

NADOROVA HYPOXIE A VLIV PODPURNÉ LÉEBY ERYTROPOETINEM NA VÝSLEDKY PROTINADOROVÉ LÉEBY

TUMOR HYPOXIA AND AN IMPACT OF SUPPORTIVE CARE BY ERYTHROPOIETIN ON CANCER TREATMENT RESULTS

VODVAŘKA P.

RADIOTERAPEUTICKA KLINIKA FNŠP OSTRAVA

Souhrn: Výskyt hypoxických oblastí ve tkáních zhoubných nádorů je jejich obvyklou vlastností. Hypoxie - snížení parciálního tlaku kyslíku - je způsobeno větší vzdáleností některých oblastí nádoru od nově vytvořených kapilár a nedostatečností nově vytvořené kapilární sítě. K hypoxii přispívá častý výskyt anémie u nemocných se zhoubnými nádory. Nedostatek kyslíku během ozáření a těsně po jeho ukončení a snad i během podávání některých cytostatik vede ke zvýšení rezistence nádorové tkáně k uvedeným léčebným metodám. Hypoxie v nádoru vede rámcově ke třem skupinám nežádoucích jevů: 1) k tvorbě proteinů závislých na hladině kyslíku (oxygen related proteins), které usnadňují metastázování nádoru, 2) ke genetické nestabilitě a tím selekci buněk s agresivnějším chováním, což se projeví na větší agresivitě celého nádoru a 3) k angiogenezi, která umožňuje progresi nádoru. V současné době jsou k dispozici výsledky studií ukazující, že korekce anemie erythropoetinem vede ke zlepšení výsledků léčby radioterapií jak v experimentech na zvířatech tak ke zlepšení odpovědi na léčbu chemo-radioterapií u nemocných s nádory hlavy a krku. V přehledu jsou uvedeny údaje o důležitých souvislostech výskytu hypoxie, anémie, chování nádoru, vlivu hypoxie na léčbu a možnosti korekce tohoto stavu erythropoetinem. Podávání erythropoetinu jako léčby podpurné u nemocných s anemií vede při současné konzervativní onkologické léčbě ke statisticky významnému zlepšení výsledků onkologické léčby.

Klíčová slova: hypoxie, anémie, radioterapie, chemoterapie, erythropoetin

Summary: Hypoxic regions are regular finding in tissue of malignant tumors. Hypoxia -decrease of partial pressure of oxygen - is caused by longer distance of some tumor regions from newly created capillars and by insufficiency of newly created capillar network. Various kinds of anaemia in cancer patients potentiate hypoxia in those tumors. Lack of oxygen during radiotherapy and immediately after it and during administration of certain cytostatics causes increase of resistancy of cancer tissues to the treatment methods. Hypoxia in cancer causes three groups of events: 1) production of oxygen related proteins enhances a process of tumor metastazing, 2) genetic instability and selection of more aggressive tumorous cells and more aggressive behaviour of the tumor and 3) angiogenesis which enhances a tumor progression. Results of studies performed recently have shown anaemia correction by erythropoietin could improve results of radiation therapy and chemotherapy carried in both animal and human studies on head and neck cancer patients. In the review there are data given on important associations of incidence of hypoxia, anaemia, tumor behaviour, influence of hypoxia on the cancer treatment and an occassion of correction of the status by erythropoietin. Administration of erythropoietin as a supportive care in patients with anaemia during conservative oncological treatment improves results of the treatment significantly.

Key words: hypoxia, anaemia, radiotherapy, chemotherapy, erythropoietin

Přítomnost hypoxických oblastí ve tkáni solidních nádorů, tj. oblastí s nízkou hladinou kyslíku / O_2 / je jejich charakteristickou patofyziologickou vlastností, která byla prokázána u řady experimentálních i klinicky se vyskytujících zhoubných nádorů. Poprvé prokázal existenci hypoxických okrsků v nádorové tkáni Thomlinson v roce 1955(49). Thomlinson studoval histologické preparáty z bronchogenního karcinomu a zjistil, že skupiny nádorových buněk rostou v solidních provazcích, které jsou obklopeny vazivově cévním stromatem, z něhož jsou buňky nádoru vyživovány, a z něhož tedy také dostávají potřebný kyslík. Když se nádor dále postupně zvětšuje, objevují se v něm nekrotické okrsky, které jsou lokalizovány v centrech provazců ve vzdálenosti 100 μ m - 180 μ m od cév, což odpovídalo teoretickým výpočtům dosahu difúze kyslíku v respirující tkáni. Thomlinson došel k názoru, že kyslík difundující z cév je přednostně konzumován bližšími buňkami a že za vzdáleností, do níž může kyslík difundovat,

nejsou buňky schopny přežít a podléhají nekróze.

V roce 1968 publikoval Tannock názor, že skutečností odpovídá obrácený Thomlinsonův obrázek, tedy že i s ohledem na neoangiogenesu je v centru céva, která je obklopena nádorovými buňkami(47). V určité vzdálenosti od cévy dochází k nekrotickým nádorových buněk, protože výsledné zásobení nestačí potřebám rychlého růstu nádorových buněk. Již v roce 1953 publikovali Gray et al., že odpověď buněk na ozáření ionizujícím záření velmi významně na kyslíku (18). Totéž zjistili Wright et al.(58). Křivky přežití savčích buněk v suspenzi ozářených za normálních podmínek se lišily od křivek přežití stejných druhů buněk ozářených po 30minutovém ovlivnění plynným dusíkem. V normálních podmínkách oxygenace bylo přežití nižší, poměr dávek při dosažení stejného přežití buněk (tedy dosažení stejného biologického účinku, nebo endpointu) se pro danou buněčnou populaci nemění a lze jej vyjádřit jako OER (oxygen

enhancement ratio), který je pro většinu savčích buněk ozářených paprsky X roven 3,0. Později bylo zjištěno, že se OER při dávkách nižších než 3,0Gy snižuje. Tento náleze byl důležitý, protože se týká oblasti dávek používaných v klinické praxi. Kyslík však musí být přítomen během ozáření, anebo v době několika milisekund ihned po ozáření (27,36).

Pro anoxické podmínky se OER rovná jedné. Při zvyšování parciálního tlaku kyslíku pO_2 , se OER (tedy radiosenzitivita) prudce zvyšuje. Rychlé zvýšení hodnoty OER lze zjistit při zvýšení pO_2 od 0 mmHg do 20 mmHg, při pO_2 vyšším až do normálního pO_2 v normálním vzduchu - $pO_2 = 155$ mmHg, anebo ozáření v kyslíku za normálního atmosférického tlaku 760 mmHg se již OER zvyšuje jen mírně.

