

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



Dizertační práce

Receptor pro epidermální růstový faktor jako prediktor léčebné odpovědi u lokálně pokročilých karcinomů žaludku léčených předoperační chemoradioterapií

Igor Sirák

Doktorský studijní program Klinická onkologie a radioterapie

Hradec Králové

2009

Prohlašuji, že jsem tuto práci sepsal samostatně, pouze s použitím citované literatury.

V Hradci Králové

Dne 5.1.2009

MUDr. Igor Sirák

PODĚKOVÁNÍ

Je pro mne milou povinností upřímně poděkovat všem, kteří mi pomáhali při realizaci mé vědecké práce.

V první řadě nesmírně děkuji Prof. MUDr. Jiřímu Peterovi, Ph.D., který mi záhy po ukončení studia medicíny nabídl možnost pracovat na Klinice onkologie a radioterapie v Hradci Králové a podílet se tak na léčbě nemocných jako i na vědecké činnosti. Profesor Petera mi jako přednosta kliniky a současně jako školitel vytvořil vynikající podmínky k doktorskému studiu a cennými radami přispěl ke vzniku a realizaci mé vědecké práce. Profesor Petera je také duchovním otcem neoadjuvantní chemoradioterapie karcinomu žaludku na Klinice onkologie a radioterapie Fakultní nemocnice v Hradci Králové.

Významným díkem jsem zavázán primáři MUDr. Milanu Vošmikovi, Ph.D., který mne jako erudovaný odborník zasvětil do problematiky léčby nádorů žaludku a do obecných principů radioterapie, a který přivedl techniku radioterapie karcinomu žaludku na našem pracovišti k dokonalosti. Dále děkuji MUDr. Janě Hatlové a Prof. MUDr. Aleši Ryškovi, Ph.D. za nevšední vstřícnost a obětavou spolupráci při vyhodnocování dat z pohledu patologů; Prof. MUDr. Bohuslavu Melicharovi, Ph.D., který stál u zrodu předoperační chemoradioterapie nádorů žaludku na našem pracovišti; Ing. Milanu Zouharovi, vedoucímu fyzikovi, bez kterého by léčba zářením na naší klinice mohla jen stěží probíhat; a v neposlední řadě MUDr. Josefu Dvořákovi, Ph.D. a dalším kolegům lékařům, jakož i všem radiologickým asistentům a sestřám, kteří se na léčbě nemocných podíleli.

Zvláštní poděkování patří mé manželce Lucii, mým rodičům a celé rodině za podporu, trpělivost i čas, který jsem jim nemohl věnovat.

SOUHRN

Cílem mé disertační práce bylo zhodnotit vztah imunohistochemické exprese receptoru pro epidermální růstový faktor (EGFR) v předléčebné biopsii lokálně pokročilých karcinomů žaludku, vzhledem k léčebné odpovědi po neoadjuvantní chemoradioterapii.

Do studie bylo zařazeno 36 pacientů s histologicky ověřeným adenokarcinomem žaludku v klinickém stadiu T2-4 a/nebo s postižením lymfatických uzlin. Předoperační léčba se skládala z aplikace 30-45 Gy zevní radioterapie s konkomitantní chemoterapií - kontinuálně 5-fluorouracil a týdenní aplikace cisplatiny. Chirurgická léčba následovala s odstupem 4-6 týdnů po chemoradioterapii. Imunohistochemická exprese EGFR v předléčebné biopsii byla stanovena semikvantitativně na základě stanovení rozsahu a intenzity barvení nádorových buněk. Pozitivní léčebná odpověď k chemoradioterapii byla definována jako redukce T-stadia nádoru alespoň o jeden stupeň, a/nebo nález intenzivních regresivních změn nádorové tkáně během mikroskopického hodnocení.

