykazali oni, że zarówno radio jak i chemoterapia powodują rozerwanie łańcuchów DNA, ale sam proces uszkodzenia błony śluzowej jest znacznie bardziej złożony. Powstające na skutek zniszczenia DNA wolne rodniki są równoległymi do rozerwania

łańcuchów inicjatorami procesów prowadzących do uszkodzenia komórek warstwy podstawnej nabłonka. Spośród czynników transkrypcyjnych aktywowanych przez wolne rodniki najważniejszy wydaje się być *NF-κB* odpowiedzialny, za nadregulację genów prowadzących do produkcji cytokin prozapalnych takich jak TNF alfa, Interleukiny 1 Beta i Interleukiny 6. Obecność tych cytokin prowadzi do przyspieszonej apoptozy i uszkodzenia tkanek, a kliniczną manifestacją tych zmian jest tworzenie się w jamie ustnej pacjenta owrzodzeń z towarzyszącym silnym bólem. Ponadto w tej grupie pacjentów częściej występuje neutropenia, która znacznie zwiększa ryzyko nadkażenia owrzodzeń przez florę bakteryjną bytującą w jamie ustnej. Ten proces zwiększa dodatkowo aktywność makrofagów i tym samym ponownie wzrasta wydzielanie cytokin prozapalnych, czego efektem jest zaostrzenie zapalenia błony śluzowej jamy ustnej. Stopień zaawansowania zmian koreluje bezpośrednio z natężeniem produkcji cytokin prozapalnych.

Sygnal do gojenia daje macierz pozakomórkowa zapoczątkowując proliferację komórek nabłonka i ich różnicowanie (9). Proces samoistnego gojenia jest jak dotąd najmniej poznanym etapem OM.

Zjawiskiem niezbędnym do samoistnej odbudowy błony śluzowej jest angiogeneza. Jest to proces charakterystyczny dla stanu zapalnego. Jednym z enzymów sterujących angiogenezą jest cyklooksygenaza - COX 2, która bierze udział zarówno w uszkodzeniu tkanek jak i przy ich odbudowie. Ostatnie badania nad dwoistym mechanizmem jej działania analizowały rolę inhibitorów COX 2, które na modelach zwierzęcych okazały się być skuteczne w redukowaniu objawów zapalenia błony śluzowej jelit (10).

Po zakończonej fazie gojenia zmiany w obrębie błony śluzowej w obrazie klinicznym zanikają, natomiast struktura odbudowanej błony podśluzowej różni się nadal od stanu pierwotnego tj. przed wystąpieniem OM.

### 2.1.2 Czynniki wpływające na wystąpienie OM oraz modyfikujące jego przebieg

Czynniki ryzyka zapalenia błony śluzowej jamy ustnej można podzielić na związane z rodzajem leczenia oraz na te, które wynikają ze stanu pacjenta (typ nowotworu, obecność chorób dodatkowych). Z nielicznych przeprowadzonych nad tym zagadnieniem badań wynika, że najwyższy odsetek występowania OM dotyczy pacjentów leczonych z powodu nowotworów przetyku, głowy i szyi oraz krwi. W grupie pacjentów leczonych chemioterapią znacznie zwiększone ryzyko pojawia się przy podawaniu 5-fluorouracylu i irynotekanu (11). Wśród innych czynników mogących mieć wpływ na wystąpienie OM istotne są również wiek, płeć oraz stan odżywienia pacjenta.

Z dotychczasowych publikacji wynika, że na objawy związane z OM cierpią głównie pacjenci w wieku bardzo młodym lub zaawansowanym (>65 roku życia) i, że częściej związane są z płcią żeńską. Dodatkowymi czynnikami ryzyka są niskie BMI oraz obecność neutropenii (12). Sonis w badaniach z 2001 roku wykazał, że OM rozwija się częściej u pacjentów z niskim stężeniem granulocytów obojętnochłonnych. Istnieje u nich również zwiększone ryzyko wtórnego nadkażenia powstałych owrzodzeń, co w konsekwencji, przy obniżonej odporności może, doprowadzić do uogólnienia zakażenia (13). Jednakże próby zapobiegania i leczenia zapalenia błony śluzowej poprzez stosowanie płukanki zawierającej czynnik wzrostu granulocytów i makrofagów GM-CSF nie przyniosły oczekiwanych rezultatów (14).

Z czynników o charakterze miejscowym wymienia się wcześniejsze występowanie chorób przyzębia oraz nieprawidłowo dopasowane uzupełnienia protetyczne, jako czynnik miejscowo drażniący błonę śluzową (15).

## 2.2. Genetyczne aspekty OM

Do chwili obecnej nie udało się wyjaśnić, dlaczego powikłanie o charakterze OM pojawia się tylko u części chorych w obrębie grupy poddawanej temu samemu schematowi leczenia. W piśmiennictwie dotyczącym toksycznych efektów chemioterapii w obrębie jamy ustnej prezentowane są opinie, że predyspozycja w kierunku zapalenia błony śluzowej jamy ustnej może być uwarunkowana genetycznie. Najlepiej zbadaną grupą genów mogącą mieć związek z powstawaniem OM są geny zawiadujące metabolizmem leków. Schwab w swoich badaniach znalazł wyraźną zależność pomiędzy występowaniem OM w trakcie terapii 5 fluorouracylem, a niedoborem dehydrogenazy dihydropirymidyny (DPD). Całkowity brak DPD dotyczy około 5% populacji, u której brak aktywności enzymatycznej powoduje nadmiar akumulacji leku i prowadzi do zwiększonej toksyczności. 3-5% ludzkiej populacji charakteryzuje częściowy brak DPD związany z mutacją genu DPYD, co w konsekwencji również wiąże się ze zwiększoną toksycznością 5 fluorouracylu (16). Koncepcje zaburzonej genetycznie drogi metabolicznej leków potwierdzają także badania Kremera, który wykazał, że u chorych z polimorfizmem pojedynczego nukleotydu (MTHFR C677T) leczonych metotreksatem istnieje zwiększone ryzyko wystąpienia toksycznych efektów chemioterapii. W badaniach klinicznych przeprowadzonych w tej grupie chorych wykazano, że zapadalność na zapalenie błony śluzowej jest u nich także zwiększona (17).

Doniesienia dotyczące genetycznych aspektów OM są jednak nieliczne i dla potwierdzenia znaczenia prognostycznego tych czynników w występowaniu powikłań towarzyszących chemioterapii konieczne są dalsze badania. Pozytywne wyniki tych badań umożliwiłyby wyodrębnienie grupy pacjentów o zwiększonym ryzyku wystąpienia OM jeszcze przed

rozpoczęciem leczenia choroby nowotworowej. To z kolei dałoby podstawę do podjęcia wczesnych działań profilaktycznych i skuteczniejszego leczenia towarzyszącego chemioterapii zapalenia błony śluzowej.

### 2.2.1 OM a zjawisko apoptozy

Prowadzone nad tym zjawiskiem badania wskazują na ogromną rolę procesu apoptozy w powstawaniu zapalenia błony śluzowej jamy ustnej. Proces zaprogramowanej śmierci komórki jest zjawiskiem fizjologicznym warunkującym prawidłowe funkcjonowanie organizmu. Dwie najlepiej poznane ścieżki to szlak zewnętrzny (receptorowy), związany z błoną komórkową oraz wewnętrzny, przebiegający z udziałem mitochondrium. Wśród innych dróg wymienia się również zaobserwowany w cytotoksycznych limfocytach T, oraz komórkach NK (*Natural Killer*) – szlak pseudoreceptorowy, szlak sfingomielinowo-ceramidowy oraz szlak indukowany stresem (18). W procesie nowotworzenia apoptoza zostaje zaburzona, a komórki ulegają niepohamowanemu rozrostowi. Głównym założeniem chemioterapii jest ponowna indukcja apoptozy w komórkach nowotworowych. Niestety, pomimo ciągłego postępu w terapiach onkologicznych leki stosowane w chemioterapii wciąż jeszcze nie działają wybiórczo na komórki nowotworowe. Większość skutków ubocznych chemioterapii wiąże się więc z faktem, że prowadzi ona do uszkodzenia zdrowych, ulegających szybkim podziałom komórek poprzez wywołanie u nich przedwczesnego zjawiska apoptozy (19).

Znane są różne drogi aktywacji apoptozy w komórkach wynikających z terapii antynowotworowej. Aktywacja ta może się dokonywać na drodze szlaku wewnętrznego, gdy z mitochondrium, w wyniku działania bodźców chemicznych (min. chemioterapii) uwalnia

się cytochrom c oraz czynnik aktywacji proteaz apoptotycznych Apaf-1 i łącząc się z cząsteczkami prokaspazy-9 inicjuje apoptozę .

Innym sposobem jest droga szlaku zewnętrznego , w którym aktywacja kaspaz zachodzi pod wpływem aktywacji receptora śmierci na błonie komórkowej (20) .

W nowszych publikacjach prezentowany jest szlak sfingomielinowo-ceramidowy, w którym sfingomielinaza jak i ceramidaza aktywowane poprzez terapie antynowotworowe inicjują apoptozę (21).

Potwierdził to Paris, który w swoich badaniach wykazał, że myszy pozbawione genu kodującego kwaśną sfingomielinazę miały zwiększoną odporność przewodu pokarmowego na wystąpienie OM wywołanego radioterapią (22).

### 2.2.2 Rola *NF-κB* i TNF w procesie powstawania OM

Najlepiej poznanym czynnikiem transkrypcji odgrywającym istotną rolę w procesie powstawania OM jest *NF-κB*. Kieruje on ekspresją około 200 genów, między innymi kodujących cytokiny prozapalne takie jak: TNF, IL-6 i IL1β. Poziom tych białek rośnie we krwi obwodowej pacjentów poddawanych chemio i radioterapii (23). Badania Logan i współpracowników wykazały, że po podaniu chemioterapii podnosi się również stężenie tkankowego *NF-κB* biorącego udział w odpowiedzi immunologicznej na toczące się procesy zapalne i mającego wpływ na rozwój komórek krwiotwórczych, keratynocytów oraz komórek układu limfatycznego (24). *NF-κB* może wpływać, w zależności od etapu, na jakim zostaje aktywowany, zarówno anty jak i prozapalnie. Podobnie dwukierunkowe mogą być jego działania apoptotyczne. Większość badań wskazuje na proapoptotyczne działanie *NF-κB* w stosunku do komórek prawidłowych, natomiast antyapoptotyczne w odniesieniu do komórek nowotworowych. Podłoże tej dwubiegunowości w działaniu *NF-κB* nie jest jasne.



Sonis sugeruje, że może to wynikać z oddziaływania *NF-κB* na geny z grupy Bcl 2, które w swoim składzie posiadają białka o właściwościach zarówno pro jak i anty apoptotycznych (25). Na kierunek działania *NF-κB* mogą również wpływać inne czynniki, między innymi środowisko jamy ustnej, rodzaj nabłonka oraz specyficzna mikroflora .

Kolejne prowadzone przez Gibson i współpracowników badania nad tym zagadnieniem potwierdziły zwiększoną ekspresję białek z grupy Bcl 2 ( Bax i Bak ) aktywowanych poprzez *NF-κB* w obrębie błony śluzowej jelita cienkiego po zastosowaniu chemioterapii (26).

Pod pojęciem TNF kryje się grupa białek wydzielanych przez komórki układu odpornościowego: makrofagi, komórki NK i limfocyty T. TNF poprzez interakcje z TNFr1 (receptor obecny na powierzchni wszystkich komórek) prowadzi do uruchomienia kaskady kaspaz będącej dla komórki momentem determinującym śmierć na drodze apoptozy (27).

Liczne badania prowadzone nad tym zagadnieniem na modelach zwierzęcych potwierdzają spadek występowania OM po podaniu inhibitorów TNF (28). Uważa się również, że na ekspresję TNF może wpływać środowisko jamy ustnej. Dowodem na to mogą być badania Orlicek i współpracowników, którzy wykazali, że izolaty ze szczepu *Streptococcus Viridans* - drobnoustroju bytującego w jamie ustnej, indukowały u laboratoryjnych myszy produkcję TNF w obrębie makrofagów (29). Zjawisko to może stanowić wyjaśnienie dla zaostrzenia zapalenia jamy ustnej i powstawania owrzodzeń w wyniku zwiększenia wydzielania cytokin prozapalnych również na poziomie makrofagów stymulowanych poprzez produkty uboczne bakterii bytujących w jamie ustnej.

### 2.3 Potencjalny wpływ mikroflory jamy ustnej na powstawanie OM

Dotychczasowe badania nie potwierdziły jednoznacznie zależności pomiędzy występowaniem OM, a zmianami zachodzącymi w obrębie mikroflory jamy ustnej podczas chemioterapii. Badania przeprowadzone przez Fainstein wykazały, że po podaniu chemioterapii poziom G (+) flory bakteryjnej jamy ustnej obniżył się o około 68% z jednoczesnym znacznym wzrostem liczby szczepów bakterii G (-) (30).

Opublikowano również wyniki badań, które zaprzeczają istnieniu takich zależności. Należą do nich publikacje Bergmann i współpracowników, którzy nie znaleźli żadnych zmian w środowisku jamy ustnej w wyniku terapii antynowotworowej (31). Sixou natomiast znalazł korelację pomiędzy obecnością zaczerwienienia błony śluzowej u dzieci leczonych chemioterapią, a zwiększeniem zróżnicowania flory bakteryjnej w obrębie jamy ustnej i gardła (32).

Brakuje jednak badań, które analizowałyby związek pomiędzy zmianą w liczbie i typie bakterii w jamie ustnej pacjentów z granulocytopenią wywołaną chemioterapią, a pojawieniem się zmian o typie OM. Ta grupa pacjentów z upośledzoną odpornością jest bowiem najbardziej narażona na ciężkie, trudne w leczeniu infekcje jamy ustnej zagrażające życiu pacjenta. W nielicznych doniesieniach na ten temat nie odnaleziono również powiązania pomiędzy specyficzną florą bakteryjną, a pojawieniem się objawów OM.

## 2.4 Odpowiedź immunologiczna a wystąpienie objawów OM

Obecność bogatej mikroflory w obrębie jamy ustnej może mieć inny, pośredni wpływ na przebieg OM. Rozważa się, że może tu mieć zastosowanie hipoteza Janeway i Medzhitov mówiąca o tym, że odpowiedź organizmu na patogen rozpoczyna się od rozpoznania molekularnego wzorca prezentowanego przez dany antygen, w skrócie PAMP (ang. *pathogen associated molecular pattern*) (33).

Według innej hipotezy opisanej przez Matzingera cząsteczki produkowane przez uszkodzone tkanki (DAMP ang. *damage associated molecular pattern*) inicjują kaskadę wydarzeń, które ostatecznie decydują o rozmiarze uszkodzeń. W tym przypadku chemio i radioterapia uszkadzając komórki guza, prowokowałyby je do uwolnienia DAMP (34).

Istnieje duże prawdopodobieństwo, iż zdrowe komórki w odpowiedzi na apoptozę i nekrozę wywoływaną radio i chemioterapią również uwalniają wzorce molekularne, CRAMP (ang. *chemotherapy / radiotherapy associated molecular pattern*). Zgodnie z tą teorią CRAMP mogą łączyć się z receptorami rozpoznającymi wzorzec (PRR), które znajdują się zarówno w komórkach nabłonka, śródbłonka jak i fibroblastach. Po przyłączeniu automatycznie następuje aktywacja NF- $\kappa$ B i rozpoczyna się proces zapalny. Co ciekawe, proces ten może ulegać zaostrzeniu poprzez ekspresję DAMP jako produktów ubocznych uszkodzeń tkanek jak i PAMP ze strony mikroorganizmów naturalnie bytujących w jamie ustnej (35).

Wydaje się, że jest to również możliwa droga uszkodzenia błony śluzowej jamy ustnej u pacjentów w trakcie chemioterapii.

#### 2.4.1 Potencjalna rola STAT 3 w przebiegu OM

Aktywacja STAT 3 promuje wzrost komórek nowotworowych, obniża odpowiedź immunologiczną i może prowadzić do oporności na leczenie chemioterapią. Jednym z głównych aktywatorów STAT 3 jest kinaza JAK2.

Pomocne w wyjaśnieniu złożoności działania czynnika, transkrypcyjnego STAT 3 w regulacji procesów apoptozy i odpowiedzi immunologicznej mogą być wyniki badań Duan i Brander, którzy wykazali, że selektywny inhibitor JAK2 działa proapoptotyczne i poprawia wyniki leczenia chemioterapią guzów jajnika. Co jest istotne to fakt, że działanie proapoptotyczne JAK2 miało miejsce tylko w komórkach nowotworowych natomiast w obrębie komórek zdrowych nie stwierdzano żadnych negatywnych skutków (36).

Obecnie prowadzone są dalsze badania nad możliwością zastosowania wybiórczych inhibitorów STAT 3, które w połączeniu z chemioterapią mogłyby poprawiać skuteczność jej działania na komórki nowotworowe jednocześnie redukując toksyczne efekty terapii w obrębie zdrowych komórek. Przykładem takich inhibitorów jest gamma-D-glutamyl-L-tryptophan, nad którym toczą się badania drugiej fazy.

## 2.5. Leki biologiczne w terapiach OM

Obecny stan wiedzy na temat oral mucositis pozwolił na wprowadzenie do użytku ludzkiego czynnika wzrostu keratynocytów (KGF) wytwarzanego metodą rekombinacji DNA przez bakterie *Escherichia coli* w skrócie nazwanego paliferminą. Liczne badania kliniczne potwierdziły jego skuteczność w zapobieganiu i występowaniu mucositis w stopniu 3 i 4 u pacjentów z nowotworami krwi. Palifermina łączy się z receptorami KGF, które występują na powierzchni komórek nabłonka i stymulują ich proliferację, różnicowanie oraz migrację. Dodatkowo stymulują uruchomienie mechanizmów cytoochronnych (37). Jednakże ze względu na możliwość występowania receptorów czynnika wzrostu keratynocytów na powierzchni guzów złośliwych i tym samym ich potencjalnego działania ochronnego dla tych komórek nowotworowych nie zaleca się stosowania tego środka u pacjentów z guzami litymi (38).

Innym środkiem, który znajduje się nadal w fazie badań, jest zawiesina L glutaminy o podwyższonej przyswajalności o nazwie AES-14. L glutamina bierze udział w odbudowie tkanek i w procesach gojenia. Peterson i współpracownicy przeprowadzili badania kliniczne, w których w okresie dwóch tygodni od podania pierwszego cyklu chemioterapii monitorowali grupę pacjentów otrzymujących placebo i grupę pacjentów poddawanych terapii AES-14. Uzyskano wyniki, w których wykazano, że u chorych otrzymujących AES-14 nastąpiła 22% redukcja częstości występowania zmian o charakterze OM w stopniu >II w porównaniu do grupy kontrolnej otrzymującej placebo (39).

## 2.6 Aktualne wytyczne postępowania z pacjentami cierpiącymi na OM

W ciągu ostatnich lat pojawiły się dziesiątki badań nad skutecznością różnych płukanek, żeli i zawiesin stosowanych w zapobieganiu i redukowaniu objawów OM. Większość tych środków z upływem lat okazywała się być mało skuteczna. Na zjeździe ESMO (ang. European Society for Medical Oncology) w 2009 roku powołano grupę badaczy zajmującą się zagadnieniem OM, której celem było opracowanie wytycznych postępowania w przypadku toksycznych skutków ubocznych chemio i/lub radioterapii w obrębie przewodu pokarmowego (40).