Mechanismus účinku kyslíku ve tkáních ozářených nepřímo ionizujícími druhy záření (γ -paprsky izotopu ^{60}Co a ^{137}Cs , rtg -záření, brzdné záření lineárních urychlovačů) se vysvětluje kyslík-fixační teorií. Jakmile se dávka záření absorbuje ve tkáni, vznikají volné radikály, které jsou velmi reaktivní. Narušují chemické vazby důležitých molekul tkáně a působí tím změny chemické, čímž zahajují řetězec dalších událostí, které ústí do změn, jejichž výsledkem je biologické poškození tkáně (v radioterapii důvod, proč se záření užívá). Volné radikály působí dvojným způsobem - přímým, když jsou přímo poškozeny cílové molekuly (elektronem z jaderného obalu uvolněného energií fotonu dodaného ozařováním, anebo nepřímým, když je poškození molekul způsobeno právě reakcí volných radikálů vznikajících ve vodě, protože v savčích buňkách je obsaženo 70% - 80% vody. Volné radikály, označované jako R^* reagují za přítomnosti kyslíku tak, že vzniká RO_2^* , který dále reaguje a dává vzniku $ROOH$ v cílové molekule. Tím vzniká chemické poškození, které se fixuje v cílové molekule. Není-li ve tkáni kyslík, pak dochází rychle k redukci R^* na RH a tím vzniká původní sloučenina, z níž volný radikál vznikl.

Výsledná oxygenace tkáně je dána několika faktory:

- Parciálním tlakem kyslíku
- Možnostmi saturace nosiče kyslíku (koncentrace hemoglobinu, počet erytrocytů, kvalita hemoglobinu)
- Hustotou krevních kapilár ve tkáni (vzdálenostmi buněk od zásobujících cév)
- Krevním tlakem v cévách

Dostupnost kyslíku pro tkáň (normální i nádorovou) je dána třemi faktory: obsahem kyslíku v mikrocirkulaci, difúzním tlakem a nutričním perfúzí. Výsledná oxygenace je dána poměrem mezi dostupností a spotřebou kyslíku ve tkáni.

Oxygenace lidských nádorů

Přítomnost hypoxických oblastí v nádorech lidí je charakteristickou patofyziologickou vlastností solidních nádorů. Existence hypoxických oblastí ve tkáni je výsledkem nepochybně mezi zásobením a spotřebou kyslíku. V normálních tkáních je požadavek spotřeby O_2 splněn jeho dodávkou. U solidních nádorů může požadavek spotřeby O_2 převážit nad možnostmi jeho dodávky a výsledkem je vznik hypoxických oblastí s nízkou hladinou O_2 . Vaupel et al. udávají následující hlavní patogenetické mechanismy hypoxie ve zhubných nádorech(52):

- plicní hypoxie
 - primární plicní nádory
 - metastázy na plicích
- hypoxie z omezené difúze
 - zvětšení vzdáleností mezi cévami
 - chaotická mikrocirkulace
- cirkulační hypoxie
 - ischemie
 - stagnace proudu
 - pouze průtok plazmy
- anemická hypoxie
 - funkční (Met-Hb, HbCO)
 - hematologická

Stav oxygenace u ca prsu

V mnohých karcinomech prsu jsou heterogenně rozloženy oblasti hypoxické tkáně jako výsledek zmenšené a anizotropní mikrocirkulace. Průměr a medián naměřených hodnot parciálních tlaků kyslíku (pO_2) v nádorech různých klinických stádií a histologických grádingů jsou zřetelně nižší než v normální tkáni prsu(49, 51). Průměr a medián pO_2 v normální tkáni prsu byl 65mmHg, zatímco v karcinomech stádií pT2b - 4 byl medián pO_2 28mmHg. Jedna třetina karcinomů prsu měla hodnoty pO_2 mezi 0 a 2,5mmHg, tzn., že se v nádoru prsu vyskytovaly oblasti tkáně s menší než poloviční radiosenzitivitou. Naproti tomu se v normálním prsu nevyskytly hodnoty pO_2 nižší než 12,5 mmHg. Typicky se v karcinomech prsu zjišťuje bimodální distribuce pO_2 , která může být obrazem koexistencí velkých normoxických a hypoxických oblastí v nádoru, nebo relevantním příspěvkem pO_2 v (částečně zánětlivé?) stromální složce karcinomu prsu. Oxygenace v karcinomu prsu a výskyt hypoxie a anoxie nejsou v žádném vztahu s klinickým stádiem (12, 13, 14, 50). Hodnoty pO_2 mezi 0 - 2,5 mmHg tvoří 6% u nádorů T1 a T2 a 7% u nádorů T3 a T4. Podobně nebyl zjištěn vztah mezi velikostí nádoru a krevním průtokem (19, 57). Dále existují jasné důkazy, že způsob oxygenace nekoreluje s histologickým typem nádoru, menopauzálním stavem, rozsahem nekrózy nebo fibrózy, či s dalšími klinicky závažnými parametry (stav hormonálních receptorů, hladina hemoglobinu, kuřáctví) (12, 43, 50). V nedávné studii byla nalezena korelace mezi hodnotami pO_2 , zjištěné hypoxické fraxe, stupněm diferenciací a prognostickými faktory (25).

Nádory děložního čípku

Analýza pO_2 měřeného ve tkáni normálního čípku děložního žen, které nerodily, ukázala, že oxygenace je normální, tkáně jsou přiměřeně zásobeny $pO_2 = 48$ mmHg. Průměr i medián měření hodnot pO_2 byly pravidelně významně nižší u již rodivších žen s normálním čípkem děložním (pravděpodobně následkem změn po vaginálním porodu). Medián pO_2 byl 13mmHg (přičemž 14% hodnot bylo v rozmezí $pO_2 = 0$ - 2,5mmHg). U karcinomů děložního čípku stádia FIGO I/IIb-IV byl před léčbou medián $pO_2 = 10$ mmHg. Dosud vykazalo asi 35% cervikálních karcinomů hodnoty pO_2 mezi 0 - 2,5mmHg. Relativní četnost hodnot pO_2 mezi 0 - 2,5 mmHg byla zjištěna v rozmezí 1% (u karcinomu FIGO IV) až 82% (u karcinomu FIGO III) (21).

U karcinomů FIGO I a II je medián zjištěných hodnot $pO_2 = 11$ mmHg a u stádií FIGO III a IV je medián hodnot $pO_2 = 10$ mmHg s tím, že 6% a 18% hodnot je u uvedených stádií v nejnižší třídě pO_2 (0 - 2,5mmHg). Podobně jako u karcinomu prsu, nebyla před zahájením léčby karcinomu děložního čípku zjištěna korelace mezi velikostí nádoru a výskytem hypoxie nebo anoxie, ani mezi dalšími klinickými parametry, jak byly uvedeny u karcinomu prsu, s výjimkou hladiny hemoglobinu.

Z dřívějších studií oxygenace u karcinomu děložního čípku je známo, že pacientky se závažnou anémií - hemoglobin(Hb) 110 g/l - měly tendenci mít nižší hodnoty pO_2 u karcinomu cervixu než pacientky s normální koncentrací Hb 140 g/l; $p=0,05$). Frakce „hypoxických“ pO_2 hodnot (0 - 2,5 mmHg) byla signifikantně vyšší v anemické skupině než u pacientek s normální koncentrací Hb ($p=0,004$).

Hypoxie byla zjištěna ve všech vyšetřovaných nádorech, kromě již uvedených také u rektálního karcinomu, bronchogenního karcinomu, karcinomů hlavy a krku, glioblastomu, u sarkonů měkkých tkání, u melanomu (5, 53). Stupeň hypoxie se však liší u různých nádorů s tím, že nejvyšší stupeň byl zjištěn u glioblastomu a nejnižší u karcinomu prsu a karcinomů hlavy a krku. Dále je zjištěna značná individuální heterogenita nálezů hypoxie u nádorů stejné histologie.