Sedmnáct pacientů (47%) mělo pozitivní odpověď k chemoradioterapii: u osmi pacientů (22%) bylo dosaženo patologické kompletní remise a u devíti pacientů (25%) bylo pozorováno snížení rozsahu (downstaging) tumoru. Vysoká exprese EGFR byla nalezena v 8 biopsiích (22%) a multivariantní logistickou regresní analýzou byl prokázán její signifikantně negativní prediktivní vliv na celkovou léčebnou odpověď ($p = 0.015$). Pozitivní léčebná odpověď byla prokázána u 57% (16/28) pacientů s nízkou expresí EGFR a u 13% (1/8) pacientů s vysokou expresí EGFR ($p = 0.044$). U žádného pacienta s vysokou expresí EGFR nebyla nalezena patologická kompletní remise, ve srovnání s 8/28 (29%) pacientů s nízkou expresí EGFR ($p = 0.16$).

Výsledky naznačují, že exprese EGFR může být užitečným molekulárním prediktorem špatné léčebné odpovědi u lokálně pokročilých adenokarcinomů žaludku léčených předoperační chemoradioterapií.

SUMMARY

The purpose of my doctoral thesis was a retrospective evaluation whether the intensity of epidermal growth factor receptor (EGFR) expression in tumor biopsy predicts tumor response to preoperative chemoradiotherapy in patients with locally advanced gastric carcinoma.

Thirty-six patients with gastric adenocarcinoma in clinical T2-4 stage and/or with nodal metastases were studied. Preoperative treatment consisted of 30-45 Gy of gastric irradiation with continuous 5-fluorouracil and weekly cisplatin. Surgical resection was performed 4-6 weeks later. EGFR expression in pretreatment tumor biopsies was assessed by immunohistochemistry. Level of EGFR expression was determined from the intensity and extent of staining. Tumor response after chemoradiotherapy was defined as a reduction of at least one T-stage level and/or finding of intense tumor regression in histopathologic examination.

Seventeen patients responded to preoperative chemoradiation - 8 patients (22%) had pathologic complete response, 9 patients (25%) were downstaged. Positive EGFR expression was found in 8 tumors (22%), and represented a significant predictive marker of poor tumor response in multivariate logistic regression analysis ($p = 0.015$). Response to chemoradiotherapy was found in 57% (16/28) of EGFR negative patients and in 13% (1/8) of EGFR positive patients ($p = 0.044$). None of the eight EGFR positive patients achieved pathologic complete response in comparison with 8/28 (29%) of patients with EGFR negative staining ($p = 0.16$).

The results suggest that EGFR expression may represent a molecular marker predictive for poor response to preoperative chemoradiotherapy in locally advanced gastric carcinoma.

SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK

- EGFR – epidermal growth factor receptor (receptor pro epidermální růstový faktor)
- GTV – gross tumor volume (makroskopický nádorový objem)
- CTV – clinical target volume (klinický cílový objem)
- PTV – planning target volume (plánovací cílový objem)
- MLC – multi-leaf collimator (vícelamelový kolimátor)
- IORT – intraoperative radiation therapy (intraoperační radioterapie)
- IMRT – intensity modulated radiation therapy (radioterapie s modulovanou intenzitou)
- IGRT – image guided radiation therapy (obrazem naváděna radioterapie)
- ICRU – International Commission on Radiation Units and Measurements
- UICC – International Union Against Cancer
- NCCN – National Comprehensive Cancer Network
- FDA – National Comprehensive Cancer Network
- SWOG – Southwest Oncology Group
- DAHANCA – Danish Head and Neck Cancer Study Group
- WHO – World Health Organization (Světová zdravotnická organizace)
- CT – computed tomography (počítačová tomografie)
- PET – positron emission tomography (pozitronová emisní tomografie)
- EUS – endoscopic ultrasound (endosonografické vyšetření)
- CEA – carcinoembryonic antigen (karcinoembryonální antigen)
- IHC – immunohistochemistry (imunohistochemie)
- ELISA – enzyme-linked immunosorbent assay (enzymem-vázaná imunosorbční reakce)
- FACS – fluorescence-activated cell sorting (metoda fluorescenční průtokové cytometrie)
- PCR – polymerase chain reaction (polymerázová řetězová reakce)
- RT-PCR – reverse transcriptase polymerase chain reaction (metoda PCR)
- FISH – fluorescence in situ hybridisation (fluorescenční in situ hybridizace)
- IRS – immunoreactive score (imunoreaktivní skórovací systém)
- pCR – pathologic complete response (patologická kompletní remise)
- DNA – deoxyribonucleic acid (deoxyribonukleová kyselina)
- RNA – ribonucleic acid (ribonukleová kyselina)
- VEGF – vascular endothelial growth factor (vaskulární entoteliální růstový faktor)
- EGF – epidermal growth factor (epidermální růstový faktor)
- HB-EGF – heparin-binding EGF-like growth factor (heparin vázající faktor podobný EGF)