W grupie pacjentów poddawanych radio i/lub chemioterapii kładzie się szczególny nacisk na utrzymywanie prawidłowej higieny jamy ustnej. Przed zastosowaniem leczenia konieczna jest kontrola stanu jamy ustnej i w razie potrzeby - przeprowadzona odpowiednio wcześniej sanacja jamy ustnej. Jeśli konieczne okaże się usunięcie zębów, powinno się ten zabieg wykonać minimum 2 tygodnie przed podjęciem leczenia radioterapią i tydzień przed podaniem chemioterapii. Podobny schemat postępowania winien obowiązywać w przypadku zębów wymagających leczenia endodontycznego. Także tutaj najkorzystniejsze jest ukończenie leczenia na tydzień przed wdrożeniem chemioterapii. W grupie pacjentów z założonymi na stałe aparatami ortodontycznymi, które mogłyby stanowić czynnik drażniący błonę śluzową należy przerwać leczenie ortodontyczne jeszcze przed rozpoczęciem chemioterapii. W przypadku pacjentów zdolnych do zachowania maksymalnej higieny jamy ustnej można rozważyć pozostawienie aparatu na czas leczenia.

W czasie terapii antynowotworowej zaleca się stosowanie preparatów sztucznej śliny albo płukanek na bazie 0,9% roztworu soli fizjologicznej minimum 4-6 razy dziennie. Na rynku dostępne są gotowe płukanki na bazie roztworu jonów wapniowo-fosforanowych

(Caphosol <sup>TM</sup>) czy też płukanki zawierające w składzie LP3 tj. laktoperoksydazę, laktoferynę oraz lizozym (Biotene <sup>TM</sup>). Brakuje jednak wystarczającej liczby badań klinicznych, które wskazywałyby jednoznacznie na ich wyższą skuteczność od roztworów soli fizjologicznej.

Ze względu na działanie drażniące nie poleca się natomiast stosowania środków z chlorheksydyną i płukanek z zawartością alkoholu.

Dostępne są również żele adhezyjne z kwasem hialuronowym mające łagodzić objawy szczególnie w trakcie fazy owrzodzenia (Gelclair <sup>TM</sup>). Również w tym przypadku brak jest piśmiennictwa potwierdzającego ich kliniczną skuteczność. Korzystne natomiast i nie powodujące dodatkowych dolegliwości jest stosowanie miejscowo na uzębienie żeli i lakierów zawierających w składzie wysokie stężenie związków fluoru.

W przypadku pojawienia się dolegliwości bólowych w obrębie jamy ustnej w trakcie podawania chemioterapii pacjenci użytkujący ruchome uzupełnienia protetyczne powinni ograniczyć korzystanie z nich do minimum. Jeśli w trakcie badania klinicznego stwierdzimy, że uzupełnienie protetyczne lub wypełnienia posiadają ostre brzegi należy je skorygować przed leczeniem, aby zapobiec późniejszym urazom tkanek miękkich.

W przypadku wystąpienia wczesnych objawów podrażnienia błony śluzowej w trakcie chemioterapii należy zmienić dotychczas użytkowaną szczoteczkę na inną, o miękkim włosiu znaną pod nazwą chirurgicznej. Ważne jest uświadomienie pacjentowi, że nawet w skrajnym przypadku, gdy pojawią się silne objawy bólowe związane z zapaleniem błony śluzowej, nie wolno zaniedbać codziennej higieny i należy nadal oczyszczać jamę ustną gazikiem nasączonym solą fizjologiczną, a z czasem dodatkowo żelem z zawartością fluoru. Jest to konieczne dlatego, że odkładający się nieustannie na powierzchniach zębów bogaty w bakterie biofilm, jest przyczyną zmian chorobowych nawet w warunkach zdrowia. Należy

poinformować pacjenta, że powinien unikać ostrych potraw, alkoholu oraz palenia papierosów.

Niezmiernie ważny jest stały monitoring pacjentów i kontrola nasilenia bólu. Możliwe jest również zastosowanie środków miejscowo znieczulających, których działanie jest wyłącznie doraźne np. lidokainy lub benzokainy w żelu. W zaawansowanych stadiach OM, na przykład u pacjentów po przeszczepie szpiku, nie wyklucza się konieczności podania dożylnego opatów.

W przypadku planowanego leczenia 5 fluorouracylem próbuje się z różnym powodzeniem zapobiegać objawom OM stosując krioterapię, która polega na ssaniu kostek lodu w trakcie podawania dożylnego leku.

Według ostatnich zaleceń u pacjentów z nowotworami krwi oraz po przeszczepach można podawać paliferminę (Kepivance™) w dawce 60 µg/kg/dzień na 3 dni przed leczeniem oraz 3 dni po zastosowanej terapii. Skuteczna może być również niskoenergetyczna terapia laserowa (LLLT), która stymuluje proces gojenia, redukuje stan zapalny i dolegliwości bólowe.

Ponieważ leczenie stomatologiczne pacjentów w trakcie chemioterapii jest znacznie utrudnione, kładzie się nacisk na profilaktyczne wyeliminowanie potencjalnych ognisk infekcji. Jeśli mimo tego wystąpi konieczność leczenia stomatologicznego, to wówczas należy wykonać badanie ogólne krwi. Jeśli stężenie granulocytów obojętnochłonnych jest wyższe od 2000/mm<sup>3</sup> oraz stężenie płytek krwi powyżej 75000/mm<sup>3</sup>, to nie ma potrzeby stosowania podczas leczenia profilaktyki antybiotykowej. Można natomiast zabezpieczyć pacjenta przed przedłużonym krwawieniem stosując środki hemostatyczne i szycie. Przy stężeniach granulocytów obojętnochłonnych poniżej 2000 /mm<sup>3</sup> i/lub płytek krwi pomiędzy



40000 do 75000/mm<sup>3</sup> pacjent musi być leczony w osłonie antybiotykowej, a w niektórych przypadkach należy rozważyć transfuzje płytek krwi przed i 24h po zabiegu. Granulocytopenia poniżej 1000/mm<sup>3</sup> i/lub trombocytopenia poniżej 40000/mm<sup>3</sup> płytek krwi jest wskazaniem do leczenia wyłącznie w warunkach szpitalnych.

### 2.6.1 Potencjalne kierunki badań nad leczeniem OM

Pomimo dotychczasowych badań nad terapiami celowanymi i nanomedycyną w onkologii nowe techniki wciąż niosą ze sobą ryzyko skutków ubocznych również tych manifestujących się w obrębie błony śluzowej przewodu pokarmowego. Wiele substancji mogących mieć zastosowanie w leczeniu i zapobieganiu OM znajduje się nadal w trakcie badań klinicznych Są to między innymi: cynk, SCV-07, ATL-104, AG013.

1. Cynk, którego niedobór pojawia się często w trakcie chemioterapii, a który jest niezbędny przy procesach gojenia i podczas odpowiedzi immunologicznej (41).
2. SCV-07 (gamma-D-glutamyl-L-tryptophan), jest to środek znajdujący się w tej chwili w II fazie badań, którego potencjalne działanie ma polegać stymulacji odpowiedzi immunologicznej poprzez zahamowanie ścieżki sygnalizacyjnej STAT3 (42).
3. ATL-104 - jest to płukanka zawierająca w swoim składzie mitogen stymulujący komórki nabłonka . Obecnie znajduje się w II fazie badań (43).
4. AG013 - płukanka zawierająca w składzie hTFF1 (ang. *human trefoil factor 1*) - białko z rodziny TFF produkowane przez zmodyfikowane w tym celu genetycznie szczepy *L. lactis* sAGX0085. Białka TFF pobudzają proces gojenia uszkodzeń błony śluzowej (44).

Skuteczność tej płukanki w zapobieganiu objawom mukotoksycznym potwierdzono u zwierząt laboratoryjnych, które poddawano radioterapii. Obecnie płukanka została dopuszczona do badań klinicznych prowadzonych na pacjentach.

Wydaje się, że w przyszłości zapobieganie objawom toksycznym chemioterapii ulegnie indywidualizacji. Stąd tak istotne wydaje się być poznanie podłoża genetycznego tych zmian zapalnych. Ostatnie badania nad nawrotowym, opryszczkowym zapaleniem jamy ustnej (RAS) wskazują, że w grupie osób podatnych na występowanie zmian o charakterze owrzodzeń przeważa heterozygotyczny genotyp TNF oraz IL 1 beta (45). Badania te wskazują, że odkrycie polimorfizmów w kaskadzie odpowiedzi zapalnej może okazać się przydatne w prognozowaniu i zapobieganiu wystąpieniu zmian o typie OM u wyselekcjonowanych pacjentów z grupy ryzyka. Wydaje się, zatem, że przeanalizowanie genów biorących udział w procesie apoptozy jak i w metabolizmie poszczególnych leków może mieć istotne znaczenie dla postępowania terapeutycznego.

### 3. Cel pracy

- Określenie częstości i stopnia nasilenia zmian o typie OM u chorych z rakiem płuca w trakcie chemioterapii
- Zbadanie i porównanie częstości i nasilenia tych zmian w zależności od stosowanego schematu chemioterapii
- Ocena klinicznej przydatności skali stopnia nasilenia zmian zapalnych wg National Cancer Institute Common Toxicity Criteria for Adverse Events v 3.0
- Próba ustalenia zależności pomiędzy stanem higieny jamy ustnej a występowaniem zmian o charakterze OM.
- Oznaczenie wskaźników statusu zębowego, masy ciała i analiza ich wpływu na występowanie zmian o typie OM
- Zbadanie możliwości wykonania analizy ekspresji białek apoptotycznych z materiału pobranego przy pomocy wymazu szczoteczkowego błony śluzowej jamy ustnej chorych poddanych chemioterapii w raku płuca
- Zbadanie zmian w ekspresji białek apoptotycznych na poziomie komórek nabłonka błony śluzowej jamy ustnej pacjentów poddawanych chemioterapii w raku płuca

#### 4. Materiał i metody

Dla zrealizowania założonych celów zastosowano badania kliniczne i laboratoryjne. Badania kliniczne obejmowały wywiad lekarski, badanie jamy ustnej uwzględniające stan uzębienia, poziom higieny jamy ustnej oraz obecność i rozległość uzupełnień protetycznych.

Wywiad lekarski polegał na wypełnieniu krótkiej ankiety, w której poza ogólnymi informacjami znalazły się pytania dotyczące dolegliwości związanych z jamą ustną. Pacjent oceniał również występowanie i nasilenie bólu wg. NRS, (ang. *Numerical Rating Scale*) gdzie 0 stanowi brak bólu a 10 maksymalne natężenie bólu.

Nieinwazyjne badanie jamy ustnej opierało się na ocenie wskaźników epidemiologicznych OHI-S (ang. *Simplified Oral Hygiene Index*), DMFT (ang. *Decayed/Missing/Filed Teeth*) oraz badaniu stanu błony śluzowej z zastosowaniem skali NCI-CTCAE.

Materiał do badań laboratoryjnych pobrano z powierzchni błony śluzowej jamy ustnej za pomocą wymazu szczoteczkowego. Pobrany materiał został przeanalizowany pod kątem ekspresji wybranych genów przed i po zastosowaniu u pacjenta chemioterapii. Do badania wybrano geny biorące udział w procesie apoptozy, przyczyniającym się do powstawania zmian na błonie śluzowej podczas stosowania chemioterapii.

Protokół badań został zatwierdzony przez Komisję Bioetyczną przy Uniwersytecie Medycznym w Poznaniu (Zgoda Nr 429-07)

#### 4.1 Charakterystyka badanej grupy

W badaniach wzięło udział 82 pacjentów w wieku od 39 do 77 lat (średnia wieku 58,5 SD  $\pm$  6,3) w tym 25 kobiet i 57 mężczyzn leczonych na Oddziale Onkologii Pulmonologicznej Wielkopolskiego Centrum Pulmonologii i Torakochirurgii w Poznaniu. Część badanych (11%) była uprzednio leczona chirurgicznie (usunięcie płata lub płatów płuca). Żaden z chorych nie otrzymywał wcześniej chemio lub radioterapii.

W badanej grupie rozpoznano uprzednio raka płuca w różnym stopniu zaawansowania od IIa do IV. U 80 % badanych był to rak o typie płaskonabłonkowym, a u 20% gruczolakoraki.

Tab.I Rozkład zaawansowania procesu nowotworowego w badanej grupie.

IIa	IIb	IIIa	IIIb	IV
7%	11%	6%	22%	54%

Wszyscy badani spełniali kryteria stanu ogólnego zdrowia kwalifikującego do leczenia z zastosowaniem chemioterapii w dwóch schematach: u 56% pacjentów była to cisplatyna z winorelbiną (PN), a u 44% - cisplatyna z etopozydem (PE).

U części objętych badaniem pacjentów występowały dodatkowo także choroby ogólne takie jak: nadciśnienie (8%) i cukrzyca (4%), choroba wieńcowa (4%). Ponieważ były to choroby o uregulowanym przebiegu pacjenci nie zostali wykluczeni z badania.

U wszystkich pacjentów zarówno przed jak i po zastosowaniu leczenia chemioterapią przeprowadzono badanie jamy ustnej oraz wywiad stomatologiczny.

#### 4.2 Badanie stanu jamy ustnej z zastosowaniem wskaźników epidemiologicznych

Badanie oceniające status zębowy przeprowadzono w warunkach sztucznego oświetlenia przy użyciu lusterka stomatologicznego oraz zgłębnika. Wyniki odnotowywano na diagramie zębowym, a wartości wskaźników obliczano i zapisywano na karcie pacjenta.

Stan jamy ustnej oceniano w oparciu o kryteria WHO z zastosowaniem wskaźnika DMFT oraz OHI-S.

##### *Wskaźnik DMFT*

Oceniano liczbę zębów z próchnicą, zębów usuniętych oraz wypełnionych, których suma składa się na wartość DMFT.

##### *Wskaźnik OHI-S*

Oceniano występowanie osadu i kamienia na czterech powierzchniach policzkowych zębów 16, 11, 26, 31 oraz na dwóch powierzchniach językowych zębów 36, 46. Po zsumowaniu wyników otrzymywano wartość OHI-S.

Interpretacja wyników OHI-S opiera się na przedziałach podanych w publikacji Greene i Vermilion (46) i jest ona następująca:

0 - bardzo dobra higiena

0,1 – 1,2 - dobra higiena

1,3 – 3,0 - dostateczna higiena

3,1 – 6,0 - mierna higiena

U wszystkich chorych oceniano również obecność i rozległość uzupełnień protetycznych i ich potencjalny wpływ na wystąpienie zmian o charakterze OM.

#### 4.3 Badanie stanu błony śluzowej jamy ustnej z zastosowaniem NCI-CTCAE (ang. *National Cancer Institute Common Toxicity Criteria Adverse Events*)

Ocenę stanu błony śluzowej jamy ustnej przed i po zastosowanym leczeniu przeprowadzono z użyciem skali NCI-CTCAE (47).

Jest to 5-stopniowa skala 1 do 5 gdzie:

1 – oznacza bezbolesne zaczerwienienie z zachowaną możliwością spożywania pokarmów stałych

2 - bolesne zaczerwienienia i owrzodzenia, pacjent wymaga diety półpłynnej lub płynnej

3 - bolesne zaczerwienienia i owrzodzenia pokryte nalotem rzekomobłoniastym w połączeniu z utrudnionym połykaniem mogącym prowadzić do konieczności dożylnego podawania płynów

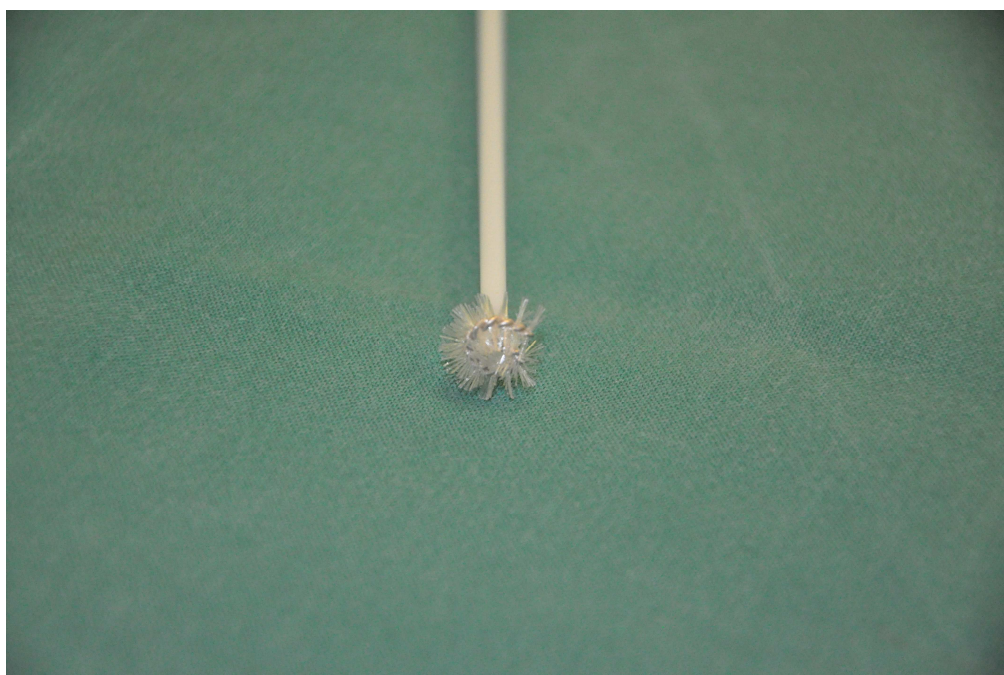
4 - rozległe martwicze owrzodzenia z ewentualną koniecznością żywienia pozajelitowego i profilaktycznej intubacji , spontaniczne krwawienia

5-powikłania śmiertelne

Ponadto pacjenci oceniali na podanej skali (NRS) od 0 do 10 natężenie bólu zlokalizowanego w obrębie jamy ustnej.

#### 4.4 Pobieranie wymazu szczoteczkowego

W grupie pięciu losowo wybranych pacjentów pobrano wymaz szczoteczkowy z błony śluzowej policzka przed zastosowaną chemioterapią oraz w ciągu 3 dni od pierwszego cyklu leczenia. Szczoteczka użyta do wymazu - produkcji OralCDx Laboratories <sup>TM</sup>- jest tak zaprojektowana, aby skutecznie i bezboleśnie pobrać wymaz z błony śluzowej jamy ustnej przy diagnostyce zmian przednowotworowych. Wymaz pobierano przeciągając włosiem szczoteczki po powierzchni błony śluzowej od 5-10 razy stosując ruch okrężny aż do osiągnięcia różowego podbarwienia materiału, jednak unikając rozkrwawienia błony śluzowej. Następnie szczoteczkę z pobranym materiałem szczelnie zamykano w plastikowym, jałowym pojemniku i przewożono na lodzie do laboratorium.



Ryc.1 Szczoteczka produkcji OralCDx Laboratories <sup>TM</sup> służąca do wymazu z bony śluzowej





Ryc. 2 Pobranie wymazu szczoteczkowego z błony śluzowej policzka

#### 4.5 Badania laboratoryjne

W ramach badań laboratoryjnych przeprowadzono następujące oznaczenia

##### 4.5.1 Izolacja RNA

Całkowity RNA izolowano według zmodyfikowanej metody Chomczyńskiego i Sacchi (48). Komórki błony śluzowej jamy ustnej poddano lizie mieszaniną fenolu i izotiocyanianu guanidyny (1ml) (TRI, Sigma-Aldrich, Deisenhofer, Germany). Do prób dodawano następnie chloroform w objętości równej 1/5 objętości odczynnika TRI (200  $\mu$ l). Przygotowane w ten sposób próby wytrząsano i inkubowano na lodzie przez 5 minut. Po inkubacji próby wirowano przez 15 minut, w temperaturze 4°C, 15000 x g. W wyniku wirowania próby rozdzielały się na trzy warstwy; (1) fazę wodną (zawierającą RNA), (2) fazę

pośrednią (interfazę z cienką warstwą DNA) oraz (3) fazę fenolowo-chloroformową zawierającą białko i struktury subkomórkowe. Do dalszej izolacji pobierano 500  $\mu$ l fazy wodnej i przenoszono do nowych probówek. RNA wytrącano przez dodanie izopropanolu w stosunku objętościowym 1:1. Przygotowane w ten sposób próby umieszczano w zamrażarce w temperaturze  $-80^{\circ}\text{C}$ . Po upływie 24 godz. probówki wirowano 15 minut,  $4^{\circ}\text{C}$ ,  $15000 \times g$ . Po odwirowaniu, usuwano supernatant, a powstały osad RNA przemywano dwukrotnie przy użyciu schłodzonego 75% etanolu, wirowano 15 minut (w temp.  $4^{\circ}\text{C}$ )  $15000 \times g$ , a następnie suszono. Wyszuszony osad RNA rozpuszczano w 10  $\mu$ l wody dejonizowanej, wolnej od RNaz. Tak przygotowany RNA wykorzystywano, jako matrycę do syntezy cDNA w procesie odwrotnej transkrypcji, do której użyto 0,5  $\mu$ g całkowitego RNA.