Rovněž byly zjištěny rozdíly v oxygenaci primárního nádoru

a jeho metastáz v lymfatických uzlinách. Původně to zjistili Becker et al. u 15 nemocných se spinocelulárními karcinomy hlavy a krku (SCCHN)(2). Pozdější výsledky získané u 22 nemocných naznačují, že stav oxygenace zjištěný v primárním nádoru je významně ($p=0,0001$) vztažen k oxygenaci sekundárního nádoru v uzlinách tak, že pro zjišťování stavu oxygenace SCCHN je dostatečné měření pouze v jedné lokalitě.

Souhrn dostupných údajů o předléčebné oxygenaci tumoru (především pro karcinom prsu a karcinom čípku děložního) - (52)

- Oxygenace nádoru, jako krevní průtok nádorem a mikrocirkulace je anizotropní a snížena ve srovnání s normálními tkáněmi.
- Nádorová oxygenace není regulována podle metabolických požadavků jako je tomu u normálních tkání.
- Mediány hodnot pO_2 v primárních nádorech jsou průměrně nižší než v normálních tkáních, z nichž nádory vyrůstají.
- Řada solidních nádorů obsahuje oblasti s deplecí O_2 .
- Variabilita v oxygenaci různých nádorů je větší než variabilita oxygenace v jednom nádoru.
- Oxygenaci nádoru nelze předpovědět na podkladě klinického stádia a histologického gradingu.
- Oxygenace nádoru není závislá na dalších známých onkologických parametrech.
- Oxygenace nádoru není závislá na demografických údajích pacienta.
- U lokálně pokročilých karcinomů krčku děložního se medián hodnot pO_2 zvyšuje se zvyšující se koncentrací hemoglobinu.
- Lokální recidivy karcinomů prsu a krčku děložního mají vyšší hypoxickou frakci než primární nádory.
- U karcinomů děložního čípku s větší hypoxickou frakcí je větší pravděpodobnost lokální recidivy.

Oxygenace zdravých tkání

Většina normálních zdravých tkání je z radiobiologického hlediska euoxická, mírná hypoxie byla zjištěna pouze v chrupavkách a v kůži. Nádorem nepostížené normální tkáně mohou být hypoxické - viz výše - po traumatizaci (čipek děložní).

Hypoxická frakce

Hypoxická frakce je termín označující frakci klonogenních nádorových buněk, jejichž radiosenzitivita je charakteristická pro hypoxické buňky. Hypoxická frakce se měří následujícím způsobem: Skupina živočichů nesoucí transplantované nádory je rozdělena řečneme do šesti podskupin, které jsou ozářeny, když dýchají vzduch a dalších šest skupin, které jsou zabity 15 minut před ozářením, a tak majících tkáně hypoxické. Dávky záření budou zvoleny v rozmezí, jímž je dosaženo horního limitu, při kterém je ještě zaznamenáno přežití buněk. Po ozáření in vivo, je přežití buněk studováno in vitro. U živočichů dýchavších vzduch bude křivka přežití bifázická, odrážející tak radiosenzitivitu směsi oxických a hypoxických buněk. U zabitých živočichů bude patrná pouze hypoxická komponenta. Skutečnost, že dvě křivky přežití jsou paralelní, potvrzuje, že jsou obě charakteristické pro hypoxické buňky. Jestliže v jakémkoli bodě křivek přežití, kde jsou již paralelní, spustíme vertikální linii (kolmici k ose x), dává vzniknuvší poměr hodnot (přežití u vzduch dýchajících buněk ku přežití u mrtvých živočichů) hypoxickou frakci buněk nádoru u vzduch dýchajících živočichů (46).

Hypoxický subvolum HSV

Z praktického hlediska - především pro odhad lokálních recidiv - je parametrem hypoxická frakce (procentuální podíl $pO_2 < 5\text{mmHg}$, nebo $pO_2 < 2,5\text{mmHg}$) a medián pO_2 (23). Obě veličiny byly prvními parametry předznamenávajícími špatnou prognózu, když byly u karcinomu děložního čípku po-

zorovány vysoká frekvence předléčebných hodnot pO_2 ($< 5\text{mmHg}$, $p=0,01$) a nízký medián pO_2 ($p=0,03$). U sarkomů měkkých tkání se ukázalo, že špatná oxygenace předznamenává zvýšenou pravděpodobnost vzdálených metastáz (6). Brizel et al. ukázali, že předléčebná hypoxická frakce (procentuální podíl $pO_2 < 5\text{mmHg}$) u SCCHN, které recidivovaly, byla významně vyšší než u nádorů, které byly lokálně zvládnuty (7, 39, 40, 45.). Proto bylo konstatováno, že relativní hypoxický objem tumoru (=hypoxická frakce) u SCCHN je nádorový biologický parametr, který může být užít k identifikaci relativně radiorezistentních nádorů (45). Molls et al. dále vypočítali absolutní hypoxický objem tumoru (procentuální podíl $pO_2 < 5\text{mmHg}$ vynásobený celkovým objemem nádoru) a nazvali tento parametr hypoxický subvolum (HSV). Tento HSV byl v jejich studii nejlepším prognostickým faktorem pro celkové přežití ($p=0,01$ tedy statisticky silnější než hypoxická frakce, viz výše), zatímco celkový objem nádoru sám neměl žádný významný vliv na výsledky léčby nemocných se SCCHN (45).

Současné techniky hodnocení oxygenace humánních nádorů

Klasickou metodou měření oxygenace je měření radiační odpovědi. U animálních modelů, lze užít jednu ze tří metod: 1) párová křivka přežití, 2) růst nádoru při uzavřeném krevním zásobení, 3) lokální zvládnutí nádoru při uzavření krevního zásobení. Všechny tři metody využívají srovnání odpovědi při ozařování v plné vzdušné atmosféře, nebo při arteficiální plné hypoxii(26).

V tabulce č.1 jsou uvedeny potenciální metody zjišťování hypoxie v nádorech u lidí. Zřejmě jedinou dostupnou metodou, která umožňuje zhodnocení celého spektra oxygenačních hladin v nádoru jsou techniky polarografické elektrody, jimiž se určují distribuce parciálních tlaků kyslíku pO_2 .

Tyto metody byly rozsáhle použity k měření stavu oxygenace zhoubných nádorů u lidí. Ve všech těchto studiích bylo zjištěno, že lepší léčebou odpověď lze dosáhnout u dobře okysličených nádorů. Protože radioterapie byla u všech těchto nádorů

Tabulka č.1: Potenciální metody pro měření stavu oxygenace v nádorech u lidí

Nádorová vaskularizace
- interkapilární vzdálenosti
- vaskulární denzita
- vzdálenost nádorových buněk od nejbližší cévy
Saturace hemoglobinu kyslíkem
- kryospektroskopie
- téměř infračervená spektroskopie
Metabolická aktivita nádoru
- biochemická/HPLC analýza
- bioluminescence
- NMR/PET
Poškození DNA
- Comet assay
- alkalická eluce
Hypoxické markery
- Imunohistochemie (např. PIMO/EF5/NITP)
- ^{18}F - fluoromisonidazol
- ^{125}I - iodoazomycin arabinosid
Distribuce parciálního tlaku vzdušného kyslíku
- polarografické kyslíkové elektrody
- ^{19}F - NMR spektroskopie
Různé
- ESR spektroskopie
- Intersticiální tlak nádoru
- zobrazení fosforescence
- hypoxické stresové proteiny

primární léčbou, výsledek nepřekvapuje. Nedávno však bylo zjištěno, že lepších výsledků bylo dosaženo také u nádorů, které byly léčeny chirurgicky (22), což by mohlo být v souladu