TGF α – transforming growth factor alpha (transformující růstový faktor alfa)
FGF – fibroblast growth factor (fibroblastový růstový faktor)
CDK – cyclin dependent kinase (cyklin dependentní kináza)
MAPK – mitogen-activated protein kinase (mitogenně aktivovaná proteinkináza)
PI3K/AKT – phosphatidylinositol-3-kinase/Akt (signální cesta)
JAK/STAT – Janus kinase/signal transduction and activator of transcription (signální cesta)
PLC γ /PKC – phospholipase C gama/protein kinase C (signální cesta)
HRP – horseradisch peroxidase (křenová peroxidáza)
KRAS – Kirsten rat sarcoma viral oncogene homolog
NSCLC – non-small-cell lung cancer (nemalobuněčný karcinom plic)
CRC – colorectal carcinoma (kolorektální karcinom)
TKI – tyrosin kinase inhibitor (inhibitor tyrozinkinázy)
OR – odds ratio (poměr šancí)
CI – confidence interval (interval spolehlivosti)

OBSAH

1. Obecný úvod	str.8
2. Cíle disertační práce	str.10
3. Literární přehled	str.11
3.1. Karcinom žaludku.....	str.11
3.1.1. Obecné informace.....	str.11
3.1.2. Strategie léčby lokálně pokročilých karcinomů žaludku.....	str.17
3.1.2.1. Chirurgická léčba.....	str.17
3.1.2.2. Adjuvantní onkologická léčba.....	str.18
3.1.2.3. Neoadjuvantní onkologická léčba.....	str.22
3.2. EGFR a jeho úloha v radioterapii.....	str.24
3.2.1. Obecný úvod.....	str.24
3.2.2. Nádorová exprese EGFR.....	str.27
3.2.3. Laboratorní stanovení EGFR.....	str.29
3.2.4. Mutace EGFR.....	str.34
3.2.5. Prognostická a prediktivní hodnota EGFR.....	str.35
3.2.6. EGFR a radioterapie.....	str.37
3.2.7. Možnosti inhibice EGFR.....	str.42
3.2.8. Inhibice EGFR v radioterapii.....	str.46
3.2.9. Radioterapie a proteiny p53, p21 a p16.....	str.51
4. Soubor pacientů a použítá metodika	str.53
4.1. Soubor pacientů.....	str.53
4.2. Léčba.....	str.54
4.3. Hodnocení léčebné odpovědi.....	str.60
4.4. Laboratorní stanovení EGFR.....	str.60
4.5. Hodnocení imunohistochemické exprese EGFR.....	str.61
4.6. Statistická analýza.....	str.63
5. Výsledky	str.64
6. Význam exprese proteinů p53, p21 a p16	str.66
7. Diskuse	str.69
8. Závěry	str.75
9. Seznam použité literatury	str.76

1. OBECNÝ ÚVOD

Karcinom žaludku je obvykle diagnostikován v již pokročilém stadiu, kdy je přítomno prorůstání nádoru skrze celou stěnu žaludku event. do přilehlých orgánů, nebo již došlo k rozšíření nádoru do spádových lymfatických uzlin. Chirurgická resekce s čistými resekčními okraji (R0) je doposud jedinou akceptovatelnou radikální léčbou a je považována za zlatý standard léčby tohoto onemocnění. U většiny případů lokálně pokročilých karcinomů žaludku však nelze radikální resekci provést vzhledem k lokálnímu rozsahu onemocnění. Navíc prognóza nemocných i po radikální resekci zůstává nadále špatná, s celkovým 5-ti letým přežitím přibližně 50% u stadia T2, 45% u stadia T3 a pouze 15% u stadia T4. Přežití dále klesá v případě nálezu metastáz v regionálních mízních uzlinách a to: celkové 5-ti leté přežití přibližně na 20% u stadia N1 a 10% u stadia N2 (Kennedy 1970; Hartley et al. 1987).