Do analizy ilościowo-jakościowej prób RNA posłużono się pomiarem spektrofotometrycznym. Preparaty RNA rozcieńczono wodą w proporcji 2  $\mu$ l RNA: 98  $\mu$ l  $\text{H}_2\text{O}$ , mieszano i wirowano. Do kalibracji spektrofotometru wykorzystano 100  $\mu$ l wody.

Stężenie RNA oznaczano przy długości fali 260 nm. Stopień zanieczyszczenia białkiem obliczano na podstawie stosunku absorbancji  $A_{260}/A_{280}$ .

Wartość współczynnika (ang. *Ratio*)  $A_{260}/A_{280}$  między 1,8 – 2,0 oznaczała, że preparaty są wystarczająco oczyszczone.

#### 4.5.2 Odwrotna transkrypcja

Reakcje odwrotnej transkrypcji przeprowadzano w 1,5 ml probówkach (*Eppendorf*). Całą procedurę wykonywano pod komorą laminarną na lodzie. Objętość RNA jaką wzięto do przepisania na cDNA poszczególnych prób przeliczono na 0,5  $\mu$ g. Do RNA znajdującego się w probówce dodawano 4  $\mu$ l dNTP (2,5 mM każdego dNTP), 1  $\mu$ l oligo(dT)23 (0,5  $\mu$ g/ $\mu$ l) oraz 0,5  $\mu$ l wody dejonizowanej. Probówkę wytrząsano, krótko wirowano i umieszczano na

5 minut w 65°C w termobloku (Eppendorf-*thermomixer comfort*, Niemcy) w celu denaturacji RNA. Następnie próbkę umieszczano w lodzie na 2 minuty, wirowano, ponownie umieszczano na lodzie i dodawano następujące składniki: 4 µl pięciokrotnie stężonego buforu First Strand Buffer (*Invitrogen*), 2 µl DTT 0,1 M (*Invitrogen*), 0,5 µl odwrotnej transkryptazy SuperScript™ II Reverse Transcriptase 200 U/µl (*Invitrogen*) oraz 0,25 µl inhibitora rybonukleaz Rnase OUT 40 U/µl (*Invitrogen*). Probówkę wytrząsano, a następnie krótko wirowano i umieszczano w termobloku. Syntezę cDNA przeprowadzono przez 50 minut w temperaturze 37°C. Następnie próbki umieszczano na 15 minut w drugim termobloku w 65°C w celu zatrzymania reakcji. Uzyskany cDNA służył, jako matryca do reakcji *PCRarray*.

#### 4.5.3 Amplifikacja cDNA w czasie rzeczywistym

Poziom ekspresji genów został oznaczony techniką *PCRarray* za pomocą aparatu LightCycler 480 Instrument (Roche™) oraz oprogramowania LightCycler Software 1.5. *PCRarray* jest metodą ilościowego oznaczenia DNA, która pozwala na jednoczesne monitorowanie zmian stężenia kilkudziesięciu, a nawet kilkuset produktów PCR w czasie trwania reakcji.

Powstawanie produktów PCR monitorowano poprzez pomiar sygnału fluorescencji emitowanej przez sondy zastosowane w reakcji. Użycie swoistych sond hydrolizujących (typu *TaqMan* ze zmodyfikowanym nukleotydem LNA), znakowanych fluorescencyjnie umiejscowionych pomiędzy parą starterów PCR, rozwiązuje problem nieswoistości fluorescencyjnej obecnej przy zastosowaniu barwnika SYBR Green I. W metodzie *TaqMan* wykorzystuje się swoistą dla amplifikowanego fragmentu DNA sondę, wyznakowaną na

końcach cząsteczkami fluorochromów. Na końcu 5' sondy znajduje się barwnik reporterowy, a na końcu 3' cząsteczka wygaszająca fluorescencję. Kiedy sonda jest nienaruszona, wygaszacz znajdujący się blisko reportera, wygasza jego fluorescencję. Podczas reakcji PCR sonda zostaje zdegradowana dzięki aktywności 5' nukleazowej polimerazy. Rozdział obu fluorochromów umożliwia emisję fluorescencji przez reporter. Wzrost fluorescencji monitorowany jest po każdym zakończonym cyklu elongacyjnym. Poziom fluorescencji jest wprost proporcjonalny do ilości powstającego produktu.

Reakcję *PCRarray* prowadzono na komercyjnie przygotowanych płytках 96-dołkowych (RealTime ready Human Apoptosis Panel 96, Roche™), służącej do analizy 84 wybranych genów pro- i anty- apoptotycznych. W każdym dołku płytki znajduje się odpowiednio dobrana sonda komplementarna do sekwencji danego genu oraz startery w kierunku 5'→3' oraz 3'→5'. Do każdego dołka naniesiono 10 µl mieszaniny reakcyjnej, której skład był zawsze taki sam dla analizy ekspresji genów jednego pacjenta:

- 20 µl cDNA (0,2 µl na 1 reakcję)
- 480 µl LigthCycler 480 Probes Master w składzie: (4,8 µl na 1 reakcję)
- 500 µl wody (5 µl na 1 reakcję)

Reakcja *PCRarray* obejmowała następujące etapy:

- denaturacja wstępna – 95° C, 10 min. (aktywacja polimerazy)
- oznaczenie ilościowe ekspresji genów (50 cykli):
  - denaturacja – 95° C, 10 s. (rozdzielenie nici DNA)
  - przyłączanie starterów – 60° C, 30s.

- wydłużanie starterów (synteza nici komplementarnej) – 72° C, 1s.

- chłodzenie aparatu.

W ocenie ekspresji posługiwano się względną metodą ilościową (ang. *relative quantification*) pozwalającą na ustalenie względnej różnicy między badanymi próbkami (krotności wzrostu, zmiany ilości specyficznego cDNA pacjentów przed i po chemioterapii). Wyniki oznaczeń ilościowych badanych cDNA normalizowano względem standardów wewnętrznych, czyli cDNA genów konstytutywnych (ang. *house-keeping genes*), których ekspresja jest względnie stała i nie podlega regulacji pod wpływem czynników zewnętrznych. W celu analizy funkcji genów kodujących białka zaangażowane w szlaki pro- i anty-apoptotyczne zastosowano bioinformatyczną bazę danych David bioinformatics resources 6.7



Ryc. 3 96 dołkowa płytka RealTime ready Human Apoptosis Panel 96, Roche™

#### 4.6 Analiza statystyczna uzyskanych wyników

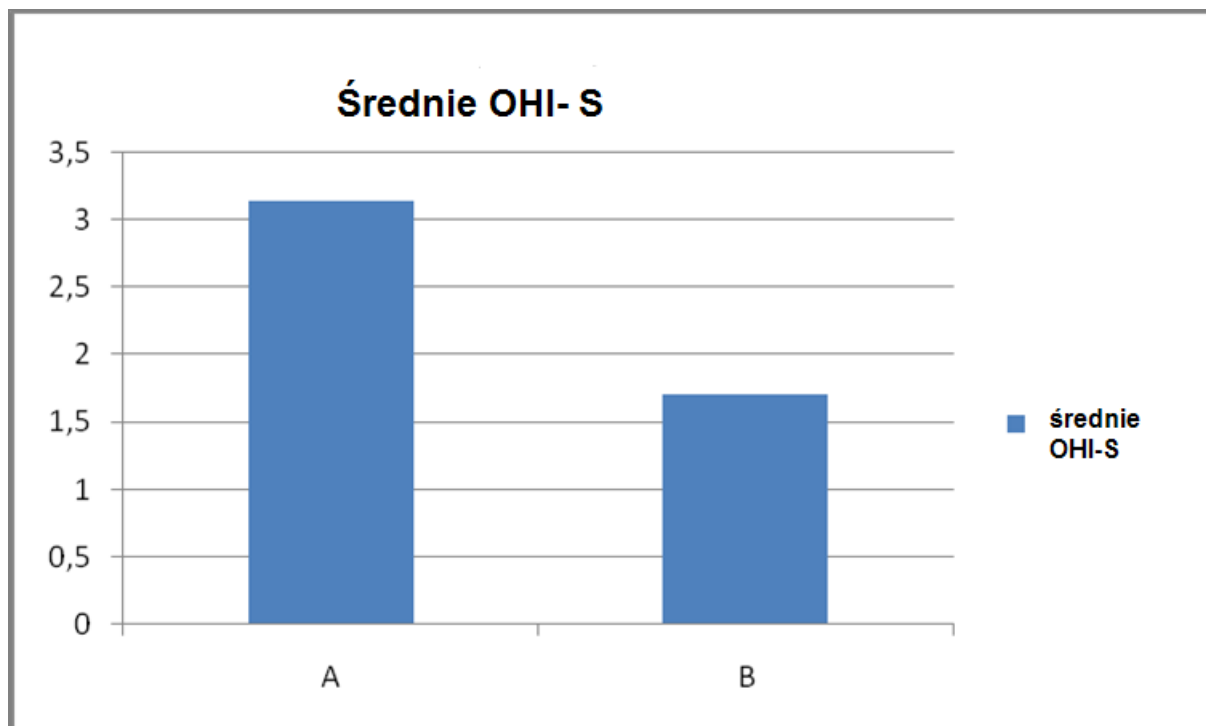
Otrzymane wyniki poddano analizie statystycznej posługując się programem Statistica 8.0. Dla oceny różnic zastosowano testy nieparametryczne Manna-Whitney'a , test dokładny Fishera oraz test chi kwadrat z poprawką Yates'a. Jako kryterium różnic statystycznie istotnych ustalono poziom istotności  $p \leq 0,05$ .

### 5. Wyniki

#### 5.1 Badanie kliniczne

##### 5.1.1 Wskaźnik OHI-S

Średnie OHI-S w zbadanej grupie wyniosło  $1,89 \text{ SD} \pm 0,96$  (wahało się od 5,0 do 0,6) . Średnie OHI-S u pacjentów, u których stwierdzono zmiany o charakterze OM wyniosło  $3,15 \text{ SD} \pm 1,3$ . Z przedstawionej tabeli wynika, iż było ono znamienne wyższe aniżeli w grupie bez objawów OM -gdzie średnie OHI-S wyniosło  $1,71 \text{ SD} \pm 0,96$  ( $p \leq 0,05$ ; Tab. II)



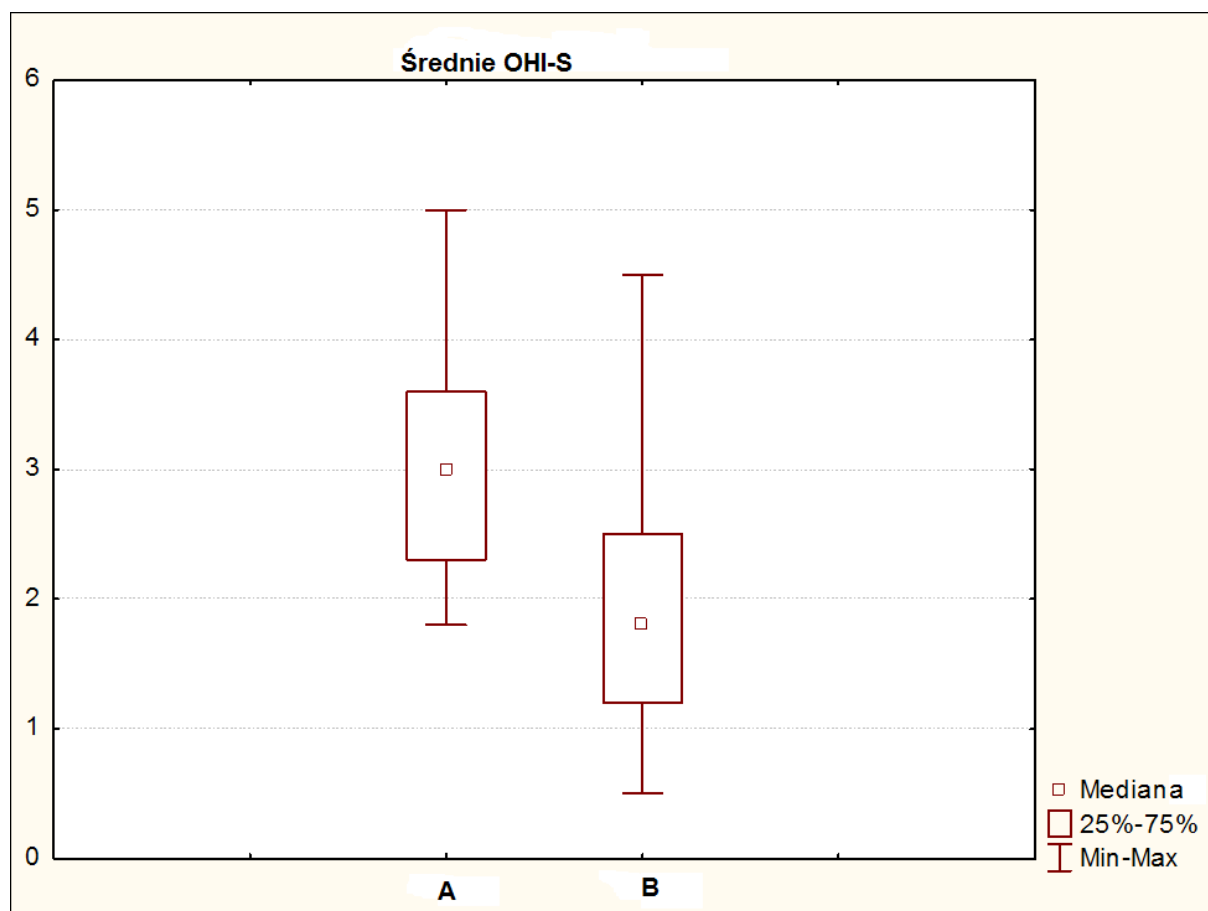
Ryc. 4 Średnie wartości wskaźnika OHI-S w badanych grupach

A - pacjenci z objawami OM

B - pacjenci bez objawów OM

Tab.II Wyniki analizy statystycznej średniej wartości OHI-S dla obu badanych grup A i B z użyciem testu Manna-Whitney'a. Wyniki zgodne z poziomem istotności  $p \leq 0,05$ .

	Grupa A		Grupa B		poziom istotności testu p
	średnia SD	mediana	średnia SD	mediana	
OHI-S	3,15 SD:1,3	3,0	1,71 SD:0,96	1,8	0,037924



Ryc. 5 Wykres ramkowy przedstawiający średnie OHI – S dla badanych grup A i B

A - pacjenci z objawami OM

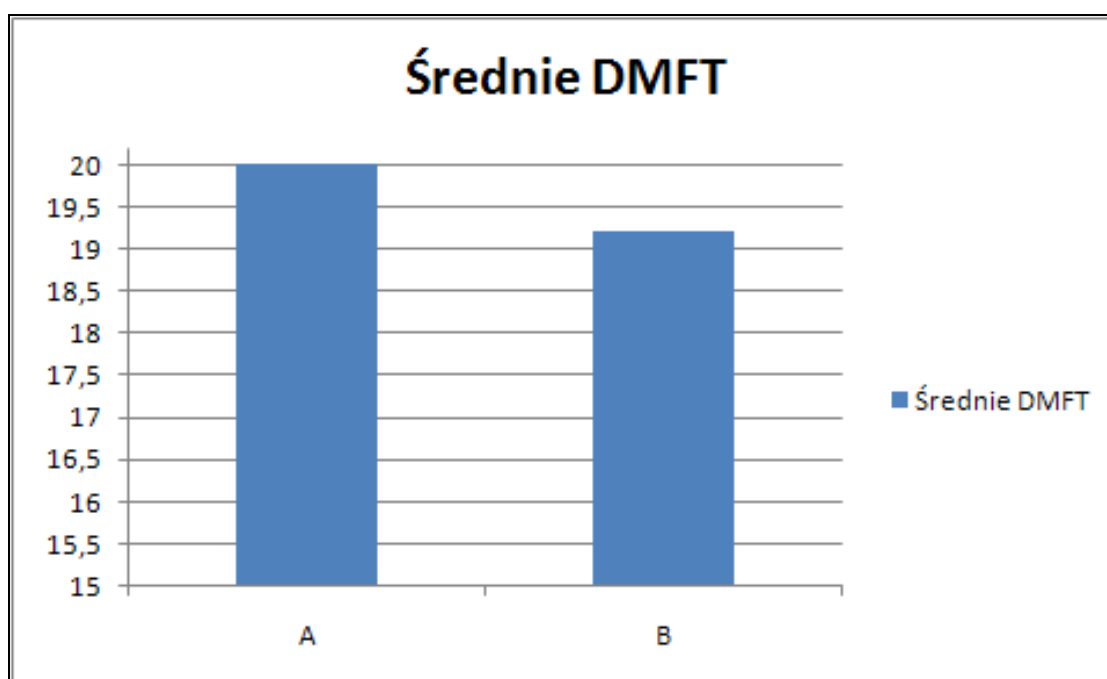
B - pacjenci bez objawów OM



### 5.1.2 Wskaźnik DMFT

Średnia wartość wskaźnika DMFT w całej badanej grupie wyniosła  $18,6 \text{ SD} \pm 7$ .

Szczegółowe dane o składowych wskaźnika przedstawiono graficznie na rycinach 6 i 7.



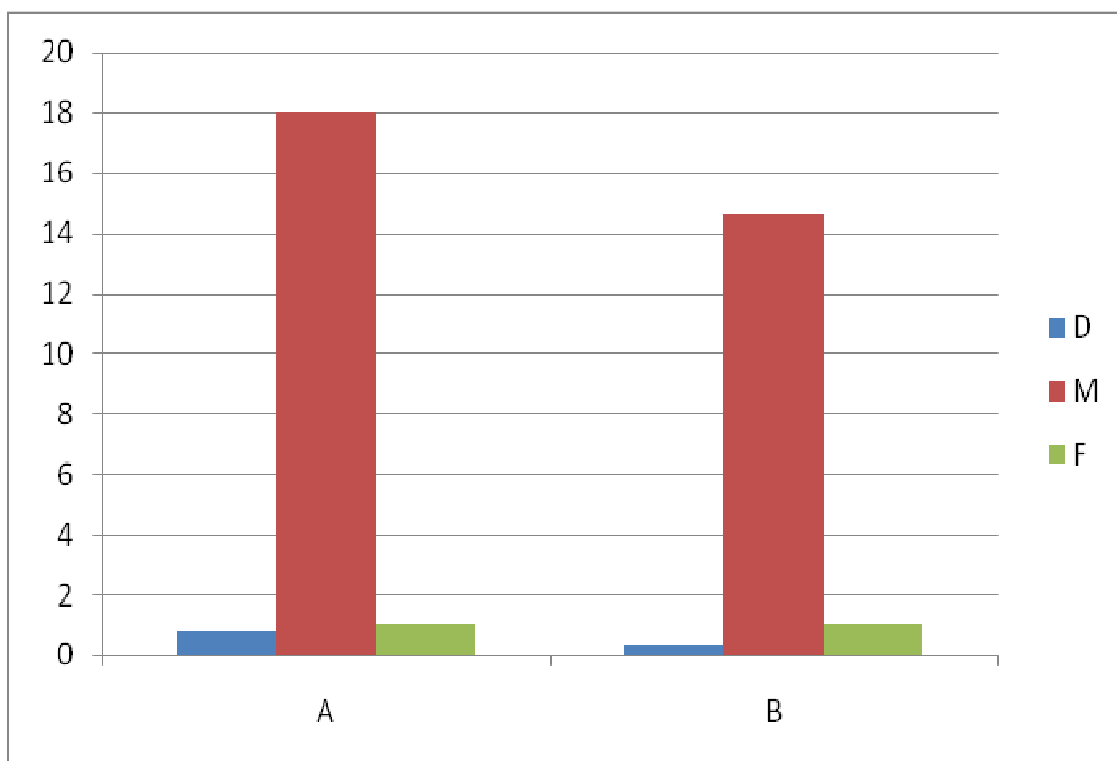
Ryc. 6 Średnia wartość wskaźnika DMFT w obu grupach pacjentów A i B.