Tabulka č. 2: Příčiny anémie u onkologických pacientů

Krevní ztráta	způsobená akutní nebo chronickou hemoragií
Hemolýza	autoimunní hemodialýza (např. u pacientů s CLL)
Infiltrace kostní dřene	metastatické postižení kostní dřene
Deficience vitamínu B12 nebo kyseliny listové	spojená s nádorovou malnutricí
Porucha utilizace železa	zvýšená vazba železa na feritin
Zpomalená proliferace a maturace prekurzorů erytrocytů	snížená citlivost prekurzorů erytrocytů k erytropoetinu
Nepříměřená syntéza erytropoetinu	Nepříměřená endogenní erythropoesa ve vztahu ke koncentraci hemoglobinu
Chemoterapie	Manifestace anémie (zvláště často u platinových derivátů, vysokodávková ne-platinová chemoterapie)
Radioterapie	Postihuje všechny rychle se dělicí buňky včetně erythropoetických buněk
Anémie při chronických a zánětlivých onemocněních	Multifaktoriální proces spuštěný některými cytokiny (IL-1, IL-6, TNF- α)

s hypoxií navozenou větší agresivitou nádoru.

Podrobný komentář k metodám uvedeným v tabulce je uveden v práci Horsman MR et al. (26)

Biologický a terapeutický význam nádorové hypoxie

Nádorová hypoxie je považována za jednu z vedoucích multifaktoriálních příčin rezistence nádorů k jejich konvenční léčbě: k řídkce ionizujícímu ozařování (X a γ -záření), k některým cytostatikům (O_2 dependentní látky jako alkyllancina, bleomycin, či bioreduktivní látky jako mitomycin C), k fotodynamické léčbě, k biologické terapii (např. TNF- α , IL-2), k lokalizované hypertermii.

Dále se zjistilo, že hypoxie je vedoucím regulátorem genové aktivity uplatňující se při progresi nádoru: exprese genů VEGF, p53, GLUT, P-glykoprotein (s vlivem na angiogenesu, nižší potenciál apoptózy, rezistenci k léčbě), mutagenesa (genetická nestabilita, klonální heterogenita), vývoj agresivního fenotypu (nádorová progresie, metastatický potenciál a potenciál invaze, angiogenesa), vliv na metabolismus energie (acidóza, hladina ATP, homeostáza pH), parametry buněčné proliferace (proliferanční kapacita, pozice buněk v cyklu, adc) (38, 52).

Závěrem této části můžeme konstatovat, že nedostatečná oxygenace nádoru (ať už je způsobena jakoukoli příčinou) vede rámcově ke třem skupinám nežádoucích jevů: 1) k tvorbě proteinů závislých na hladině kyslíku (oxygen related proteins), které usnadňují metastázování nádoru, 2) ke genetické nestabilitě a tím selekci buněk s agresivnějším chováním, což se projeví na větší agresivitě celého nádoru a 3) k angiogenezi, která umožňuje progresi nádoru.

Hemoglobin a hypoxie

Až dosud jsme se zabývali hypoxií nádorových buněk, která je způsobena nedostatečně hustou sítí nově vytvořené mikrovaskularizace v nádoru, nedostatečným průtokem krve v této nedostatečně vytvořené síti s omezenými možnostmi regulace průtoku krve (často stagnace krve), tedy hypoxií z převážně lokálních příčin. U nemocných s nádory se často vyskytují různé druhy anémií (viz Tabulka č. 3), které způsobují hypoxii systémovou, která ovšem prohlubuje hypoxii v místě nádoru.

Výsledky léčby pacientů s karcinomy hlavy a krku, krčku děložního, plic a močového měchýře byly ovlivněny hladinou hemoglobinu. Skutečnost, že jak nízký pO_2 tak anémie jsou spojovány s kratší dobou přežití naznačuje vztah mezi oběma parametry (17). Další autoři zjistili, že nemocní se závažnou anémií mají tendenci mít nižší hodnoty pO_2 (23,24) a publikovali názor, že nízké hodnoty hemoglobinu u pacientů s SCCHN jsou spojeny s nízkým mediánem pO_2 a vysokou hypoxickou frakcí nebo velkým HSV (2, 3, 45). Proto konstatují, že nízká hladina hemoglobinu přispívá k nádorové hypoxii a že korekce nízké hladiny hemoglobinu před zahájením léčby může přinést významné zlepšení oxygenace nádoru.

Anémie u nemocných se zhoubnými nádory

Anémie doprovází často zhoubné nádory, především pak nádory v pokročilých stádiích. Je zásadní rozdíl mezi (radio- a chemo-

) terapií - indukovanou anémií. V závislosti na druhu nádoru a intenzitě radio- a chemoterapie a výsledku této léčby se v jejím průběhu rozvine anémie až u 60 % pacientů. Příčiny anémie jsou různé. Až dosud však bylo jen málo z nich podrobeno pečlivému vyšetření. U zdravých lidí je koncentrace erytrocytů udržována v konstantní hladině komplexním regulačním systémem. Nejdůležitějšími proměnnými v udržování koncentrace erytrocytů jsou jejich produkce a degradace. Např. u zdravých osob je denně produkováno asi 20 ml zralých erytrocytů. Produkce je primárně řízena hormonem erytropoetinem, tj. glykoproteinem, který je přednostně produkován v ledvinách a stimuluje konverzi prekurzorů na zralé erytrocyty. Produkce erytropoetinu se zvyšuje se snižující se oxygenací tkání, tj. je nepřímo úměrná změnám koncentrace erytrocytů. U nemocných s nádory je však rovnováha mezi produkcí erytrocytů a jejich degradací často velmi vážně porušena několika způsoby - Tabulka č. 2 (34).

Anémie při nádorových onemocněních (tumor associated anemia)

Hematologicky a biochemicky připomíná anémie při nádorových onemocněních připomíná anémii při chronických a zánětlivých onemocněních (ACD). Anémie při nádorových onemocněních je typicky normochromní a normocytární a je doprovázena sníženým počtem retikulocytů, redukcí vazebnou kapacitou sérového železa v přítomnosti normální až elevované hladiny sérového feritinu a zásobního železa (8). Různé procesy mohou přispívat k projevům anémie při nádorových onemocněních: vnitřní krvácení, zkrácené přežívání erytrocytů a primárně redukcí tvorba nových erytrocytů. Na začátku 90. let publikovali Miller et al., že u nemocných s anémií při nádorových chorobách nelze zjistit inverzní vztah mezi hladinami hemoglobinu a erytropoetinu (37). Jinými slovy: v mnohých případech není hladina erytropoetinu zvýšena ve stupni, který by odpovídal stupni anémie.

Nedávné studie ukazují, že příčinným důvodem tohoto fenoménu je multifaktoriální proces spuštěný tumor-indukovanou aktivací imunologického a inflamatorního systému. In vitro studie ukazují, že cytokiny interleukin-1 (IL-1) a méně významně interleukin-6 (IL-6) stejně jako tumor necrosis faktor (TNF- α) mohou mít značný inhibiční účinky na produkci erytropoetinu (9, 41).