A-pacjenci z objawami OM

B-pacjenci bez objawów OM

Tab.III Wyniki analizy statystycznej średniej wartości DMFT dla obu badanych grup A i B z użyciem testu Manna-Whitney'a. Wyniki zgodne z poziomem istotności  $p \leq 0,05$ .

	Grupa A		Grupa B		poziom istotności testu p
	średnia SD	mediana	średnia SD	mediana	
średnie DMFT	20 SD: 7,7	24	19,2 SD: 7,1	20	0,564608



Ryc. 7 Poszczególne składniki wskaźnika DMFT w obu badanych grupach.

A-pacjenci z objawami OM

B-pacjenci bez objawów OM

23,4% spośród badanych pacjentów było bezzębnych, a u 26% stwierdzono stan określany jako uzębienie funkcjonalne co oznacza obecność w jamie ustnej minimum 20 zębów.

Po przeanalizowaniu obecności i rozległości ruchomych uzupełnień protetycznych użytkowanych przez badanych pacjentów stwierdzono ich istotny statystycznie ( $p < 0,05$ ) wpływ na występowanie zmian o charakterze OM (Tab.IV). Jako rozległe uzupełnienia protetyczne traktowano protezy całkowite i częściowe osiadające. U pacjentów użytkujących tego rodzaju uzupełnienia protetyczne statystycznie częściej pojawiały się objawy OM.

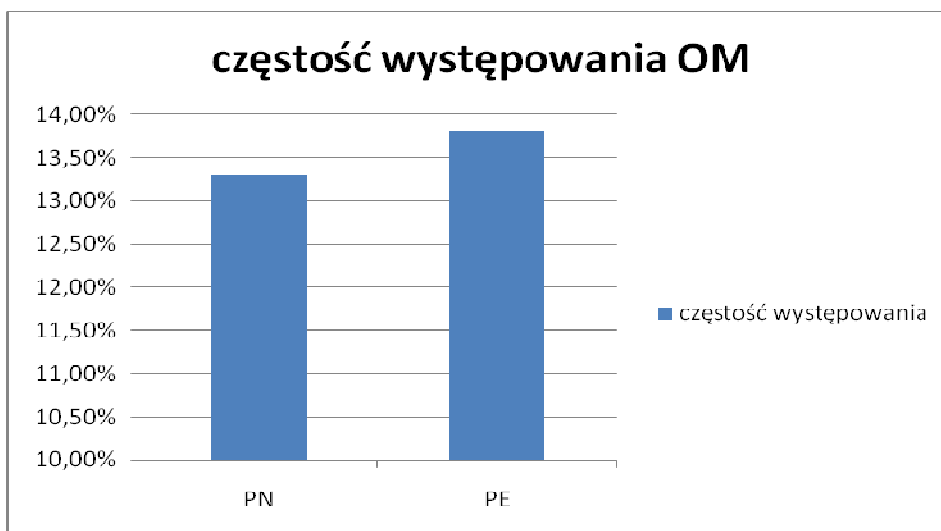
Tab. IV Wyniki analizy zależności obecności rozległych uzupełnień protetycznych a występowaniem zmian OM dla obu badanych grup A i B z użyciem testu dokładnego Fishera. Wyniki zgodne z poziomem istotności  $p \leq 0,05$ .

OM rozległa proteza	tak	nie	suma	Poziom istotności p
tak	10	42	52	<b>0,038</b>
nie	1	29	30	
suma	11	71	82	

### 5.1.3 NCI-CTCAE

Obecność zmian na bonie śluzowej jamy ustnej oceniano w dwóch schematach leczenia: cisplatyna z winorelbina (PN) oraz cisplatyna z etopozydem (PE). Stopień zaawansowania zmian oceniano na podstawie skali ocen toksyczności NCI-CTCAE.

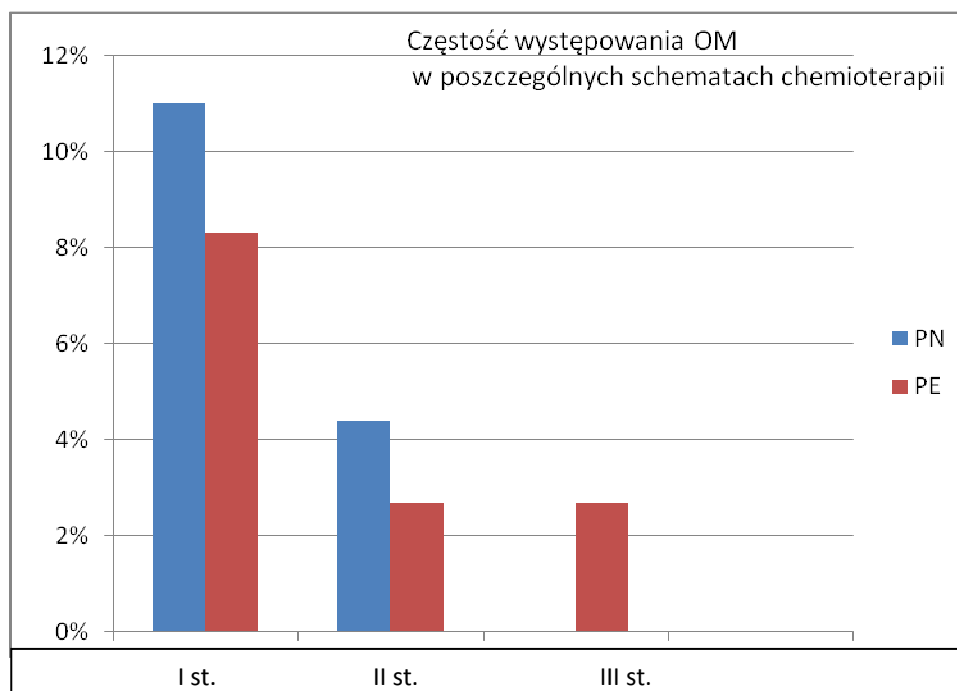
Ogółem u 13,5% badanych pacjentów pojawiły się zmiany o charakterze OM w różnym stopniu nasilenia. Częstość występowania tych zmian i ich nasilenie w zależności od schematu leczenia przedstawiają ryciny 8 i 9 oraz tabele V i VI.



Ryc. 8 Częstość występowania OM w grupie pacjentów poddawanych schematom leczenia cisplatyna/winorelbina PN i cisplatyna/etopozyd PE.

Tab.V Wyniki analizy statystycznej częstości występowania zmian o charakterze OM w zależności od schematu leczenia: cisplatyna / winorelbina PN i cisplatyna / etopozyd PE z użyciem testu chi kwadrat  $\chi^2$  z poprawką Yates'a. Wyniki zgodne z poziomem istotności  $p \leq 0,05$ .

OM / Schemat chemioterapii	tak	nie	suma	poziom istotności testu p
PN	6	40	46	0,8298
PE	5	31	36	
suma	11	71	82	



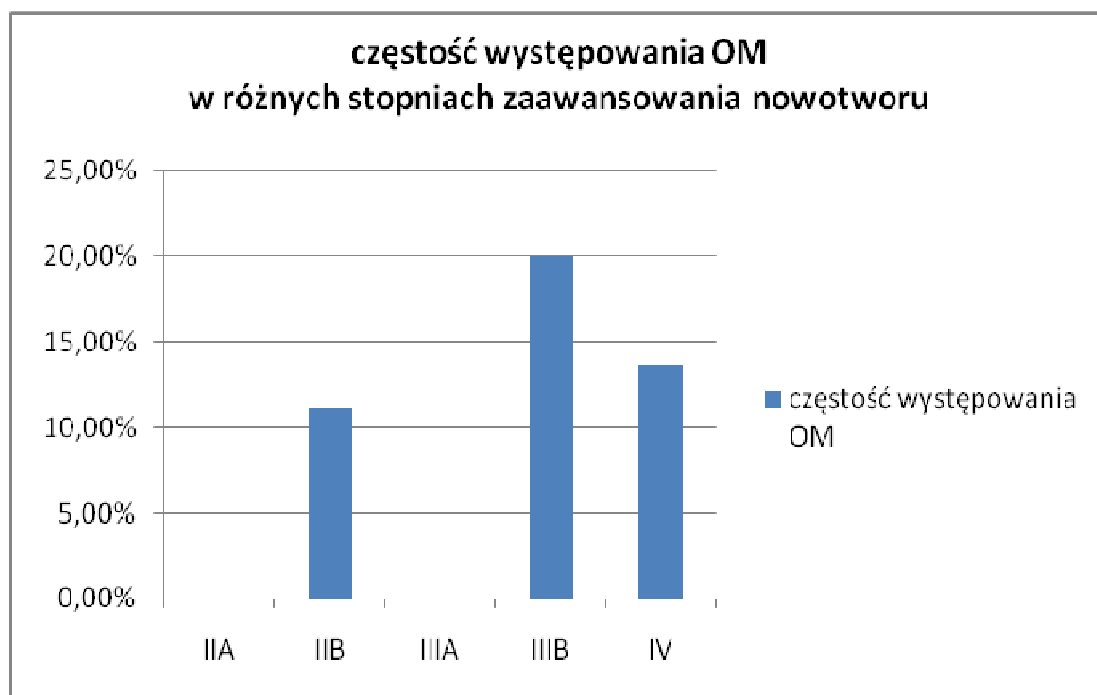
Ryc. 9 Częstość występowania OM w różnym stopniu zaawansowania wg. NCI-CTCAE w obu zastosowanych schematach chemioterapii.

Badania nie wykazały istotnych statystycznie różnic pomiędzy zastosowanymi schematami chemioterapii. Najczęściej występujące zmiany (73% wszystkich przypadków OM) były w I stopniu zaawansowania wg. NCI-CTCAE.

Tab. VI Stopnie zaawansowania OM w poszczególnych schematach chemioterapii.

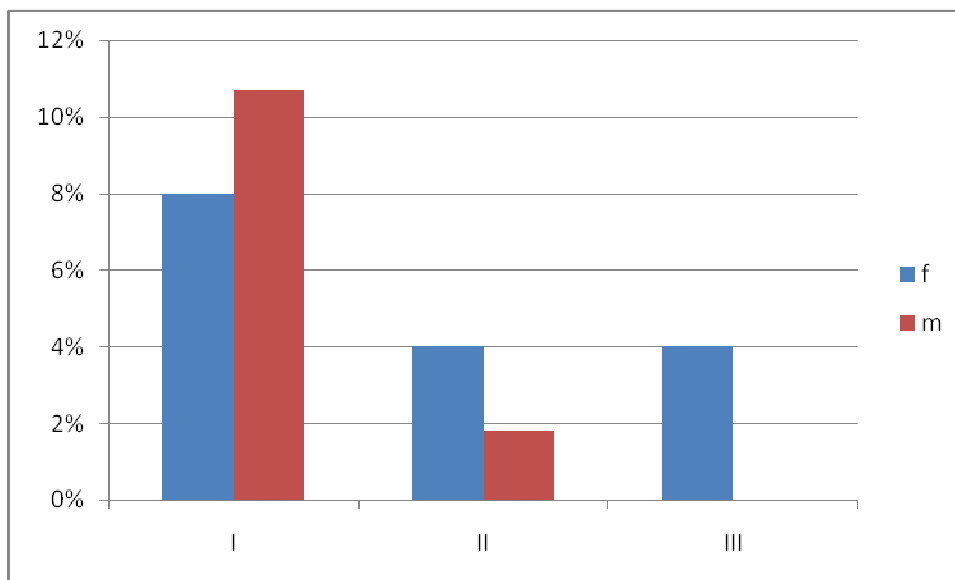
	Stopień I	Stopień II	Stopień III	Stopień IV,V
PN	11%	4,4%	0	0
PE	8,3%	2,7%	2,7%	0

Nie wykazano istotnej statystycznie różnicy w nasileniu występowaniu zmian o charakterze OM w zależności od stopnia zaawansowania nowotworu. (Ryc. 10)



Ryc.10 Częstość występowania zmian o charakterze OM w zależności od stopnia zaawansowania nowotworu.

Zmiany o charakterze OM wystąpiły u 16% badanych kobiet i 12,5 % badanych mężczyzn. Nie wykazano korelacji pomiędzy występowaniem zmian o charakterze OM a płcią badanych pacjentów (Ryc.11, Tab.VII)

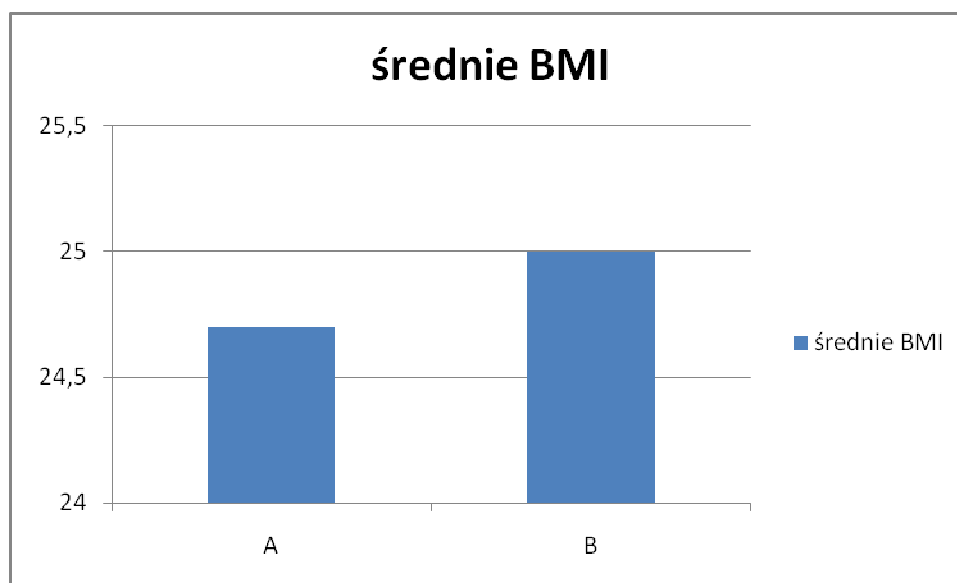


Ryc. 11 Częstość występowania zmian o charakterze OM w różnym stopniu zaawansowania wg.NCI-CTCAE u obu płci.

Tab. VII Wyniki analizy statystycznej częstości występowania zmian o charakterze OM w zależności od stopnia zaawansowania nowotworu z użyciem testu dokładnego Fishera. Wyniki zgodne z poziomem istotności  $p \leq 0,05$ .

OM PŁEĆ	tak	nie	suma	poziom istotności testu p
K	4	21	25	0,4456
M	7	50	57	
suma	11	71	82	

W całej badanej grupie oznaczono wskaźnik masy ciała BMI. Różnice w badanych grupach przedstawia Ryc.12 . Nie wykazano korelacji pomiędzy występowaniem OM a wskaźnikiem BMI badanych pacjentów (Tab.VIII).



Ryc. 12 Średnie BMI w obu badanych grupach.

A - pacjenci z objawami OM

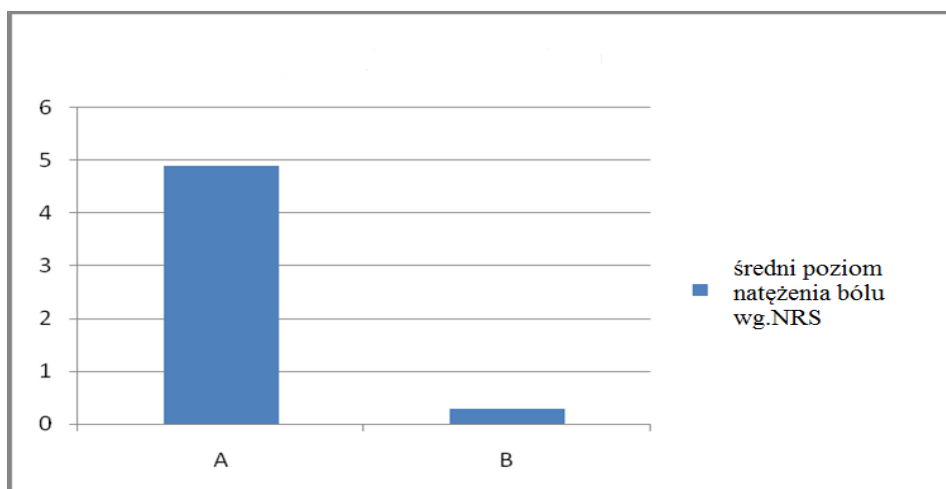
B - pacjenci bez objawów OM



Tab.VIII Wyniki analizy statystycznej średniej wartości BMI dla obu badanych grup A i B z użyciem testu Manna - Whitney'a. Wyniki zgodne z poziomem istotności  $p \leq 0,05$ .

	Grupa A		Grupa B		poziom istotności testu p
	średnia SD	mediana	średnia SD	mediana	
średnie BMI	24,7 SD:3,5	24,8	25 SD:4	24,9	0,679182

Różnice w poziomie natężenia bólu w obu badanych grupach przedstawia ryc.13. Potwierdzono statystycznie istotną różnicę pomiędzy natężeniem bólu w obu badanych grupach (Tab.IX) .



Ryc. 13 Średni poziom natężenia bólu w obu grupach.

A - pacjenci z objawami OM

B - pacjenci bez objawów OM

Tab.IX Wyniki analizy statystycznej średniego natężenia poziomu bólu wg. NRS dla obu badanych grup A i B z użyciem testu Manna - Whitney'a. Wyniki zgodne z poziomem istotności  $p \leq 0,05$ .