Další substancí, která může inhibovat produkci erytropoetinu je interferon gamma (INF- γ). Shora uvedené cytokiny mohou přímo suprimovat erythropoesu v kostní dřeni (28). Tyto výsledky jsou podpořeny preklinickými studiemi, v nichž lidský IL-6 indukoval anémii (44). Doweiko et al. zjistili, že koncentrace IL-1 a TNF jsou často zvýšeny u nemocných s nádory, ale přesnou úlohu, kterou mají ve vývoji anémie při nádorových onemocněních je nutno ještě objasnit v dalších klinických studiích (9).

Léčba anémie a (hypoxie) transfúzemi

Protože hypoxie v nádoru je považována za jednu z nejdůležitějších multifaktoriálních příčin rezistence nádorů

k jejich konvenční léčbě a hraje zásadní roli v genové regulaci při progresi nádoru a je příčinou zvýšené exprese angiogenních faktorů a potažmo angiogenese v nádoru, čili má vliv jak na lokální progresi, tak na metastázování a vznik rezistentních klonů nádorových buněk, jak jsme se podrobněji zmínili výše, je logickým léčebným krokem hypoxii překonat. Jak jsme již také uvedli, na vzniku hypoxie se nemalou měrou podílí anémie nositele nádoru.

V naší běžné klinické praxi je nemocným s anémií při nádorovém onemocnění nejčastěji aplikována transfúze allogenní erythrocytární masy, případně promytých erythrocytů. Při operačním řešení bývá anémie korigována autologní erythrocytární masou. Indikací k aplikaci transfúze během konzervativní onkologické léčby bývá anémie s klinickými projevy, anebo pokles koncentrace hemoglobinu pod 80 g/l. Konzervativní a zdrženlivý postoj lékařů při indikaci transfúzí je dán znalostí vedlejších nežádoucích účinků transfúzí, které nejsou zanedbatelné a doprovázejí až 20 % všech transfúzí erythrocytů. K nejzávažnějším vedlejším účinkům stále patří přenos závažných virových infekcí, i když je transfúzím věnována náležitá péče. Postoje lékařů k transfúzní praxi byl zkoumán Ludwigem a Pecorellim na konferenci ESMO v Aténách 1998 (33).

Dalším důvodem k určité neochotě podávat transfúze u nemocných se zhoubnými nádory jsou znalosti horších

Tabulka č.3: Předpokládané mechanismy imunosuprese způsobené krevními transfúzemi

Mechanismus
Snížení počtu lymfocytů
Snížení poměru „helper“/„supresor“
Snížení buňkami zprostředkované cytotoxicity
Snížení buněčné funkce „killerů“
Snížení funkce monocytů
Zvýšení produkce prostaglandinů
Zvýšení produkce prostaglandinu E2
Snížení produkce interleukinu 2
Snížení produkce fibronektinu
Zvýšení produkce glukokortikoidů

výsledků přežití u transfundovaných nemocných. Kratší přežití bylo zjištěno u nemocných, kteří byli operováni pro sarkomy, nebo karcinomy prsu, plic, kolorekta, či krčku děložního (4, 11, 20, 32, 35, 56). Kratší přežití je dáváno do souvislosti s imunosupresivním působením cizích proteinů nebo allogenních transfundovaných buněk. Jednoznačně ovšem není vyloučeno, že anemičtí nemocní obecně mají pokročilejší nádorové onemocnění, než ti, jejichž nádorové onemocnění anémií doprovázeno není.

Některé možnosti imunosupresivního působení transfúzí je uvedeno v tabulce č.3 a v přehledné práci (55).

Možnosti ovlivnění anémie (a hypoxie) erythropoetinem v klinické praxi

a) Studie v University of California, Los Angeles (UCLA), Lavey et al. 1993 (29).

Do studie byli zařazeni nemocní se zhoubnými nádory lokalizovanými nad bránicí, kteří byli léčeni pouze radioterapií. Pacienti se vzdálenými metastázami a Hb > 135 g/l nebyli do studie zařazeni. Studie měla dva cíle: 1) určit, zda erythropoetin může věrohodně zvyšovat hladinu Hb během radioterapie a 2) zjistit, zda lze podávání erythropoetinu realizovat v normálním provozu radioterapeutické jednotky. Pacienti byli ozařováni 5x týdně a dostávali tablety sulfátu železa 3 x 325mg denně (po dobu 5 - 8 týdnů). Experimentální skupina pacientů dostávala erythropoetin 300 U/kg s.c., a to 3krát v týdnu před zahájením radioterapie, potom 150 U/kg s.c. 3x týdně po dobu kursu radioterapie, anebo do vzestupu Hb 150 g/l. V každé

skupině bylo 20 pacientů.

Výsledky lze shrnout následovně. Ve skupině nemocných s erythropoetinem došlo k průměrnému vzestupu hladiny Hb z 119 na 151 g/l (+27 %, p < 0,001). 80% pacientů s erythropoetinem dosáhlo během léčby radioterapií hladiny Hb > 140 g/l a 65 % pacientů dosáhlo hladiny Hb > 150 g/l, přičemž průměrně docházelo u všech pacientů během týdne k vzestupu hladiny Hb o 5%. Ve skupině pacientů bez erythropoetinu nedošlo ke změnám hladin Hb. Vedlejší účinky erythropoetinu nebyly vážné, kromě jedné alergické kožní reakce patrně na albuminový protein, který se dříve vyskytoval v komerčně připravovaném erythropoetinu.

b) První randomizovanou studií o vlivu erythropoetinu na hladinu Hb během radioterapie byla studie University of Chicago a University of California, San Francisco, Vijayakumar, S et al. 1993 (54).

Do studie bylo zařazeno 26 pacientů s karcinomy plic, prsu, prostaty a děložního krčku, kteří měli v případě mužů Hb ≤ 130 g/l, v případě žen ≤ Hb 120 g/l. 25 pacientů v kontrolní skupině bylo pouze ozařováno, kromě jednoho pacienta, který měl současně chemoterapii. Pacienti v experimentální skupině dostávali erythropoetin v dávce 200 U/kg každý den od pondělka do pátku a sulfát železa v dávce 325 mg 3x denně p.o. Dávky erythropoetinu byly redukovány na 100 U/kg denně 5dní v týdnu od pondělí do pátku, jestliže se hladina Hb zvýšila u mužů nad 150 g/l a u žen nad 140 g/l. Obě skupiny byly vyváženy z hlediska zastoupení pohlaví pacientů, věku, a úvodních hladin Hb.

V kontrolní skupině nedošlo k žádné významné změně hladiny Hb. Ve skupině nemocných, kteří dostávali erythropoetin a železo, vzrůstala hladina Hb o 4 g/l týdně. Vedlejší účinky erythropoetinu nebyly zaznamenány.

c) Třetí studií hodnotící účinnost erythropoetinu a železa na hladinu Hb v průběhu radioterapie byla provedena na University of Minnesota, Dusenberget al., 1994 (10).