	Grupa A		Grupa B		poziom istotności testu p
	średnia SD	mediana	średnia SD	mediana	
Średnie natężenie bólu	4,9 SD:1,8	5	0,2 SD:0,69	0	0,001898

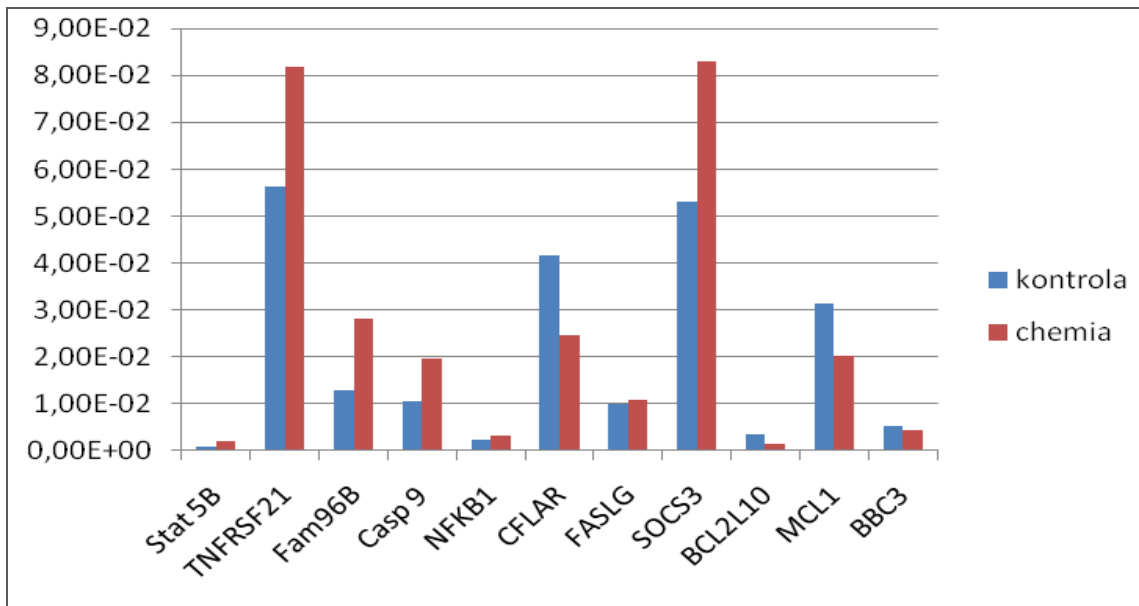
## 5.2 Badania laboratoryjne

### 5.2.1 RealTime ready Human Apoptosis Panel 96 (Roche <sup>TM</sup>)

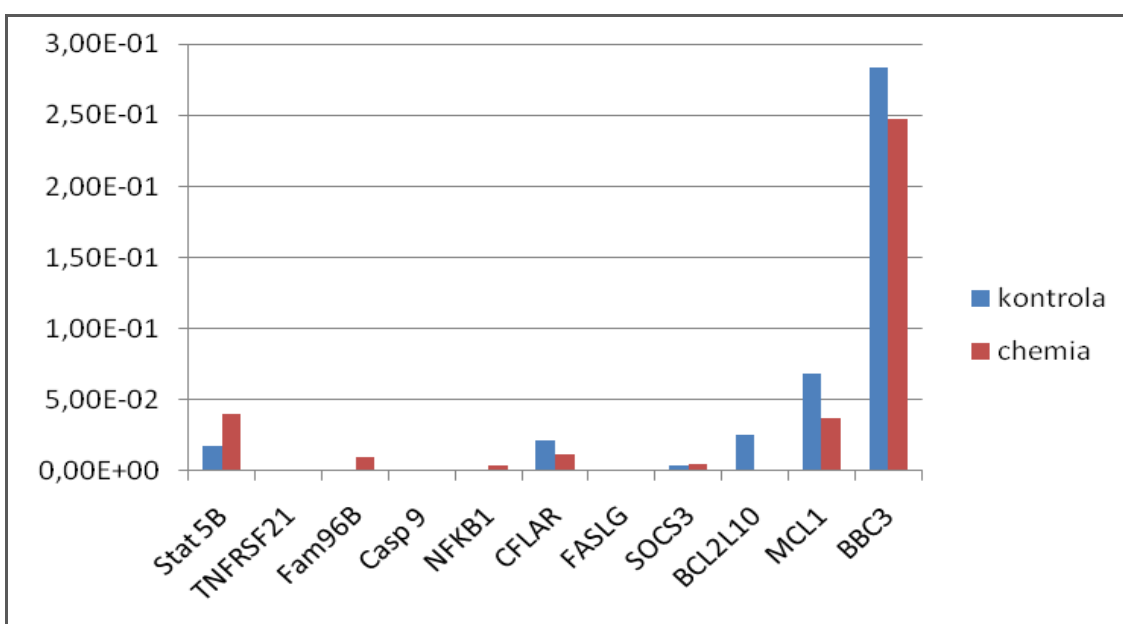
Badania przeprowadzono w celu wytypowania genów kandydujących. Ze względu na podejrzenie istnienia podłoża genetycznego w występowaniu OM poszukiwaliśmy jednakowo wzmożonej lub obniżonej ekspresji genów u badanych pacjentów pod wpływem podania chemioterapii. Do przeprowadzenia badania posłużyła fabrycznie przygotowana płytko do oznaczenia 84 genów związanych z procesem apoptozy. Wyboru płytki dokonano na podstawie publikacji omawiających rolę apoptozy w powstawaniu zmian o typie Oral Mucositis.

Różnice w ekspresji poszczególnych genów przed i po zastosowaniu chemioterapii w schemacie cisplatyna / winorelbina (PN) u pięciu losowo wybranych pacjentów przedstawiają ryciny 14, 15, 16, 17, 18.

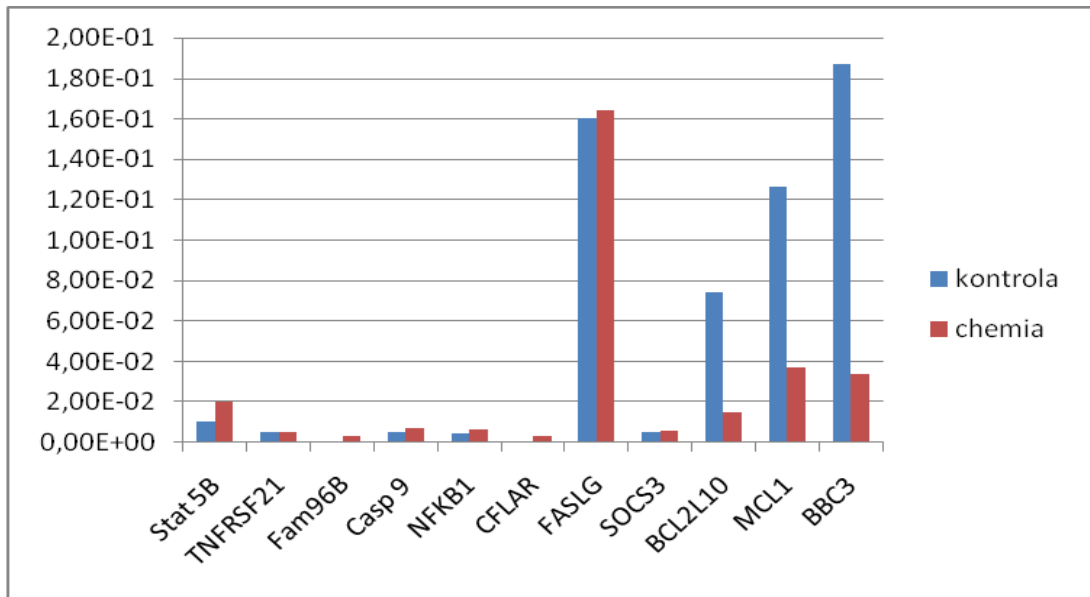
W badaniach molekularnych wykazano duże różnice w ekspresji genów u poszczególnych pacjentów. Spośród 84 analizowanych genów w 10 z nich wykazano stałą zmianę w ich ekspresji u wszystkich przeanalizowanych pacjentów. Zwiększonej ekspresji po podaniu chemioterapii uległy: TNFRSF21, Fam96B, Casp9, NF-*κ*B, SOCS3, FASLG. Wśród pozostałych genów: CFLAR, Bcl2L10, Mcl1, BBC3 zaobserwowano spadek w ekspresji. Ponadto u czterech pacjentów po podaniu chemioterapii nastąpił nieznaczny wzrost ekspresji Stat5b, a u jednego pacjenta oznaczonego w spisie numerem 5 po podaniu chemioterapii poziom Stat5b obniżył się.



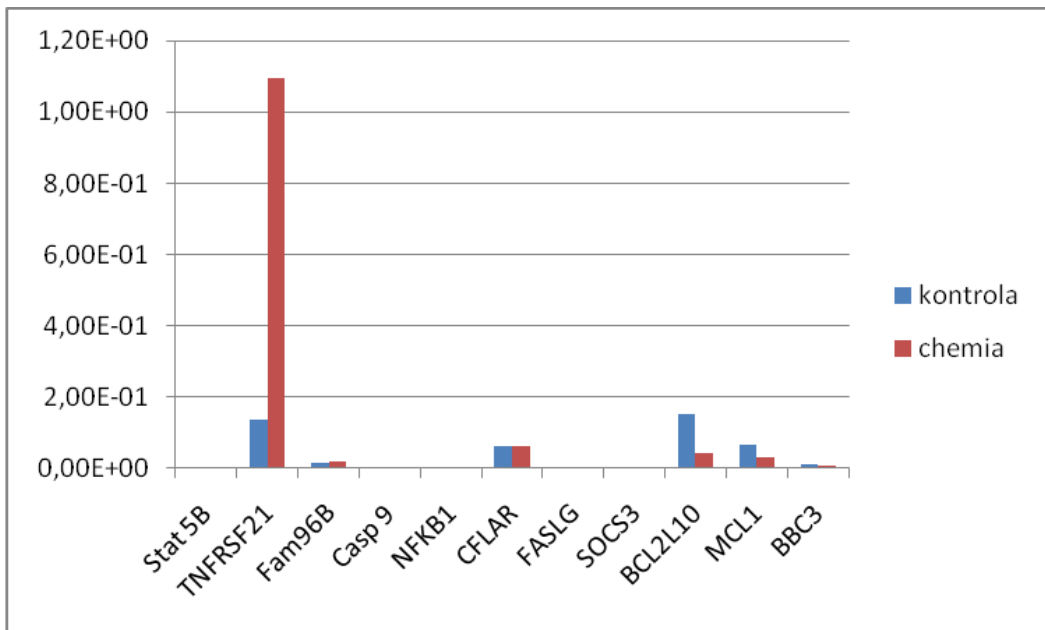
Ryc.14 Ekspresja wybranych genów przed (■ kontrola) i po podaniu chemioterapii (■ chemia) u pacjenta nr.1



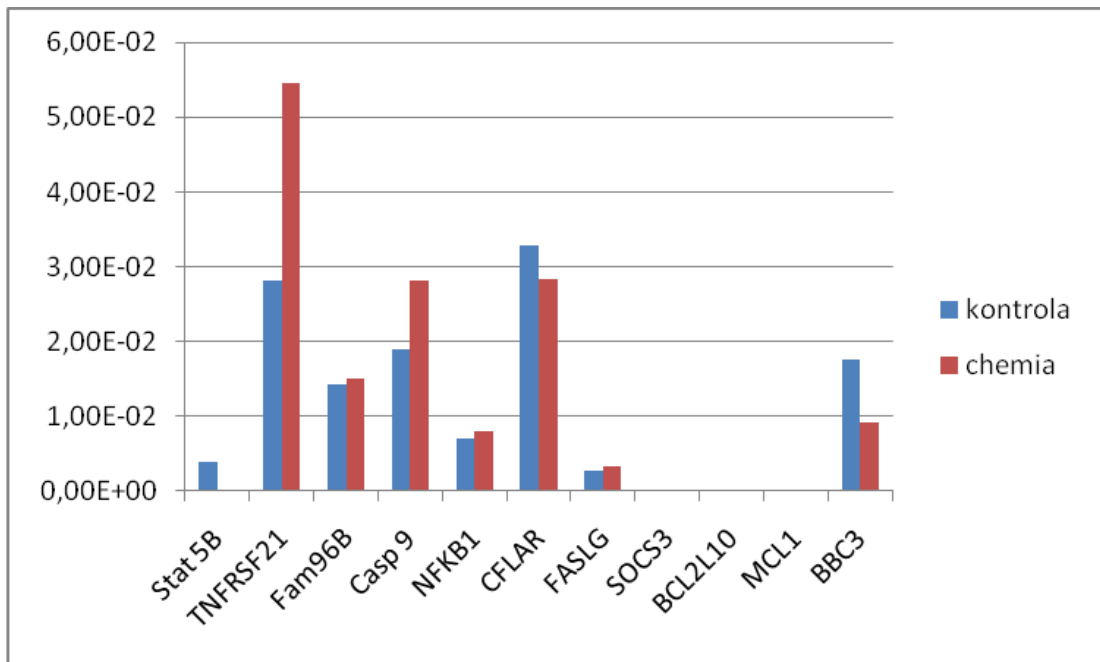
Ryc.15 Ekspresja wybranych genów przed (■ kontrola) i po podaniu chemioterapii (■ chemia) u pacjenta nr.2



Ryc 16. Ekspresja wybranych genów przed (■ kontrola) i po podaniu chemioterapii (■ chemia) u pacjenta nr.3



Ryc.17 Ekspresja wybranych genów przed (■ kontrola) i po podaniu chemioterapii (■ chemia) u pacjenta nr.4



Ryc.18 Ekspresja wybranych genów przed (■ kontrola) i po podaniu chemioterapii (■ chemia) u pacjenta nr.5

## 6. Omówienie wyników i dyskusja

### 6.1 Badanie kliniczne jamy ustnej

#### 6.1.1 Wskaźnik OHI-S

Średnia wartość wskaźnika higieny OHI-S w całej badanej grupie wyniosła 1,89. Ze względu na brak danych w aktualnej literaturze na temat wskaźnika higieny OHI-S w populacji polskiej powyżej 44 r. życia uzyskane wyniki można odnieść do badań prowadzonych u osób chorych na stwardnienie rozsiane (SM). Przykładem potwierdzającym nasze obliczenia są obserwacje Chromy z 2009 roku, która w swoich badaniach prowadzonych u pacjentów cierpiących na SM oznaczyła średnie OHI-S na poziomie 2,1 (49).

W badaniach własnych wykazano istotną statystycznie różnicę w poziomie higieny jamy ustnej u pacjentów, u których wystąpiło OM (grupa A; wskaźnik OHI-S = 3,15) w porównaniu z grupą B, u której nie stwierdzono objawów OM, a wskaźnik wyniósł OHI-S = 1,71.

Autorzy badający wpływ chemioterapii na stan jamy ustnej są w zasadzie zgodni, że obniżony poziom higieny jamy ustnej zwiększa ryzyko wystąpienia zmian zapalnych i przyczynia się do ich zaostrzenia. Sonis i Kunz podsumowując ośmioletnie badania prowadzone u pacjentów leczonych z powodu schorzeń onkologicznych wykazali, że zastosowanie w protokole postępowania stałej kontroli stanu jamy ustnej i poziomu higieny zmniejsza liczbę zachorowań na OM (50). Spostrzeżenie to potwierdzają publikacje z ostatnich lat, chociaż niektórzy autorzy, jak na przykład Djuric i Hillie-Kolarov podkreślają, że nie zawsze spadek intensywności zmian zapalnych u pacjentów monitorowanych stomatologicznie i

przestrzegających zasad higieny był zadowalający. Nadal bowiem u części tych chorych utrzymywały się mukotoksyczne objawy chemioterapii (51). Potwierdza to hipotezę o wieloczynnikowym podłożu OM, zgodnie z którą wyeliminowanie jednego z czynników nie likwiduje w całości ryzyka wystąpienia OM.

Niestety, w Polsce nie istnieją ściśle wytyczne dotyczące opieki stomatologicznej pacjentów przebywających na oddziałach onkologicznych. Stąd wydaje się konieczne stworzenie właściwego schematu postępowania stomatologicznego dla tej grupy chorych. Najważniejszym zdaje się być wprowadzenie do standardu leczenia ogólnego procedur związanych z kontrolą stanu zdrowia jamy ustnej i eliminowania czynników ryzyka OM. Wynika z tego przesłanie, że lekarz dentysta lub higienistka stomatologiczna powinni na stałe stanowić część zespołu zajmującego się opieką nad pacjentami onkologicznymi. Współpraca powinna się zaczynać już na etapie kwalifikowania pacjenta do leczenia. Wczesna ocena stanu jamy ustnej, ustalenie planu leczenia, a następnie przeprowadzenie sanacji jamy ustnej i instruktażu higieny może w zasadniczy sposób wpłynąć na dalsze etapy postępowania terapeutycznego i być jednym z warunków powodzenia w leczeniu.

Ponadto zarówno w trakcie chemioterapii jak i po jej zakończeniu pacjenci powinni być poddawani stomatologicznym badaniom kontrolnym. Taki schemat postępowania obowiązuje już w naszym kraju u pacjentów z zaplanowaną radioterapią w obrębie głowy i szyi i stosowanie go przynosi oczekiwane efekty.

Na inny istotny aspekt stanu zdrowia jamy ustnej zwrócił uwagę Óhrn, który wykazał korelacje pomiędzy wzrostem zaawansowania OM, a obniżeniem poziomu sprawności fizycznej pacjenta utrudniającej wykonywanie zabiegów higienicznych w obrębie jamy ustnej (52). Wyniki tych badań są kolejnym potwierdzeniem konieczności włączenia



profesjonalnego zespołu stomatologicznego do opieki nad onkologicznym pacjentem na wszystkich etapach leczenia chemioterapią.

Jak już wspomniano stan jamy ustnej w trakcie chemioterapii wpływa istotnie na ogólne samopoczucie pacjenta, u którego ból, trudności w połykaniu i obrzęk w jamie ustnej mogą prowadzić do zaniku apetytu, spadku masy ciała, a w konsekwencji do znacznego obniżenia jakości życia. Pogarszający się stan ogólny chorego, przez obniżenie jego sprawności fizycznej, dodatkowo pogłębia zaniedbania higieny jamy ustnej zamykając swoisty, niekorzystny „circulus vitiosus”

#### 6.1.2 Wskaźnik DMFT

W polskim piśmiennictwie istnieją nieliczne, głównie przeglądowe publikacje dotyczące zmian stanu jamy ustnej w przebiegu chemioterapii nowotworów. Z tego powodu wyniki badań stomatologicznych u tych chorych można odnieść jedynie do danych epidemiologicznych dla populacji polskiej uzyskanych w analogicznej grupie wiekowej. Przedstawione powyżej wyniki badań potwierdziły wysoki odsetek osób bezzębnych, który w całej badanej grupie wyniósł 23,4%, a w grupie wiekowej powyżej 65 lat sięgał 43%.

Jak wynika z raportu opublikowanego w 2003 roku przez Iwanicką-Frankowską bezzębie u Polaków w wieku od 65 - 74 lat dotyczy 41,6 % tej populacji. Jest to jednocześnie grupa zaopatrzona w rozległe ruchome uzupełnienia protetyczne (53).

Badania własne wykazały istotną statystycznie zależność pomiędzy wystąpieniem objawów OM, a użytkowaniem przez pacjenta rozległego ruchomego uzupełnienia protetycznego.

Z wywiadu stomatologicznego wynika, że pacjenci użytkowali protezy mimo pojawiania się suchości jamy ustnej i początkowych dolegliwości bólowych. Fakt ten może dowodzić, że

źle dostosowane brzegi protez dodatkowo drażniły podczas ich użytkowania wysuszoną błonę śluzową pogłębiając zmiany zanikowo - zapalne pojawiające się w trakcie leczenia chemioterapią.

Dodatkowym czynnikiem patogennym jest brak zachowania podstawowych zasad higieny protezy obserwowany w tej grupie pacjentów mogący być również czynnikiem pogarszającym przebieg OM i zwiększającym ryzyko wtórnej infekcji. Chorzy z zaawansowanym nowotworem stanowią więc duże wyzwanie zarówno dla onkologa jak i dla sprawującego nadzór stomatologiczny lekarza. Współpraca obu specjalistów powinna zatem zmierzać do takiego umotywowania pacjenta , aby zwracał dostateczną uwagę na przestrzeganie zasad higieny jamy ustnej.

Dodatkowym utrudnieniem dla pacjentów dotkniętych chorobą nowotworową jest fakt, że część z nich cierpi z powodu depresji i stanów lękowych. Potwierdzają to badania Hopwood z których wynika, że 33% chorych na raka płuca ma przejściowe lub utrwalone objawy depresji (54). Z przeprowadzonych badań własnych można wnioskować, że zjawisko to może być na oddziałach onkologicznych znacząco niedoszacowane. Z historii chorób i kart obserwacji ambulatoryjnych badanych pacjentów wynikało bowiem, że tylko u 6% chorych zdiagnozowano depresję. Jednak potrzeba wsparcia psychologicznego dla chorych onkologicznych jest problemem istotnym i podnosi ją wielu autorów. Trzeba bowiem zdać sobie sprawę, że bez opieki psychologicznej trudno będzie spodziewać się poprawy ogólnego stanu pacjenta, który pośrednio wpływa na poprawę poziomu higieny jamy ustnej.

Średnia wartość wskaźnika DMFT w grupie badanych chorych wynosiła 18,6 .Na ten wysoki wynik w głównej mierze wpłynął wysoki odsetek zębów usuniętych. Porównanie tych danych z wynikami badań epidemiologicznych prowadzonych przez Hahn na terenie Niemiec

wykazuje znaczną zbieżność , bowiem średnia wartość DMFT w przedziale wiekowym 50-60 lat wyniosła w tych badaniach 18,7 (55).

Składowa D określająca aktywność procesu próchnicowego miała w naszych badaniach wartość 0,8, a średnia liczba zębów wypełnionych wyniosła 1,0. Wyniki te mogą być pośrednim dowodem świadczącym o tym, że podstawowe leczenie stomatologiczne tej grupy chorych polegało w przeszłości głównie na usuwaniu zębów.

Różnice w poziomie DMFT u pacjentów z grupy A i B nie były istotne statystycznie.

### 6.1.3 NCI-CTCAE

W badanej grupie chorych w czasie 7 dni po podaniu pierwszego cyklu chemioterapii u 13,5 % pacjentów wystąpiły zmiany o charakterze OM. Przyjmuje się , że we wszystkich możliwych schematach chemioterapii można się spodziewać wystąpienia zmian o typie OM u 20-60% pacjentów. Przeważający odsetek tych zmian występuje w stopniu I wg. NCI-CTCAE. Ryzyko wystąpienia OM jest znacznie podwyższone u pacjentów , u których w schemacie leczenia znajdują się wysoko mukotoksyczne leki takie jak 5 fluorouracyl, cyklofosfamid, metotreksat i cisplatyna. Oczywistym czynnikiem sprzyjającym występowaniu tych zmian jest też dodatkowe zastosowanie radioterapii (56). U naszych chorych częstość stwierdzanych zmian o typie OM była niewielka, co należy wiązać z faktem użycia schematów o średnim stopniu mukotoksyczności oraz zaniechaniem dodatkowego leczenia radioterapią.

Okazuje się również , że nowe środki wprowadzone do terapii antynowotworowych niosą ze sobą zwiększone ryzyko wystąpienia OM podczas ich stosowania. O'Donnell podaje , że

podczas terapią inhibitorami kinazy mTOR aż u 41% pacjentów pojawiły się objawy zapalenia błony śluzowej (57).

Istotną rolę w patogenezie OM odgrywa też specyfika zestawienia ze sobą leków w trakcie terapii. W leczeniu raka płuca spośród najczęściej stosowanych chemioterapii największe działanie mukotoksyczne wykazał paclitaxel w połączeniu z gemcytabiną (58).

Z raportu ESMO z 2009 wynika, że w trakcie leczenia raka płuca chemioterapią opartą na winorelbynie z cisplatyną częstość występowania OM w stopniu III i IV szacuje się na 0,25%. Jest to jak dotychczas jedyne badanie kliniczne obejmujące 203 pacjentów. Nie opublikowano dotychczas dokładniejszych danych o odsetku chorych ze zmianami w I i II stopniu wg NCI-CTCAE (59).

Z badań Danson wynika, iż u 38% chorych stwierdzono objawy OM w stopniach od I do III, jeśli w leczeniu stosowano chemioterapię na bazie cisplatyny, winblastyny i mitomycyny, przy czym zmiany o III stopniu zaawansowania występowały tylko u 2% leczonych (60). W badaniach własnych w schemacie cisplatyna z winblastyną (PN) objawy o I stopniu nasilenia wystąpiły u 11% chorych, a u 2,7% stwierdzono zmiany w stopniu II wg NCI-CTCAE. Mimo, że w piśmiennictwie nie udało się znaleźć danych dotyczących objawów ubocznych w obrębie jamy ustnej, które występowałyby podczas terapii etopozydem w połączeniu z cisplatyną to większość autorów zalicza jednak etopozyd do grupy mukotoksycznych chemioterapeutyków, a więc sprzyjających powstawaniu OM.

Badania przeprowadzone nad tym lekiem przez Oblon wykazały, że etopozyd będący jednym z trzech zastosowanych środków w ramach jednej terapii ma najistotniejszy wpływ na jej mukotoksyczność z uwagi na jego wysoką koncentrację w ślinie. Obniżenie wydzielania

śliny u pacjentów w czasie leczenia etopozydem znacznie redukowało występowanie OM w trakcie terapii (61).

W badaniach własnych stwierdzono, że u pacjentów leczonych schematem etopozyd z cisplatyną zmiany na błonie śluzowej występowały w stopniu I u 8,3%, a w stopniu II i III u 2,7% badanych. Nie wykazano statystycznie istotnej różnicy w częstości OM w poszczególnych schematach chemioterapii, ale należy podkreślić, że tylko w przypadku leczenia etopozydem obserwowano zmiany o III stopniu nasilenia wg.NCI-CTCAE. U żadnego z pacjentów nie odnotowaliśmy natomiast zmian w IV stopniu zaawansowania co może wynikać z faktu, że pacjenci ci byli badani tylko po przeprowadzeniu pierwszego cyklu chemioterapii.

Grupa pacjentów, którą udało się zbadać po zakończonym leczeniu relacjonowała jednak, że zmiany w jamie ustnej pojawiały się ponownie przy kolejnych cyklach chemioterapii, ale też ponownie same ustępowały bez dodatkowych działań. Można również z dużym prawdopodobieństwem założyć, że jeśli w przypadku leczenia etopozydem z cisplatyną zaistnieje konieczność zastosowania radioterapii uzupełniającej, to nastąpi zaostrzenie przebiegu OM.

Dla oceny ogólnego stanu pacjenta obliczano również wskaźnik masy ciała BMI (62). Jest to współczynnik masy ciała, który obliczamy, dzieląc masę ciała podaną w kilogramach przez wzrost podany w metrach podniesiony do kwadratu.

Tabela X. przedstawia przyjętą powszechnie interpretację wyników pomiaru BMI.

niedowaga	< 18,5
waga w normie	18,5-24,9
nadwaga	25-29,9
Otyłość I stopnia	30-34,9
Otyłość II stopnia	35-39,9
Otyłość III stopnia	>40

Wyniki badań przeprowadzonych przez Cheng wykazały, że w grupie pacjentów o niskim BMI (BMI<20 ) objawy OM pojawiają się znacząco częściej i z większym nasileniem (63).

Niska masa ciała może wpływać na obniżenie odporności organizmu i jest często wynikiem zaawansowania procesu nowotworowego. Postęp choroby wymaga intensywniejszego leczenia chemioterapią, która podnosi jej toksyczne działanie i może stanowić wytłumaczenie związku pomiędzy niską wartością BMI, a częstszym występowaniem OM. Opinia ta jest jednak kwestionowana i niektórzy autorzy wskazują na zupełnie inną, dużo trudniejszą dla wyjaśnienia tego zjawiska zależność. W badaniach Robien i Schubert zaprezentowano wyniki, w których wzrost zapadalności na OM występował przy BMI powyżej wartości 25 (BMI>25). Autorzy tłumaczą to zjawisko koniecznością zastosowania wyższej ogólnej dawki leku przy nadwadze pacjenta i zaburzonej farmakokinetyce leku. Również i w tym przypadku ostatecznie efektem zaawansowanego OM będzie spadek wagi pacjenta związany z utrudnieniem w żuciu i połykaniu (64).

W badaniach prezentowanych w obecnym opracowaniu średnie wartości BMI wyniosło w grupie A 24,7, a w grupie B 25. Przeprowadzona analiza statystyczna wyników nie wykazała istotnej zależności pomiędzy poziomem BMI a występowaniem zmian o charakterze OM. Podobnie nie stwierdzono statystycznie istotnej różnicy w występowaniu OM w zależności od płci pacjenta. Objawy OM stwierdzano jednak nieco częściej u kobiet (16%) aniżeli u mężczyzn (12,5%). Ponadto w prezentowanym badaniu zmiany zapalne w stopniu III wg. NCI-CTCAE występowały wyłącznie u kobiet.

Podobne wyniki opublikował Tsalic, który zmiany zapalne na błonie śluzowej jamy ustnej kobiet obserwował prawie dwukrotnie częściej niż u mężczyzn (65).

Interesujące wyniki uzyskał również Sloan, który wykazał wzmożoną toksyczność 5-fluorouracylu wśród badanych kobiet w porównaniu z grupą badanych mężczyzn. Oparł to spostrzeżenie na znacząco częstszym występowaniu i nasileniu objawów ubocznych leczenia w grupie analizowanych pacjentek. Początkowo sugerowano, że ma to związek z mniejszą liczbą partycypujących w badaniach kobiet lub odmiennym, bardziej subiektywnym sposobem relacjonowania odczuć przez kobiety. Obecnie próbuje się to zjawisko tłumaczyć odmienną farmakodynamiką leku u obu płci, chociaż nie jest to koncepcja ostatecznie potwierdzona (66).

Prowadzone w tym zakresie badania skupiają się nad ekspresją syntetazy tymidylowej katabolizującej 5-fluorouracyl i jej potencjalnie różnym poziomem u obu płci, a odpowiedzią guza na chemioterapię (67).

Można zatem przyjąć, że obecne badania nad OM osiągnęły poziom zgodności co do faktu, że podłoże tego zjawiska jest wieloczynnikowe i nadal trudno jest prognozować, u którego pacjenta w trakcie leczenia nowotworu wystąpi to powikłanie.

## 6.2 Badania laboratoryjne

W ostatnich latach pojawiły się publikacje dotyczące analizy ekspresji genów przy pomocy techniki PCR array w obrębie linii komórkowych fibroblastów poddawanych radioterapii. Rodningen i współautorzy badając linie komórkowe poddawane naświetlaniom wskazali na znaczenie 18 genów mogących stanowić czynnik predykcyjny dla procesu włóknienia po radioterapii. W kolejnej pracy opisali przydatność zastosowania mikromacierzy do analizy zmian w ekspresji poszczególnych genów pod wpływem promieniowania jonizującego. W tych badaniach udało się wyodrębnić grupę powtarzających się genów, których ekspresja zmieniała się podobnie we wszystkich przeprowadzonych oznaczeniach (68).

Kolejnym etapem tych poszukiwań będzie zapewne próba wyjaśnienia roli tych genów i ich potencjalnego zastosowania w przewidywaniu efektów ubocznych radioterapii w poszczególnych nowotworach. Równie istotne jest wyselekcjonowanie genów kandydujących związanych z występowaniem skutków ubocznych chemioterapii w obrębie błony śluzowej przewodu pokarmowego. Bowen i Gibson zbadali na modelu zwierzęcym różnicę w ekspresji 500 genów po podaniu irynotekanu (69). Stosując podobną metodą laboratoryjną w prezentowanej pracy przeanalizowano 84 geny mogące pełnić rolę w powstawaniu zmian zanikowo-zapalnych po chemioterapii raka płuca.

Większość badających ten problem autorów pobierała materiał metodą inwazyjną wykonując u pacjentów klasyczną biopsję błony śluzowej. W badaniach własnych podjęto próbę sprawdzenia, czy możliwe jest zbadanie ekspresji genów w materiale zebranym od pacjentów za pomocą nieinwazyjnego wymazu szczoteczkowego. Fall-Dickson oznaczyła w podobny sposób tj. metodą nieinwazyjną, ekspresję TNF alfa w obrębie błony śluzowej jamy ustnej, w



surowicy krwi oraz ślinie u chorych po podaniu chemioterapii. Jej publikacja potwierdza fakt, że objętość materiału do badania z pobranej śliny może być niewystarczająca do szerszej analizy molekularnej. Najwięcej materiału uzyskano z surowicy krwi, jednak wyniki tej analizy nie zawsze były specyficzne. Oznaczenia poziomu TNF z pobranego materiału z błony śluzowej korelowały z poziomem natężenia bólu - im wyższa była ekspresja TNF tym pacjent doświadczał większego bólu. Tej zależności nie wykazały oznaczenia poziomu TNF z krwi, które rejestrowały zarówno spadki jak i wzrost ekspresji w okresach wzmożonego bólu u pacjenta (70). Dlatego też w naszych badaniach, aby uniknąć tego problemu pobieraliśmy materiał z miejsca potencjalnej zmiany. Pobieranie wymazu z powierzchni błony śluzowej za pomocą nieinwazyjnej metody szczoteczkowej ma jednak pewne istotne ograniczenia. Przede wszystkim dlatego, że może być niedostatecznym źródłem niezbędnego do diagnostyki mRNA. Komórki nabłonka błony śluzowej ulegają częstemu złuszczeniu i ich naturalny cykl sprzyja degradacji RNA. Aby osiągnąć wymaganą ilość wartościowego materiału należy zatem w odpowiedni sposób wyizolować RNA z pobranych wymazów. Zgodnie z sugestią Fall-Dickson oraz pracą Smith do ekstrakcji RNA zastosowaliśmy Trizol, który w przypadku małej ilości materiału pozwala na najbardziej wydajne wyizolowanie RNA (70,71). Badania przeprowadzono na płycie RealTime ready Human Apoptosis Panel 96. Ze względu na udowodnioną rolę procesu apoptozy w powstawaniu OM wybrano zestaw genów pro- i antyapoptotycznych. Występowanie zjawiska apoptozy w obrębie błony śluzowej jelit zwierząt laboratoryjnych po podaniu 5 fluorouracylu potwierdziły badania Pitchard (72). Dwa lata później badacze Keefe i Brealey podjęli próbę analizy tego zjawiska w grupie chorych poddawanych intensywnej chemioterapii stosowanej w leczeniu różnych nowotworów. Pacjentów poddawano zabiegowi małoinwazyjnej biopsji z obszaru dwunastnicy. Analiza zebranego w ten sposób materiału potwierdziła apoptozę w komórkach błony śluzowej jelit, która poprzedzała wystąpienie hipoplazji krypt jelitowych (73).

Obserwacje te potwierdzili Gibson i współpracownicy na podstawie analizy natężenia zjawisk apoptozy na poziomie błony śluzowej jamy ustnej. Okazało się, że było ono najwyższe 3 dni po podaniu chemioterapii i osiągało 400 krotnie wyższe wartości w porównaniu do grupy kontrolnej (74).

Przekonanie o istotnej roli zjawiska apoptozy w procesie OM potwierdzają też ostatnie doniesienia Chen. Badał on grupę pacjentów cierpiących na łuszczycę, która jest chorobą dziedziczną, polegającą na zaburzeniu procesów apoptozy w komórkach skóry i zaobserwował u tych chorych niższą o 77% zapadalność na OM w porównaniu z grupą kontrolną. Z kolei w grupie pacjentów cierpiących na chorobę Addisona, w której występuje nadmiar procesów apoptotycznych wykazano o 17% wyższą zapadalność na OM w stosunku do grupy kontrolnej (75).

Pośród analizowanych przez nas genów pro i anty apoptotycznych znalazły się białka z grupy: CARD, Bcl-2, TNFR, NF- $\kappa$ B, IAP, p53. Przedstawione wyniki prezentują 11 wybranych spośród 84 genów, które jako jedyne wykazały podobne zmiany w ekspresji przed i po podaniu chemioterapii.

Zwiększonej ekspresji po podaniu chemioterapii uległy: TNFRSF21, Fam96B, Casp9, NF- $\kappa$ B, SOCS3, FASLG. Wśród pozostałych genów: CFLAR, Bcl2L10, Mcl1, BBC3 zaobserwowano spadek w ekspresji.

Do przeanalizowania ich roli i szlaków, w które wchodzi zastosowano bioinformatyczną bazę danych David bioinformatics resources 6.7 (76).

TNFRSF21 inaczej nazywany DR 6 jest białkiem kodującym gen należący do rodziny receptorów TNF. Receptory TNF znane są ze swej roli w indukowaniu śmierci komórki poprzez aktywację ścieżki sygnalizacyjnej dla apoptozy. Choć DR 6 jest jednym z mniej

poznanych receptorów śmierci wiadomo, że znajduje się w komórkach większości tkanek człowieka i że jego nadekspresja prowadzi do aktywacji NF- $\kappa$ B.

Fall Dickson opublikowała wyniki analizy PCR array materiału uzyskanego z błony śluzowej policzka 23 pacjentów przed i po podaniu chemioterapii. W przeważającej większości prób odnotowała wzrost TNF alfa, który odgrywa istotną rolę w procesach zapalnych (70). Te obserwacje potwierdzają publikacje Sonis, z których wynika, że chemioterapia prowadzi bezpośrednio do produkcji TNF i IL1 $\beta$  w obrębie komórek nabłonka. IL1 $\beta$  stymuluje wzrost unaczynienia błony podśluzowej tym samym umożliwiając wzrost stężenia tkankowego leków zastosowanych w ramach chemioterapii (77).

To zjawisko potwierdzają również badania Xanthinaki prowadzone nad grupą pacjentów poddawanych radioterapii. Wykazali oni bowiem wzrost stężenia TNF, p53 i IL1 $\beta$  w pobranych do badań cytologicznych wymazach. IL1 $\beta$  wraz z TNF prowadzi dodatkowo do aktywacji NF- $\kappa$ B (78).

Liczne badania prowadzone nad rolą radio i chemioterapii jako czynnika indukującego NF- $\kappa$ B pozwoliły na poznanie tego zagadnienia. Wiadomo na przykład, że antracykliny (79), alkaloidy Vinca (80), paklitaksel (80), cisplatyna (81), melfalan (82), bleomycyna (83), etopozyd (79) - wszystkie należą do substancji aktywujących NF- $\kappa$ B.

Jednakże dalsza rola NF- $\kappa$ B budzi kontrowersje. Początkowo przyjmowano, że białko to ma działanie proapoptotyczne - prowadzące do wzrostu natężenia zjawisk apoptozy w komórkach nowotworu jak i zdrowych tkankach (84). Jednakże w ostatnim czasie ukazało się wiele prac wskazujących na cytoprotekcyjną rolę NF- $\kappa$ B. W jednej z nich opublikowanej przez Cheng (85) wykazano, że komórki, w których występował niedobór NF- $\kappa$ B były bardziej podatne na proapoptotyczne działanie terapii etopozydem i cisplatyną w porównaniu z komórkami

charakteryzującymi się prawidłowym poziomem ekspresji NF-*κ*B. Podobne rezultaty uzyskał Voboril, który zaobserwował zwiększoną podatność na apoptozę po podaniu 5 fluorouracylu w komórkach, w których zablokowano ekspresję NF-*κ*B (86).

Pozostaje zatem pytanie o mechanizm zjawiska, w którym u pacjentów leczonych różnymi schematami chemioterapii pojawiają się objawy OM równocześnie ze wzmożoną ekspresją NF-*κ*B. Przypuszcza się, że odpowiedź na wzrost NF-*κ*B w komórkach zdrowych jest inna aniżeli w komórkach nowotworowych, co może mieć związek z dwukierunkowością działania białek z grup Bcl 2, które są aktywowane poprzez wzrost NF-*κ*B. Pośród tej rodziny białek mamy bowiem białka z grupy antyapoptotycznych (Bcl-xl, Mcl-1, Bcl-w ,A1 ), jak i proapoptotycznych (Bax, Bak, Bik, Bid).

Z badań Bartke wiemy, że pod wpływem chemioterapii dochodzi do wzrostu Bcl 2 poprzez stymulację NF-*κ*B. Wydaje się więc możliwe, że w zdrowych komórkach odpowiedź na tę sekwencję wydarzeń może prowadzić do apoptozy, natomiast w komórkach nowotworowych może dochodzić do sytuacji odwrotnej ,w której przeważają procesy antyapoptotyczne (87). Przedstawione hipotezy wymagają jednak potwierdzenia poprzez dalsze badania nad tym zagadnieniem.