Do studie bylo zařazeno 14 pacientek s pokročilým karcinomem děložního čípku, které měly hladinu Hb < 125g/l. Všechny nemocné měly ozařování celou pánev včetně paraaortálních uzlin do výše prvního lumbálního obrátle, tedy v ozařovaném poli byl dosti značný objem krvevorné kostní dřevě. Tyto pacientky navíc dostávaly během ozařování týdně 20 mg/m² cisplatinu. Pacientky dostávaly 200 U/kg erythropoetinu 5 dní týdně po dobu 2 týdnů a pak stejnou dávku 3 krát týdně. Všechny nemocné rovněž dostávaly suplementaci železem. 5 nemocných, které odmítly erythropoetin, dostávalo pouze železo. 61 nemocných sloužilo jako historická kontrola. Tyto nemocné byly ozařovány stejnou technikou a současně dostávaly cisplatinu ve stejných dávkách jako skupina experimentální.

Studie prokázala týdenní vzestup Hb o 4 - 5 g/l u nemocných, které byly léčeny erythropoetinem a železem. Ve skupinách bez erythropoetinu, i když některé nemocné dostávaly transfúze erythrocytů, docházelo ke statisticky nevýznamnému poklesu Hb. Ve skupině nemocných s erythropoetinem byly zaznamenány 4 případy hluboké trombózy buďto v průběhu léčby, nebo 2 týdny po ukončení léčby.

d) První evropská ukončená studie byla prezentována v květnu 1998 na kongresu ASCO, Glaser et al. (16).

Do experimentální větve studie bylo zařazeno 30 pacientů se spinocelulárními karcinomy ústní dutiny, klasifikovanými T2-4 N0-2, s hladinou Hb < 125g/l. Léčba těchto nemocných sestávala z neoadjuvantní chemoterapie 5-fluorouracilem a mitomycinem C (Mitomycin C 15 mg/m² i.v., den 1 a 5-fluorouracil 750 mg/m² v kontinuální infuzi den 1-5) a ozařováním denní frakcionací (celková dávka 50 Gy , 25 frakcí, den 1 - 33). Pacienti dostávali po dobu radioterapie erythropoetin 150 U/kg s.c. 3x týdně. Jestliže nedošlo ke zvýšení hladiny Hb alespoň o 3 g/l za týden, pak se dávka erythropoetinu zvyšovala na dvojnásobek. V 10. týdnu od zahájení léčby se prováděl operační výkon. Jako kontrolní sloužila historická

skupina 30 pacientů, kteří měli chemo-radioterapii před operací bez erythropoetinu.

Glaserova studie je první, která kromě výsledku léčby anémie hodnotí rovněž výsledky protinádorové léčby právě v návaznosti na léčbu anémie a tedy předpokládané hypoxie v nádoru. Při operaci bylo zjištěno, že 63 % pacientů má patologickou kompletní remisi ve srovnání s 27 % patologických kompletních remisí v historické kontrolní skupině. Tento rozdíl je statisticky významný ($p = 0,002$). Studie rovněž naznačila, že podpora železem není nutná a že nedošlo k významným změnám hladin feritinu i saturace transferinu.

Uvedené studie se týkaly nemocných, kteří měli před zahájením léčby anémií. Další dvě studie měly za cíl zjistit, zda se pomocí erythropoetinu podaří udržet hladina Hb během léčby u nemocných, kteří jsou léčeni chemo-radioterapií.

e) Studie z MDAH v Houstonu, Lee et al., 1998 byla prezentována na kongresu ASCO (31).

16 pacientů s neresekovatelnými nemalobuněčnými bronchogenními karcinomy stadia III bez vzdálených metastáz s Hb > 120 g/l a Karnofského indexem ≥ 70 % a hmotnostní ztrátou v posledních 3 měsících menší než 15 % bylo léčeno radioterapií (1,2 Gy 2x denně do 69,6 Gy během 6 týdnů) a současně s chemoterapií (cisplatin 50 mg/m² ve dnech 1, 8, 29, 36, a etoposid 50 mg/m² 2x denně ve dnech 1-5, 8-12, 29-33 a 36-40). Erythropoetin byl nemocným podáván v dávce 10 000 U s.c. 3x týdně po dobu 12 týdnů. Kontrolní skupinu vyváženou v diagnóze, stádiu, věku a pohlaví tvořilo 16 pacientů léčených stejným způsobem kromě podávání erythropoetinu. První 4 pacienti v experimentální skupině nedostali preparát železa, což se ukázalo jako neúčinné, a proto byl léčebný protokol změněn a pacientům experimentální skupiny byl podáván ještě sulfát železa v dávce 325mg p.o. 3x denně po dobu 12 týdnů.

Ve skupině nemocných s erythropoetinem a sulfátem železa nedošlo během léčby k tak velkému poklesu Hb (předléčebná hladina Hb 132 g/l - nadir 118 g/l) jako ve skupinách nemocných bez erythropoetinu (předléčebná hladina Hb 132 g/l - nadir 95 g/l) nebo u zmíněných 4 nemocných bez podpory železem (předléčebná hladina Hb 132 g/l - nadir 97 g/l). U prvně jmenované skupiny byl pokles Hb pod 10g/l⁻¹ zaznamenán u 8 % pacientů, zatímco u zbývajících dvou skupin to bylo u 56 % a 50 %. Výsledky jsou v obou případech statisticky významné ($p < 0,03$) stejně jako potřeba transfúzí erytrocytů pro skupinu bez léčby erythropoetinem.

V této studii je zajímavý poznatek, že samostatně podávaný erythropoetin nebyl dostatečně účinný a že k němu musela být přidána suplementace železem. To je v rozporu s nálezem Glaserovy skupiny, která dosáhla svých výsledků bez této suplementace.

f) Další studií, v níž byl použit erythropoetin současně s radiochemoterapií, byla práce u University of Chicago, jejíž výsledky publikovali Rosen et al. na kongresu ASCO v roce 1999 (42).

Autoři použili erythropoetin při radiochemiterapii pacientů s pokročilými nádory hlavy a krku. Výsledky zatím nebyly definitivně zhodnoceny.

Až dosud nebyla na lidech prokázána přímo souvislost mezi hladinou Hb a hypoxií. Studie na CH3/sed myších, kterým bylo ozáření ledvin způsobeno jejich chronické selhání a tím současně primární deficiencí erythropoetinu. Podávání exogenního erythropoetinu vedlo k postupnému zvyšování hladiny Hb. Současně se sledováním hladiny Hb bylo prováděno měření oxygenace v nádoru. Byla prokázána silná závislost mezi hematokritem a zlepšující se oxygenací (30). Další otázkou je, jak rychle má být hematokrit zvýšen

v průběhu radioterapie, aby se ovlivnily výsledky léčby nádoru. Erythropoetin nepůsobí zvýšení hematokritu bezprostředně jako transfúze, ale bylo zjištěno, že z hlediska výsledků radioterapie má daleko větší význam hladina hemoglobinu při ukončení radioterapie než při jejím začátku.

Tři multivariátní studie prokázaly, že hladina Hb před zahájením a při zahájení radioterapie nemá tak velký vliv na lokální zvládnutí nádoru jako hodnota při ukončení radioterapie. Hladina Hb během léčby radioterapií měla větší prognostický význam než hladina před jejím zahájením (15), hladina Hb při ukončení kursu radioterapie karcinomu laryngu byla ve statisticky významném vztahu s lokálním zvládnutím nádoru, a to dokonce významnějším než klasifikace T-stádií (48), hladina Hb ve 35. dnu radioterapie karcinomu glotis a supraglotis byla nezávislým prognostickým faktorem s relativním rizikem pro recidivu nemoci 1,94, jestliže je hladina Hb nižší než 135g/l (1).

Závěry pro praxi:

1. Přítomnost hypoxických oblastí v nádorech lidí je charakteristickou patofyziologickou vlastností solidních nádorů.
2. Kyslík však musí být přítomen během ozáření, anebo v době několika milisekund ihned po ozáření.
3. Oxygenace v karcinomu prsu a výskyt hypoxie a anoxie nejsou v žádném vztahu s klinickým stadiem. Dále existují jasné důkazy, že způsob oxygenace nekoreluje s histologickým typem nádoru, menopauzálním stavem, rozsahem nekrózy nebo fibrózy, či s dalšími klinicky závažnými parametry (stav hormonálních receptorů, hladina hemoglobinu, kuřáctví)
4. V nedávné studii byla nalezena korelace mezi hodnotami pO₂, zjištěné hypoxické frakce, stupněm diference a prognostickými faktory
5. Variabilita v oxygenaci různých nádorů je větší než variabilita oxygenace v jednom nádoru.
6. Nádorová hypoxie je považována za jednu z vedoucích multifaktoriálních příčin rezistence nádorů k jejich konvenční léčbě
7. Hladina hemoglobinu je ve statisticky významném vztahu k výsledkům protinádorové léčby.
8. Zdá se, že hladina hemoglobinu na konci léčebné kúry (radioterapie) je významnější než na jejím začátku
9. Anémie u nemocných léčených radioterapií, anebo radiochemoterapií může být korigována erythropoetinem a suplementací železem, anebo samotným erythropoetinem
10. Erythropoetin a suplementace železem jsou účinné v prevenci anémie způsobené radioterapií, anebo radiochemoterapií.
11. Erythropoetin zvyšuje hladinu hemoglobinu a s tím současně oxygenaci v nádoru.
12. Léčba erythropoetinem zlepšila procento i kvalitu odpovědí nádorů na léčbu zářením v experimentálním zvířecím modelu.
13. V klinickém pokusu bylo dosaženo vyššího počtu kompletních remisí při léčbě karcinomů hlavy a krku radiochemoterapií, když s touto léčbou byl současně podáván erythropoetin.

Na korekci anémie podáváním erythropoetinu při současně protinádorové léčbě chemoradioterapií se ukazuje, že podpůrná léčba může mít (a zřejmě ještě v mnoha dalších případech má) významný vliv na výsledky léčby vyjádřené v počtech kompletních a parciálních remisí. Samozřejmě, že je nutno prokázat, zda tyto se výsledky projeví v prodlouženém přežití pacientů. Aby mohly být postupy radioterapie eventuálně radiochemoterapie přijaty v každodenní praxi, bude nutno jejich výsledky prokázat ve standardně provedených randomizovaných studiích. Ale i tak nám dosud dosažené výsledky naznačují jeden z možných směrů vývoje v onkologické léčbě s cílem zlepšení jejich výsledků.