W badaniach prezentowanych w niniejszym opracowaniu poziom NF-*κ*B u wszystkich zbadanych pacjentów uległ wzrostowi w stosunku do oznaczeń przed zastosowaniem leczenia. Również receptor 21 TNF uległ nadregulacji po podaniu chemioterapii.

Wyniki te przemawiają za słusnością hipotezy o wzroście ekspresji tych białek w obrębie komórek błony śluzowej po podaniu chemioterapii .

Wzrostowi uległa również ekspresja enzymu proteolitycznego jakim jest Casp 9.

Z badań Razqallah Hakem prowadzonych na myszach pozbawionych tego enzymu dowiadujemy się, że jest on niezbędny do osiągnięcia efektu proapoptotycznego wywołanego

przez etopozyd, deksametazon czy radioterapię. Kaspaza 9 wraz z kaspazą 8 działa jako inicjator, dając sygnał kaspazom 3 i 7 do aktywacji procesów apoptotycznych (88,89).

Kluczowość roli Casp 9 w aktywacji kaskady cytokin prowadzących do apoptozy pod wpływem chemioterapii omawia się w wielu publikacjach.

Jedną z nich jest praca Druskovic, w której opisuje laboratoryjnie wywołaną nadekspresję Casp 9 w liniach komórkowych oraz indukowaną w ten sposób kaskadę wydarzeń zakończoną śmiercią komórek na drodze apoptozy (90).

Wyniki badań własnych nad tym enzymem potwierdzają wzrost stężenia Casp 9 i SOCS3 po podaniu chemioterapii w stosunku do analizy przeprowadzonej przed zastosowaniem leczenia. Wzrost ekspresji SOCS 3 pozostaje w zgodzie z wynikami badań A Linke, które wskazują na jego istotną rolę w upośledzeniu proliferacji i migracji keratynocytów.

Zaobserwowano również, że u myszy, u których wywołano nadekspresję SOCS3 w obrębie keratynocytów gojenie ran było znacząco upośledzone. Nadekspresja SOCS 3 zlokalizowana w keratynocytach prowadziła również do atrofii brzegów rany i zaostrzenia procesu zapalnego. Ponadto w zranionej tkance przewlekłe utrzymywał się wysoki poziom neutrofilii i makrofagów, co wskazywałyby na potencjalnie istotną rolę SOCS3 w procesie uszkodzenia błony śluzowej (91).

Proapoptotyczną rolę SOCS3 wykazał również Iwahori, który w swoim eksperymencie badał możliwość leczenia złośliwego międzybłoniaka opłucnej poprzez wywołanie nadekspresji SOCS3 w komórkach nowotworowych. Doprowadziło to do obniżenia proliferacji tych komórek i ostatecznie do przyspieszonej apoptozy (92).

Kolejnym białkiem w badaniach własnych, którego tkankowa ekspresja po podaniu chemioterapii uległa wzrostowi jest ligand receptora Fas (FASLG). Podobne rezultaty uzyskał w swoich badaniach Shimada, który opisał zjawisko apoptozy wywołanej na

poziomie komórek nabłonka wyścielającego żołądek w warunkach laboratoryjnych. Wykazał on znaczący wzrost poziomu FASLG w obrębie nabłonka u pacjentów zakażonych *Helicobacter pylori*. Znalazł również zależność pomiędzy podwyższoną ekspresją FASLG, a powstawaniem owrzodzeń na powierzchni błony śluzowej żołądka (93). Uzyskane wyniki pozwalają zatem sądzić, że wzrost FASLG w komórkach błony śluzowej jamy ustnej będzie sprzyjać powstawaniu objawów OM.

Kolejne wyniki badań dotyczyły ekspresji CFLAR / c-FLIP w komórkach błony śluzowej jamy ustnej u pacjentów po podaniu chemioterapii. Okazało się, że ekspresja badanego genu uległa obniżeniu w porównaniu do poziomu ocenianego przed zastosowanym leczeniem.

W publikacji Galligan dotyczącej ekspresji CFLAR po podaniu chemioterapii, wyrażono opinię, że obniżenie ekspresji CFLAR może wiązać się z uwrażliwieniem komórek nowotworowych na działanie chemioterapii 5 fluorouracylem (94).

Na obecnym poziomie wiedzy nie można jeszcze wyjaśnić czy jest to działanie wybiórcze czy też równocześnie występuje zwiększenie podatności zdrowych komórek błony śluzowej przewodu pokarmowego na uszkodzenie pod wpływem chemioterapii.

Obniżonej ekspresji uległy również inne badane białka antyapoptotyczne: Bcl2L10, Mc11.

Białko Bcl2L10 zapobiega uwolnieniu cytochromu c i kaspazy 3 przez co prowadzi do blokady apoptozy przebiegającej na drodze mitochondrialnej (95).

Obniżenie ekspresji Bcl2L10 sugeruje, że podana chemioterapia obniżyła aktywność wybranych białek antyapoptotycznych, zwiększając podatność komórek błony śluzowej na apoptozę.

Wyniki te są również w zgodzie z doniesieniami Xanthinaki o obniżeniu ekspresji Bcl2 i Mc11 w wymazach z błony śluzowej pacjentów poddanych chemioterapii (78).

Interesującym ale równocześnie zaskakującym okazało się w naszych badaniach obniżenie we wszystkich próbach po zastosowanym leczeniu poziomu ekspresji białka BBC3 (PUMA). Jest to białko proapoptotyczne należące do rodziny Bcl 2.

Vilunger w swoich badaniach wykazał znaczny wzrost ekspresji BBC3 w wyniku uszkodzenia DNA. Potwierdził również wzrost ekspresji BBC3 po podaniu etopozydu (96).

Panuje opinia, że ekspresja BBC3 w obrębie błony śluzowej jest trudno wykrywalna. Jednakże w badaniach własnych we wszystkich próbach uległ on ekspresji .

W interpretacji tych danych pomocne mogą być wyniki badań Kim i współpracowników, którzy zajmowali się ekspresją PUMA w raku okrężnicy. W ich badaniu to proapoptotyczne białko uległo wyraźnej nadekspresji u pacjentów z potwierdzonym rakiem jelita w stosunku do zdrowej grupy kontrolnej (97).

Jest to jeszcze daleka droga do wyjaśnienia mechanizmu działania PUMA, ale sam fakt możliwości oznaczenia tego białka w komórkach nabłonka jamy ustnej jest informacją zachęcającą do dalszych badań w tym kierunku.

Ponadto w badaniach własnych u czterech pacjentów po podaniu chemioterapii nastąpił nieznaczny wzrost ekspresji Stat5b, a u jednego pacjenta oznaczonego w spisie numerem 5 po podaniu chemioterapii poziom Stat5b obniżył się (Ryc.18). Był to pacjent, który jako jedyny z analizowanej za pomocą RealTime ready Human Apoptosis Panel 96 grupy badanych skarżył się na pieczenie jamy ustnej, choć na etapie wymazu nie miał widocznych zmian na błonie śluzowej.

Z badań Han wynika, że istnieje korelacja pomiędzy obecnością Stat5b, a utrzymaniem integralności błony śluzowej jelit. Okazało się bowiem, że myszy pozbawione Stat5b były bardziej podatne na zmiany zapalne jelit (98).

Nasze badania potwierdzają, że procesy związane z apoptozą wywołaną chemioterapią mają miejsce również na poziomie komórek błony śluzowej jamy ustnej.

Wyselekcjonowanie genów kandydujących wymaga jednak poszerzenia grupy badanej .

Spośród licznej grupy 84 genów zaledwie 11 wykazało zbliżony kierunek ekspresji u zbadanych pacjentów. Celowe wydaje się również przeanalizowanie w tej grupie chorych białek związanych z metabolizmem leków.

## **7. Podsumowanie**

Analiza wyników badań prowadzonych w grupie pacjentów z rozpoznaniem rakiem płuca poddawanych leczeniu chemioterapią wykazała, że zmiany o charakterze Oral Mucositis wystąpiły głównie w I stopniu nasilenia wg NCI-CTCAE i dotyczyły 13,5 % chorych.

Nie zaobserwowano istotnej statystycznie różnicy w częstości występowania zapalenia błony śluzowej jamy ustnej OM w obu analizowanych schematach chemioterapii.

Wykazano, że w grupie pacjentów z objawami OM (grupa A) wskaźnik higieny jamy ustnej (OHI-S) przyjmował statystycznie istotnie wyższe wartości w stosunku do grupy bez objawów OM (grupa B). Oznacza to, że w grupie z objawami OM (grupa A) poziom higieny jamy ustnej był znacząco gorszy.

Nie wykazano korelacji występowania objawów OM w zależności od płci pacjenta, wskaźnika BMI oraz wskaźnika DMFT.

Z pobranych wymazów szczoteczkowych z powierzchni błony śluzowej jamy ustnej udało się wyizolować materiał do badań laboratoryjnych przy użyciu RealTime ready Human Apoptosis Panel 96 (Roche™). Ilość zebranego mRNA, pomimo że była ograniczona, umożliwiła jednak przeprowadzenie analizy białek apoptotycznych i zmian w ich ekspresji na poziomie błony śluzowej jamy ustnej po podaniu chemioterapii.



## 8. Wnioski

1. U pacjentów poddawanych chemioterapii z powodu niedrobnokomórkowego raka płuca zmiany o charakterze Oral Mucositis nie są powszechne (wystąpiły u 13,5 % badanych ) i występują głównie w I stopniu nasilenia wg. NCI-CTCAE.

2. Nie stwierdzono różnic w częstości występowania zmian o charakterze OM w obu zastosowanych schematach chemioterapii (PN vs. PE)

3. Skala NCI-CTCAE stanowi przydatne narzędzie w ocenie stopnia nasilenia zmian zapalnych błony śluzowej jamy ustnej w trakcie leczenia chemioterapią.

4. Niski poziom higieny jamy ustnej sprzyja wystąpieniu objawów OM w trakcie chemioterapii.

5. Występowanie zmian o charakterze OM u pacjentów poddawanych chemioterapii nie jest zależne od płci, wskaźnika BMI oraz wskaźnika DMFT.

6. Wymaz szczoteczkowy pobrany z błony śluzowej jamy ustnej umożliwia analizę ekspresji białek z pobranego materiału .

7. Pod wpływem chemioterapii dochodzi do zmian w ekspresji białek apoptotycznych na poziomie komórek błony śluzowej jamy ustnej .

(wzrost ekspresji: TNFRSF21,Fam96B,Casp9,SOCS3,FASLG, NF-*κ*B)

(spadek ekspresji: CFAR,Bcl2L10,Mcl1,BBC3)

## 9. Streszczenie

Oral Mucositis (OM) – zapalenie błony śluzowej jamy ustnej jest jednym z częstszych powikłań w przebiegu chemio – i/lub radioterapii nowotworów pogarszającym w znacznym stopniu jakość życia pacjentów i zaburzającym leczenie choroby podstawowej. Objawami zapalenia błony śluzowej jamy ustnej są: zaczerwienienie, obrzęk, owrzodzenia, ból i pieczenie błony śluzowej.

Zmiany te najczęściej obserwuje się na błonie śluzowej policzków, warg, dnie jamy ustnej, bocznych i dolnej powierzchni języka oraz na podniebieniu miękkim. Towarzyszący tym objawom ból może znacznie upośledzać żucie i połykanie, prowadząc do utrudnienia przyjmowania pokarmów. Taka sytuacja może być przyczyną przerwania lub znacznego ograniczenia chemioterapii, co w oczywisty sposób wpływa na pogorszenie wyników leczenia choroby podstawowej.

Ocenia się, że powikłanie to występuje u ponad 85% pacjentów leczonych za pomocą radioterapii w przebiegu nowotworów głowy i szyi i u około 40% pacjentów poddawanych chemioterapii w przebiegu guzów litych.

Natężenie zmian występujących na błonie śluzowej zależy od wielu czynników. Bada się wpływ higieny jamy ustnej, stanu ogólnego chorego oraz schematu leczenia chemioterapią na częstość występowania objawów OM. Podejrzewa się również podłoże genetyczne tego zjawiska.

Celem pracy była ocena stanu jamy ustnej u pacjentów leczonych z powodu raka płuca.

Określono częstość występowania objawów OM w badanej grupie chorych. Porównano występowanie OM w dwóch różnych schematach leczenia chemioterapią: cisplatyna z winblastyną (PN) oraz cisplatyna z etopozydem (PE).

Określono stopień nasilenia zmian na błonie śluzowej stosując skalę ocen wg. National Cancer Institute Common Toxicity Criteria Adverse Events v 3.0 (NCI-CTCAE).

U pacjentów oceniono stan jamy ustnej przed podaniem chemioterapii i po podaniu pierwszego cyklu chemioterapii w oparciu o wskaźniki higieny jamy ustnej (OHI-S) oraz wskaźnik DMFT .

Porównano te wskaźniki u obu grup – pacjentów z objawami OM (grupa A) i pacjentów bez objawów OM (grupa B).

Badania wykazały istotną statystycznie różnicę w poziomie higieny jamy ustnej. Była ona znacząco gorsza w grupie pacjentów, u których wystąpiły objawy OM.

Nie wykazano natomiast istotnej różnicy w częstości występowania OM w zależności od schematu leczenia PN lub PE.

Płeć pacjentów oraz wskaźnik BMI i DMFT nie wykazały korelacji z występowaniem zmian o charakterze OM.

U wybranej grupy pacjentów przeprowadzono analizę ekspresji genów apoptotycznych z materiału pobranego przed i 3 dni po podaniu chemioterapii za pomocą wymazu szczoteczkowego z powierzchni błony śluzowej jamy ustnej.

Wyniki badań wykazały zmiany w ekspresji genów apoptotycznych. Analiza przeprowadzona za pomocą RealTime ready Human Apoptosis Panel 96 potwierdza istotną rolę procesu apoptozy w powstawaniu zjawiska OM . Dalsze kierunki badań nad podłożem genetycznym OM powinny zostać poszerzone o geny zawiadujące metabolizmem leków.

## 10. Spis rycin

Ryc. 1 Szczoteczka produkcji OralCDx Laboratories <sup>TM</sup> służąca do wymazu z bony śluzowej

Ryc. 2 Pobranie wymazu szczoteczki z błony śluzowej policzka

Ryc. 3 96 dołkowa płytki RealTime ready Human Apoptosis Panel 96, *Roche* <sup>TM</sup>

Ryc. 4 Średnie wartości wskaźnika OHI-S w badanych grupach

Ryc. 5 Wykres ramkowy przedstawiający średnie OHI – S dla badanych grup A i B

Ryc. 6 Średnia wartość wskaźnika DMFT w obu grupach pacjentów A i B

Ryc. 7 Poszczególne składniki wskaźnika DMFT w obu badanych grupach

Ryc. 8 Częstość występowania OM w grupie pacjentów poddawanych schematowi leczenia cisplatyna/winorelbina PN i cisplatyna/etopozyd PE

Ryc. 9 Częstość występowania OM w różnym stopniu zaawansowania wg. NCI-CTCAE w obu zastosowanych schematach chemioterapii

Ryc. 10 Częstość występowania zmian o charakterze OM w zależności od stopnia zaawansowania nowotworu

Ryc. 11 Częstość występowania zmian o charakterze OM w różnym stopniu zaawansowania wg. NCI-CTCAE u obu płci

Ryc. 12 Średnie BMI w obu badanych grupach

Ryc. 13 Średni poziom natężenia bólu w obu grupach

Ryc. 14 Ekspresja wybranych genów przed i po podaniu chemioterapii u pacjenta nr.1

Ryc. 15 Ekspresja wybranych genów przed i po podaniu chemioterapii u pacjenta nr.2

Ryc. 16 Ekspresja wybranych genów przed i po podaniu chemioterapii u pacjenta nr.3

Ryc. 17 Ekspresja wybranych genów przed i po podaniu chemioterapii u pacjenta nr.4

Ryc. 18 Ekspresja wybranych genów przed i po podaniu chemioterapii u pacjenta nr.5

## 11. Piśmiennictwo

1. Kosacka M, Jankowska R. Epidemiologia raka płuca. *Pneumonol Alergol Pol* 2007; 75: 76-80
2. Molina JR, Yang P, Cassivi SD. Non small cell lung cancer: epidemiology, risk factors, treatment and survivorship. *Mayo Clin Proc* 2008; 83: 584-594
3. Köstler W, Hejna M, Wenzel C, Zielinski C. Oral Mucositis Complicating Chemotherapy and/or Radiotherapy: Options for Prevention and Treatment . *CA Cancer J Clin* 2001; 51: 290
4. Rubenstein EB, Peterson DE, Schubert M, Keefe D, McGuire D, Epstein J, Elting LS, Fox PC, Cooksley C, Sonis ST; Mucositis Study Section of the Multinational Association for Supportive Care in Cancer; International Society for Oral Oncology. Clinical practice guidelines for the prevention and treatment of cancer therapy-induced oral and gastrointestinal mucositis. *Cancer*. 2004; 100(9 Suppl): 2026-46
5. Lalla RV, Peterson DE. Oral mucositis. *Dent Clin North Am*. 2005; 49: 167-84, ix. Rev
6. Nicolatou-Galitis O et al. Herpes simplex virus-1 (HSV-1) infection in radiation-induced oral mucositis. *Support Care Cancer* 2006; 14: 753-762
7. Cawley M, Benson LM. Current Trends in Managing Oral Mucositis. *Clin J Oncol Nurs*. 2005; 9: 584-92
8. Sonis ST. Oral mucositis in cancer therapy. *J Support Oncol*. 2004; (6 Suppl 3): 3-8
9. Sonis ST. A biological approach to mucositis. *J Support Oncol*. 2004: 21-32; discussion 35
6. Rev
10. Sonis ST, O'Donnell KE, Popat R, Bragdon C, Phelan S, Cocks D, Epstein JB. The relationship between mucosal cyclooxygenase-2 (COX-2) expression and experimental radiation-induced mucositis. *Oral Oncol*. 2004; 40: 170-6

11. Redding SW. Cancer therapy-related oral mucositis. *J Dent Educ.* 2005; 69: 919-29
12. Barasch A, Peterson DE. Risk factors for ulcerative oral mucositis in cancer patients: unanswered questions. *Oral Oncol.* 2003; 39: 91-100
13. Sonis ST, Oster G, Fuchs H, Bellm L, Bradford WZ, Edelsberg J, Hayden V, Eilers J, Epstein JB, LeVeque FG, Miller C, Peterson DE, Schubert MM, Spijkervet FK, Horowitz M. Oral mucositis and the clinical and economic outcomes of hematopoietic stem-cell transplantation. *J Clin Oncol.* 2001; 19: 2201-5
14. Valcárcel D, Sanz MA Jr, Sureda A, Sala M, Muñoz L, Subirá M, Laborda R, Clopés A, Sierra J. Mouth-washings with recombinant human granulocyte-macrophage colony stimulating factor (rhGM-CSF) do not improve grade III-IV oropharyngeal mucositis (OM) in patients with hematological malignancies undergoing stem cell transplantation. Results of a randomized double-blind placebo-controlled study. *Bone Marrow Transplant.* 2002; 29: 783-7
15. Raber - Durlacher JE, Epstein JB, Raber J, van Dissel JT, van Winkelhoff AJ, Guiot HF, van der Velden U. Periodontal infection in cancer patients treated with high-dose chemotherapy. *Support Care Cancer.* 2002; 10: 466-73.
16. Schwab M, Zanger U, Marx C, Schaeffeler E, Klein K, Dippon J, Kerb R, Bliedernicht J, Fischer J, Hofmann U, Bokemeyer C, Eichelbaum M, German 5-FU Toxicity Study Group. Role of genetic and nongenetic factors for fluorouracil treatment-related severe toxicity: a prospective clinical trial by the German 5-FU Toxicity Study Group. *J Clin Oncol* 2008; 26: 2131-2138
17. Kremer JM. Methotrexate pharmacogenomics. *Ann. Rheum. Dis.* 2006; 65: 1121–1123
18. Łabędzka K, Grzanka A, Izdebska M. Mitochondria and cell death *Postepy Hig Med Dosw.* , 2006; 60: 439-446
19. Stępień A , Izdebska M, Grzanka A. The types of cell death. *Postepy Hig Med Dosw.* (online), 2007; 61: 420-428
20. Korzeniowska-Dyl I. Kaspazy – struktura i funkcja. *Pol. Merk. Lek.*, 2007; 138: 40