Literatura

1. Acht van MJ, Herman J, Boks DE et al (1992). The prognostic value of hemoglobin and a decrease in hemoglobin during radiotherapy in laryngeal carcinoma. *Radiother Oncol* 23: 229-35.
2. Becker A, Hänsgen G, Bloching M et al (1998). Oxygenation of squamous cell carcinoma of the head and neck: Comparison of primary tumors, neck node metastases, and normal tissue. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 42: 35-9.
3. Becker A, Stadler P, Hänsgen G et al (1998) Hemoglobin level influences the oxygenation status of squamous cell carcinoma of the head and neck (SCCHN). *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 42: 233.
4. Blumberg A, Agarwal MM, Chuang C et al (1985). Relations between recurrence of cancer of the colon and blood transfusions. *Br Med J* 290: 1037-9.
5. Brizel DM, Rosner GL, Prosnitz LR et al (1995). Patterns and variability of tumor oxygenation in human soft tissue sarcomas, cervical carcinomas and lymph node metastases. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 32: 1121-5.
6. Brizel DM, Scully SP, Harrelson JM et al (1996). Tumor oxygenation predicts for the likelihood of distant metastases in human soft tissue sarcoma. *Cancer Res* 56: 941-3.
7. Brizel DM, Sibley GS, Prosnitz LR et al (1997). Tumor hypoxia adversely affects the prognosis of carcinoma of the head and neck. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 38: 285-9.
8. Cartwright GE (1966) The anaemia of chronic disorders. *Semin Hematol* 3: 351-75.
9. Doweiko JP, Goldberg MA (1991). Erythropoietin therapy in cancer patients. *Oncology* 5: 31-7.
10. Dusenberg KE, McGuire WA, Holt PJ et al (1994). Erythropoietin increases hemoglobin during radiation therapy for cervical cancer. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 29: 1079-84.
11. Eisenkop SM, Spiro NM, Montag TW (1990). The clinical significance of blood transfusion at the time of radical hysterectomy. *Obstet Gynecol* 76: 110-3.
12. Falk SJ, Ward R, Bleehan NM (1992). The influence of carbogen breathing on tumor tissue oxygenation in man evaluated by computerized pO₂ histography. *Br J Cancer* 66: 919-24.
13. Falk SJ, Ramsay JR, Ward R et al (1994). BW12C perturbs normal and tumor tissue oxygenation and blood flow in man. *Radiother Oncol* 32: 210-7.
14. Füller J, Feldmann HJ, Molls M et al (1994). Untersuchungen zum Sauerstoffpartialdruck im Tumorwege unter Radio- und Thermoradiotherapie. *Strahlenther Onkol* 170: 453-60.
15. Girinski T, Pejovic-Lenfant MH, Bourhis J et al (1989). Prognostic value of hemoglobin concentrations and blood transfusions in advanced carcinoma of the cervix treated by radiation therapy: Results of retrospective study of 386 patients. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 16: 37-42.
16. Glaser C, Millesi W, Gössweiner S et al (1998). r-HuErythropoietin supply increases efficacy of neoadjuvant chemotherapy in patients with oral squamous cell carcinoma. *Proc ASCO* 17: 387a.
17. Grau C, Overgaard J (1998). Significance of hemoglobin concentration for treatment outcome. In: Molls M, Vaupel P eds. *Blood perfusion and microenvironment of human tumors*. Berlin-Heidelberg-New York: Springer, 101-12.
18. Gray LH, Conger AD, Ebert, M et al (1953). The concentration of oxygen dissolved in tissues at the time of irradiation as a factor in radiotherapy. *Br J Radiol* 26: 638-48.
19. Grischke EM, Kaufmann M, Eberlein-Gonska M et al. (1994) Angiogenesis as a diagnostic factor in primary breast cancer: microvessel quantification by stereological methods and correlation with color Doppler sonography. *Onkologie* 17: 35-42.
20. Henry DH (1992). Changing patterns of care in the management of anemia. *Semin Oncol* 19: Suppl 102-3.
21. Hoeckel M, Schlenger K, Knoop C et al (1991) Oxygenation of carcinomas of the uterine cervix: Evaluation of computerized pO₂ tension measurements. *Cancer Res* 51: 6098-102.
22. Hoeckel M, Schlenger K, Aral B et al (1996). Association between tumor hypoxia and malignant progression in advanced cancer of the uterine cervix. *Cancer Res* 56: 4509-15.
23. Höckel M, Vaupel P (1998) The prognostic significance of hypoxia in cervical cancer: A radiobiological or tumor biological phenomenon? In: Molls M, Vaupel P eds. *Blood perfusion and microenvironment of human tumors*. Berlin-Heidelberg-New York: Springer 63-72.
24. Höckel M, Vorndran B, Schlenger K et al (1993). Tumor oxygenation: a new predictive parameter in locally advanced cancer of uterine cervix. *Gynecol Oncol* 51: 141-9.
25. Hohenberger P, Felgner C, Haensch W et al (1998). Tumor oxygenation correlates with molecular growth determinants in breast cancer. *Breast Cancer Res Treatment* 48: 97-106.
26. Horsman MR, Nordmark M, Overgaard J (1998). Techniques to assess the oxygenation of human tumors. *Strahlenther Onkol* 174: Suppl IV, 2-5.
27. Howard-Flanders P, Moore D (1958). The time interval after pulsed irradiation within which injury in bacteria can be modified by dissolved oxygen. I. A search for an effect of oxygen 0.02 seconds after pulsed irradiation. *Radiat Res* 9: 422-37.
28. Jelkmann W, Fandrey J (1993). Role of inflammatory cytokines in the pathophysiology of erythropoietin response. *Erythropoiesis* 4: 10-5.
29. Lavey RS, Dempsey WH (1993). Erythropoietin increases hemoglobin in cancer patients during radiation therapy. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 27: 1147-52.
30. Lavey RS, McBride WH (1993). Influence of hematocrit on tumor oxygenation and sensitivity to radiation. *Eur J Cancer* 29A(S6): S216.
31. Lee JS, Komaki R, Touroutoglou A et al (1998). Erythropoietin (EPO) prevents anemia during concurrent chemoradiation therapy (RT) for locally-advanced inoperable non-small cell lung cancer. *Proc ASCO* 17: 463a.
32. Little AG, Wu HS, Ferguson MK et al (1990). Perioperative blood transfusion adversely affects prognosis of patients with stage I non-small-cell lung cancer. *Am J Surg* 160: 630-2.
33. Ludwig H, Pecorelli S (2000). Suboptimal hemoglobin levels: Do they impact patients and their therapy? Audience responses. *Semin Oncol* 27: Suppl 4, 18-9.
34. Manegold C (1998) The causes and prognostic significance of low hemoglobin levels in tumor patients. *Strahlenther Onkol* 174: Suppl IV, 17-9.
35. McClinton S, Moffat LEF, Scott S et al (1990). Blood transfusion and survival following surgery for prostatic carcinoma. *Br J Surg* 77: 140-2.
36. Michael BD, Adams GE, Hewitt HB et al. (1973). A post effect of oxygen in irradiated bacteria: a submillisecond fast mixing study. *Radiat Res* 54: 239-51.
37. Miller CB, Jones JR, Piantadosi S et al (1990). Decreased erythropoietin response in patients with the anemia of cancer. *A Engl J Med* 322: 1689-92.
38. Molls M, Stadler P, Becker A et al (1998) Relevance of oxygen in radiation oncology. *Strahlenther Onkol* 174: Suppl IV, 13-6.
39. Molls M, Stadler P, Feldmann HJ (1998). Oxygen-status of human tumors: Significance for radiation oncology. In Kogelnik HD, ed. *Progress in radio-oncology VI*. Bologna: Monduzzi, 525-30.
40. Nordmark M, Overgaard M, Overgaard J (1996). Pretreatment oxygenation predicts radiation response in advanced squamous cell carcinoma of the head and neck. *Radiother Oncol* 41: 31-9.
41. Pagel H, Fandrey J, Jelkmann W (1993) The cytokines IL-1, IL-6 and TNF inhibit the production of erythropoietin. *Molecular biology of hemato-poiesis*, 8th symposium Basel (Switzerland) July 9-13.
42. Rosen FR, Brockstein BE, Haraf D et al (1999). Multicenter randomized phase II study of 1 hour infusion Paclitaxel (T), Fluorouracil (5-FU) and hydroxyurea (HU) with concomitant hyperfractionated (BID) radiotherapy (XRT) with or without erythropoietin (EPO) for advanced oral, pharynx and larynx cancer - an interim analysis. *Proc ASCO* 18: 393a.
43. Runkel S, Wischnik A, Teubner J et al (1994) Oxygenation of mammary tumors as evaluated by ultrasound-guided computerized pO₂ - histography. *Adv Exp Med Biol* 345: 451-8.
44. Srinivasiah J, Jacobs PC, Rozmiarek SK et al (1993). Studies in nonhuman primates on the pathogenesis of rh-IL-6 related anaemia. *Proc ASCO* 12: abstract 348.
45. Stadler P, Becker A, Feldmann HJ (1998). Influence of the hypoxic subvolume on the prognosis of the head and neck cancer. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 42: 147.
46. Steel GG (1993). *The radiobiology of tumours* In: Steel GG ed. *Basic clinical radiobiology*. Edward Arnold Publishers, London-Boston-Melbourne-Auckland 108-19.
47. Tannock IF: The relation between cell proliferation and the vascular system in a transplanted mouse mammary tumour. *Br J Cancer* 1968; 1968: 258-78.
48. Tarnawski R, Skladowski K, Majejewski B (1997). Prognostic value of hemoglobin concentration in radiotherapy for cancer of supraglottic larynx. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 38: 1007-11.
49. Thimlinson RH, Gray LH: The histological structure of some human lung cancers and the possible implication for radiotherapy. *Br J Cancer* 1955; 9: 539-49.
50. Vaupel P, Schlenger K, Knoop C et al (1991). Oxygenation of human tumors: evaluation of tissue oxygen distribution in breast cancers by computerized O₂ tension measurements. *Cancer Res* 51: 3316-22.
51. Vaupel P (1997) Vascularization, blood flow, oxygenation, tissue pH, and bioenergetic status of human breast cancer. *Adv Exp Med Biol* 411: 243-54.
52. Vaupel P, Thews O, Kelleher DK, Hoeckel M (1998). Oxygenation of human tumors: The Mainz experience. *Strahlenther Onkol* 174: Suppl IV, 6-12.
53. Vaupel P, Höckel M (1998). Oxygenation of human tumors. In: Molls M, Vaupel P eds. *Blood perfusion and microenvironment of human tumors*. Berlin-New York: Springer 63-72.
54. Vijayakumar S, Roach M, Wara W et al (1993). Effect of subcutaneous recombinant human erythropoietin in cancer patients receiving radiotherapy: preliminary results of randomized, open-labeled, phase II trial. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 26: 721-9.
55. Vodvážka P (1998). Kritické zhodnocení vlivu léčby anémie transfúzími u onkologicky nemocných léčených radioterapií - jaká alternativa? *Klin Onkol* 11: 2-7.
56. Walker RH (1987). Special report: Transfusion risks. *Am J Clin Pathol* 88: 374-8.
57. Wilson CB, Lamertsma AA, McKenzie CG et al. (1992). Measurements of blood flow and exchanging water space in breast tumors using positron emission tomography: a rapid and noninvasive dynamic method. *Cancer Res* 52: 1592-7.
58. Wright EA, Howard-Flanders P (1957). The influence of oxygen on the radiosensitivity of mammalian tissues. *Acta Radiol* 48: 26-32.