21. Hwang D, Popat R, Bragdon C, O'Donnell KE, Sonis ST. Effects of ceramide inhibition on experimental radiation-induced oral mucositis. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod.* 2005; 100: 321-9
22. Paris F, Fuks Z, Kang A, Capodiceci P, Juan G, Ehleiter D, Haimovitz-Friedman A, Cordon-Cardo C, Kolesnick R. Endothelial apoptosis as the primary lesion initiating intestinal radiation damage in mice. *Science.* 2001; 293: 293-7
23. Sonis ST. The biologic role for nuclear factor-kappa B in disease and its potential involvement in mucosal injury associated with anti-neoplastic therapy. *Crit Rev Oral Biol Med* 2002; 13: 380–389
24. Logan RM, Gibson RJ, Sonis ST, et al. Nuclear factor- $\kappa$ B (NF- $\kappa$ B) and cyclooxygenase-2 (COX-2) expression in the oral mucosa following cancer chemotherapy. *Oral Oncol.* 2007; 43: 395–401
25. Sonis ST. The biologic role for nuclear factor- $\kappa$ B in disease and its potential involvement in mucosal injury associated with anti-neoplastic therapy. *Crit Rev Oral Biol Med.* 2002; 13: 380–389
26. Gibson RJ, Cummins AG, Bowen JM, Logan RM, Healey T, Keefe DM. Apoptosis occurs early in the basal layer of the oral mucosa following cancer chemotherapy. *Asian Pac J Clin Oncol.* 2006; 2: 39–49
27. Chen G, Goeddel DV .TNF-R1 signaling: a beautiful pathway". *Science.* 2002; 296 (5573): 1634–5.doi10.1126/science.1071924
28. Lima V, Brito G, Cunha F .Effects of the tumour necrosis factor- $\alpha$  inhibitors pentoxifylline and thalidomide in short-term experimental oral mucositis in hamsters. *Eur J Oral Sci.*2005; 113: 210–217
29. Orlicek S L, Branum K C, English B K, McCordic R, Shenep J L, Patrick C C. Viridans streptococcal isolates from patients with septic shock induce tumor necrosis factor- $\alpha$  production by murine macrophages. *J Lab Clin Med.* 1997; 130: 515-9
30. Fainstein V, Rodriguez V, Turck M, Hermann G, Rosenbaum B, Bodey GP. Patterns of oropharyngeal and fecal flora in patients with acute leukemia. *J Infect Dis.* 1981; 144: 10–18



31. Bergmann OJ. Alterations in oral microflora and pathogenesis of acute oral infections during remission-induction therapy in patients with acute myeloid leukaemia. *Scan J Infect Dis.* 1991; 23: 355–366
32. Sixou J-L, De Medeiros-Batista O, Bonnaure-Mallet M. Modifications of the microflora of the oral cavity arising during immunosuppressive chemotherapy. *Eur J Cancer B Oral Oncol.* 1996; 32B: 306–310
33. Janeway CA, Jr., Medzhitov R. Innate immune recognition. *Annu Rev Immunol* 2002; 20: 197-216
34. Matzinger, P. The danger model: a renewed sense of self. *Science.*2002; 296(5566): 3015
35. Sonis ST. New thoughts on the initiation of mucositis. *Oral Dis.* 2010; 16: 597-600. doi: 10.1111/j.1601-0825.2010.01681.x
36. Duan Z, Bradner JE, Greenberg E, Levine R, Foster R, Mahoney J, Seiden MV .SD-1029 inhibits signal transducer and activator of transcription 3 nuclear translocation. *Clin Cancer Res.*2006; 12, 6844–685
37. Rosen LS, Abdi E, Davis ID, Gutheil J, Schnell FM, Zalcborg J, Cesano A, Gayko U, Chen MG, Clarke S. Palifermin reduces the incidence of oral mucositis in patients with metastatic colorectal cancer treated with fluorouracil-based chemotherapy. *J Clin Oncol.* 2006; 24: 5194-200.
38. Spielberger R, Stiff P, Bensinger W, et al. Palifermin for oral mucositis after intensive therapy for hematologic cancers. *N Engl J Med.* 2004; 351: 2590-8
39. Peterson D, Petit R. Phase III study: AES-14 in patients at risk for mucositis secondary to anthracycline-based chemotherapy. *J Clin Oncol*, 2004 ASCO Annual Meeting Proceedings (Post-Meeting Edition). 2004; 22: 8008 ( Supplement 14S)
40. Peterson D. Bensadoun R, Roila F. On behalf of the ESMO Guidelines Working Group. Management of oral and gastrointestinal mucositis: ESMO Clinical Recommendations .*Ann Oncol* 2009; 20(suppl 4): iv174-iv177 doi:10.1093/annonc/mdp165

41. Tran CD, Sundar S, Howarth GS. Dietary zinc supplementation and methotrexate-induced small intestinal mucositis in metallothionein-knockout and wild-type mice. *Cancer Biol Ther.* 2009; 8: 1662-7.
42. Aspinall RJ, Pockros PJ .SCV-07 (SciClone Pharmaceuticals/Verta). *Curr Opin Investig Drugs* .2006; 7: 180-185
43. Hunter A, Mahendra P, Wilson K, Fields P, Cook G, Peniket A, Crawley C, Hickling R, Marcus R. Treatment of oral mucositis after peripheral blood SCT with ATL-104 mouthwash: results from a randomized, double-blind, placebo-controlled trial. *Bone Marrow Transplant.* 2009; 43: 563-9.
44. Loos M, Remaut E, Rottiers P, De Creus A. Genetically engineered *Lactococcus lactis* secreting murine IL-10 modulates the functions of bone marrow-derived dendritic cells in the presence of LPS. *Scand J Immunol.* 2009; 69: 130-9
45. Guimarães AL, Correia-Silva Jde F, Sá AR, Victória JM, Diniz MG, Costa Fde O, Gomez RS. Investigation of functional gene polymorphisms IL-1beta, IL-6, IL-10 and TNF-alpha in individuals with recurrent aphthous stomatitis. *Arch Oral Biol.* 2007; 52: 268-72.
46. Green J. C. ,Vermillion J. R. The simplified oral hygiene index. *J. Am. Dent Assoc.* 1964, 68: 7 – 1
47. Potting CM, Mank A, Blijlevens NM, Donnelly JP, van Achterberg T. Providing oral care in haematological oncology patients: nurses' knowledge and skills. *Eur J Oncol Nurs.* 2008; 12: 291-8.
48. Chomczynski P, Sacchi N. Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. *Anal Biochem* 1987; 162: 156e9
49. Chroma S, Iwanicka-Grzegorek E. Ocena stanu jamy ustnej u pacjentów chorych na stwardnienie rozsiane – badania pilotażowe. *Nowa Stomatologia* 1-2/2009; 9-12
50. Sonis S, Kunz A. Impact of improved dental services on the frequency of oral complications of cancer therapy for patients with non-head-and- neck malignancies. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol* 1988; 65: 19-22,
51. Djuric M, Hillier-Kolarov V, Belic, A., Jankovic L. Mucositis prevention by improved dental care in acute leukemia patients. *Support Care Cancer.* 2006; 14: 137-146

52. Öhrn KE, Wahlin YB, Sjoden PO. Oral status during radiotherapy and chemotherapy: a descriptive study of patient experiences and the occurrence of oral complications. *Support Care Cancer* 2001; 9: 247-57.
53. Iwanicka-Frankowska E., Wierzbicka M., Szatko F., Pierzynowska E., Zawadziński M. Stan zdrowia jamy ustnej osób dorosłych w wieku 65-74 lata w ostatnim pięcioleciu. *Stomat. Współ.*, 2003, 6, 9-13.
54. Hopwood P, Stephens RJ. Depression in patients with lung cancer: prevalence and risk factors derived from quality-of-life data. *J Clin Oncol.* 2000; 18: 893-903
55. Hahn P, Gunter Schaller H, Reinhardt D, Hellwig E. Caries prevalence, gingivitis and attitudes towards oral health among 50–60-year-old Germans. *Acta Med Dent Helv.* 1999; 4: 167–172
56. Sonis ST. Mucositis as a biological process: a new hypothesis for the development of chemotherapy-induced stomatotoxicity. *Oral Oncol.* 1998; 34: 39-43
57. O'Donnell A, Faivre S, Burris HA 3rd, Rea D, Papadimitrakopoulou V, Shand N, Lane HA, Hazell K, Zoellner U, Kovarik JM, Brock C, Jones S, Raymond E, Judson I. Phase I pharmacokinetic and pharmacodynamic study of the oral mammalian target of rapamycin inhibitor everolimus in patients with advanced solid tumors. *J Clin Oncol.* 2008; 26: 1588-95
58. Keefe DM, Schubert MM, Elting LS, Sonis ST, Epstein JB, Raber-Durlacher JE, Migliorati CA, McGuire DB, Hutchins RD, Peterson DE, Mucositis Study Section of the Multinational Association of Supportive Care in Cancer, International Society for Oral Oncology. Updated clinical practice guidelines for the prevention and treatment of mucositis. *Cancer* 2007; 109: 820-31
59. Peterson DE, Bensadoun RJ, Roila F; ESMO Guidelines Working Group. Management of oral and gastrointestinal mucositis: ESMO clinical recommendations. *Ann Oncol.* 2009; 20 Suppl 4: 174-7
60. Danson S, Middleton M, O'Byrne K et al. Phase III trial of gemcitabine and carboplatin versus mitomycin, ifosfamide, and cisplatin in patients with advanced non-small cell lung cancer. *Cancer* .2003; 98: 542–553

61. Oblon DJ, Paul SR, Oblon MB, Malik S. Propantheline protects the oral mucosa after high-dose ifosfamide, carboplatin, etoposide and autologous stem cell transplantation. *Bone Marrow Transplant.* 1997; 20: 961-3
62. BMI Classification. World Health Organization.
63. Cheng KK, Goggins WB, Lee VW, Thompson DR. Risk factors for oral mucositis in children undergoing chemotherapy: a matched case - control study. *Oral Oncol.* 2008; 44: 1019-25.
64. Robien K, Schubert MM, Bruemmer B, et al. Predictors of oral mucositis in patients receiving hematopoietic cell transplants for chronic myelogenous leukemia. *J Clin Oncol.* 2004; 22: 1268–1275
65. Tsalic M, Bar-Sela G, Beny A, et al. Severe toxicity related to the 5-fluorouracil/leucovorin combination (the Mayo Clinic regimen): a prospective study in colorectal cancer patients. *Am J Clin Oncol,* 2003; 26: 103-106
66. Sloan JA, Goldberg RM, Sargent DJ, Vargas-Chanes D, Nair S, Cha SS, Novotny PJ, Poon MA, O'Connell MJ, Loprinzi CL. Women experience greater toxicity with fluorouracil-based chemotherapy for colorectal cancer. *J Clin Oncol.* 2002; 20: 1491-8.
67. Allegra C. Thymidylate synthase levels: prognostic, predictive, or both?. *J. Clin. Oncol.* 2002; 20: 1711-1713
68. Rodningen OK, Overgaard J, Alsner J, et al. Microarray analysis of the transcriptional response to single or multiple doses of ionizing radiation in human subcutaneous fibroblasts. *Radiother Oncol.* 2005; 77: 231–240
69. Bowen JM, Gibson RJ, Cummins AG, Tsykin A and Keefe DMK . Irinotecan changes gene expression profiles in the small intestine of the rat with breast cancer, *Cancer Chemotherapy and Pharmacology* 2007; 59: 337-348
70. Fall-Dickson JM, Ramsay ES, Castro K, Woltz P, Sportés C. Oral mucositis-related oropharyngeal pain and correlative tumor necrosis factor-alpha expression in adult oncology patients undergoing hematopoietic stem cell transplantation. *Clin Ther.* 2007; 29 Suppl: 2547-61

71. Smith RV, Schlecht NF, Childs G, Prystowsky MB, Belbin TJ Pilot study of mucosal genetic differences in early smokers and nonsmokers. *Laryngoscope*. 2006; 116: 1375-9
72. Pritchard D. M., Potten C. S., Hickman J. A. The relationships between p53-dependent apoptosis, inhibition of proliferation and 5-fluorouracil-induced histopathology in murine intestinal epithelia. *Cancer Res*, 1998; 58: 5453-5465
73. Keefe D. M. K., Brealey J, Goland G.J, Cummins A.G. Chemotherapy for cancer causes apoptosis that precedes hypoplasia in crypts of the small intestine in humans,” *Gut* 2000; 47: 632–637.
74. Gibson RJ, Cummins AG, Bowen JM, et al. Apoptosis occurs early in the basal layer of the oral mucosa following cancer chemotherapy. *Asia Pac J Clin Oncol* 2006; 2: 39-49
75. Chen E. Impact of pre-existing psoriasis and Addison’s disease on chemotherapy-induced mucositis in patients with hematological malignancies. Pre-doctoral thesis, Harvard School of Dental Medicine; 2004.
76. Huang DW , Sherman BT, Lempicki RA. Systematic and integrative analysis of large gene lists using DAVID bioinformatics resources. *Nature Protocols* 4; 44 - 57 (2009)  
Published online: 18 December 2008 | doi: 10.1038/nprot.2008.211
77. Sonis ST. A biological approach to mucositis. *J Support Oncol*. 2004; 2: 21-32; 35-6
78. Xanthinaki A, Nicolatou-Galitis O, Athanassiadou P, Gonidi M, Kouloulis V, Sotiropoulou-Lontou A, Pissakas G, Kyprianou K, Kouvaris J, Patsouris E. Apoptotic and inflammation markers in oral mucositis in head and neck cancer patients receiving radiotherapy: preliminary report. *Support Care Cancer*. 2008; 16: 1025-33.
79. Arlt A, Vorndamm J, Breitenbroich M, Folsch UR, Kalthoff H, Schmidt WE, Schafer H Inhibition of NF-kappaB sensitizes human pancreatic carcinoma cells to apoptosis induced by etoposide (VP16) or doxorubicin. *Oncogene* 2001; 20: 859–868
80. Das KC , White CW . Activation of NF-kappaB by antineoplastic agents. Role of protein kinase C. *J Biol Chem* .1997; 272: 14914-14920
81. Kato T, Duffey DC, Ondrey FG, Dong G, Chen Z, Cook JA, Mitchell JB, Van Waes C. Cisplatin and radiation sensitivity in human head and neck squamous carcinomas are independently modulated by glutathione and transcription factor NF-kappaB. *Head Neck*. 2000; 22: 748-59

82. Donepudi M, Raychaudhuri P, Bluestone JA, Mokyr MB. Mechanisms of melphalan-induced B7-1 gene expression in P815 tumor cells. *J Immunol* 2001;166:6491–9
83. Weldon CB, Burow ME, Rolfe KW, et al. NF-kappa B-mediated chemoresistance in breast cancer cells. *Surgery* 2001; 130: 143-150
84. Radhakrishnan SK, Kamalakaran S. Pro-apoptotic role of NF-kappaB: implications for cancer therapy. *Biochim Biophys Acta*. 2006; 1766: 53-62.
85. Cheng Q, Lee HH, Li Y, Parks TP, Cheng G. Upregulation of Bcl-x and Bfl-1 as a potential mechanism of chemoresistance, which can be overcome by NF-kappaB inhibition. *Oncogene*. 2000; 19: 4936-40.
86. Voboril R, Hochwald SN, Li J, Brank A, Weberova J, Wessels F, Moldawer LL, Camp ER, MacKay SL. Inhibition of NF-kappa B augments sensitivity to 5-fluorouracil/folinic acid in colon cancer. *J Surg Res*. 2004; 120: 178-88.
87. Bartke T, Siegmund D, Peter N, Reichwein M, Henkler F, Scheurich S et al: P53 upregulates cFLIP, inhibits transcription of NF-Kappa B-regulated genes and induces caspase-8-independent cell death of DLD-1 cells, *Oncogene*, 2001; 20: 571-580,
88. Hakem R, Hakem A, Duncan GS, Henderson JT, Woo M, Soengas MS, Elia A, de la Pompa JL, Kagi D, Khoo W, Potter J, Yoshida R, Kaufman SA, Lowe SW, Penninger JM, Mak TW. Differential requirement for caspase 9 in apoptotic pathways in vivo. *Cell*. 1998; 94: 339-52
89. Sun X. M, MacFarlane M, Zhuang J, Wolf B. B, Green D. R, Cohen G. M. Distinct caspase cascades are initiated in receptor-mediated and chemical-induced apoptosis. *J. Biol. Chem.*, 27
90. Druskovic M, Suput D, Milisav I. Overexpression of caspase-9 triggers its activation and apoptosis in vitro. *Croat Med J*. 2006; 47: 832-40
91. Linke A, Goren I, Bösl MR, Pfeilschifter J, Frank S. Epithelial overexpression of SOCS-3 in transgenic mice exacerbates wound inflammation in the presence of elevated TGF-beta1. *J Invest Dermatol*. 2010; 130: 866-75.
92. Iwahori K, Serada S, Fujimoto M, Nomura S, Osaki T, Lee CM, Mizuguchi H, Takahashi T, Ripley B, Okumura M, Kawase I, Kishimoto T, Naka T. Overexpression of SOCS3

exhibits preclinical antitumor activity against malignant pleural mesothelioma. *Int J Cancer*. 2010 Epub 10.1002/ijc.25716

93. Shimada M, Ina K, Kyokane K, Imada A, Yamaguchi H, Nishio Y, Hayakawa M, Iinuma Y, Ohta M, Ando T, Kusugami K. Upregulation of mucosal soluble fas ligand and interferon-gamma may be involved in ulcerogenesis in patients with *Helicobacter pylori*-positive gastric ulcer. *Scand J Gastroenterol*. 2002; 37: 501-11

94. Galligan L, Longley DB, McEwan M, Wilson TR, McLaughlin K, Johnston PG.

Chemotherapy and TRAIL-mediated colon cancer cell death: the roles of p53, TRAIL receptors, and c-FLIP. *Mol Cancer Ther*. 2005; 4: 2026-36

95. Zhang H, Holzgreve W, De Geyter C. Bcl2-L-10, a novel anti-apoptotic member of the Bcl-2 family, blocks apoptosis in the mitochondria death pathway but not in the death receptor pathway. *Hum Mol Genet* 2001; 10: 2329–39

96. Villunger A, Michalak EM, Coultas L, et al. p53- and drug-induced apoptotic responses mediated by BH3-only proteins puma and noxa. *Science* 2003; 302: 1036–1038

97. Kim MR, Jeong EG, Chae B, Lee JW, Soung YH, Nam SW, Lee JY, Yoo NJ, Lee SH .

Pro-apoptotic PUMA and anti-apoptotic phospho-BAD are highly expressed in colorectal carcinomas. *Dig Dis Sci*. 2007; 52: 2751-6

98. Han X, Osuntokun B, Benight N, Loesch K, Frank SJ, Denson LA. Signal transducer and activator of transcription 5b promotes mucosal tolerance in pediatric Crohn's disease and murine colitis. *Am J Pathol*. 2006; 169: 1999-2013