Hlavní příčinou špatné prognózy nemocných s lokálně pokročilým karcinomem žaludku po radikální resekci je lokální recidiva základního onemocnění, kterou lze klinicky prokázat přibližně u poloviny pacientů a při pitvě až u 52-68% zemřelých (Gunderson et al. 1982; Gunderson 2002). Špatné výsledky samostatné chirurgické léčby vedou ke zvyšujícímu se zájmu o předoperační chemoradioterapii. Jejím cílem je dosáhnout zmenšení celkové nádorové masy a usnadnění následné chirurgické resekce; snížení incidence irresekalibilních nádorů; zvýšení procenta radikálních R0 resekcí; a snížení rizika lokální rekurence onemocnění po radikální operaci. Slibné výsledky předoperační chemoradioterapie již byly publikovány několika autory z různých onkologických center (Ajani et al. 2004; Ajani et al. 2005; Patel et al. 2007; Rohatgi et al. 2006; Ajani et al. 2006; Wydmanski et al. 2007; Zhang et al. 1998; Klautke et al. 2004; Allal et al. 2005; Roth et al. 2003; Petera et al. 2002; Fujitani et al. 2007). Počet celkových léčebných odpovědí po chemoradioterapii se v těchto studiích pohybuje v rozmezí 35-74% s procentem patologických kompletních remisí 11-30%. Výsledky studií tedy naznačují, že ne u všech nemocných dosáhneme předoperační

chemoradioterapií výše zmíněných záměrů. Lze tedy odhadnout, že asi 1/4 až 2/3 léčených pacientů nemá z časově náročné a toxické předoperační léčby prokazatelný prospěch.

Identifikace faktorů předpovídajících léčebnou odpověď k předoperační chemoradioterapii u lokálně pokročilých karcinomů žaludku se tedy zdá být nezbytná při výběru pacientů indikovaných k předoperační chemoradioterapii a těch, u kterých by z důvodu nádorové rezistence předoperační léčba vedla pouze k zbytečnému oddálení operace.

Receptor pro epidermální růstový faktor byl v několika studiích na jiných typech nádorů popsán jako silný negativní prediktor léčebné odpovědi k předoperační radioterapii. Proto jsem si jej také zvolil za hlavní cíl svého zkoumání u dosud málo probádané předoperační chemoradioterapie karcinomu žaludku. Současně jsem na stejném souboru pacientů zkoumal prediktivní vliv nukleární exprese proteinů p53, p21 a p16, jejichž úloha v predikci léčebné odpovědi k předoperační (chemo)radioterapii byla popsána u karcinomu rekta.

2. CÍLE DISERTAČNÍ PRÁCE

Hlavním cílem disertační práce bylo zhodnotit vliv imunohistochemické exprese receptoru pro epidermální růstový faktor v předléčebné biopsii lokálně pokročilých karcinomů žaludku na léčebnou odpověď k neoadjuvantní chemoradioterapii a zvážit možnosti implementace tohoto vlivu do klinické praxe.

Vedlejším cílem disertační práce bylo zhodnotit na stejném souboru pacientů prediktivní vliv imunohistochemické exprese dalších potenciálních molekulárních prediktorů léčebné odpovědi, konkrétně proteinů p53, p21 a p16.

3. LITERÁRNÍ PŘEHLED

KARCINOM ŽALUDKU

3.1.1. Obecné informace

Epidemiologie

Oproti karcinomům konečnicku a tlustého střeva, incidence karcinomu žaludku ve vyspělých zemích Evropy u obou pohlaví trvale klesá. Příčina klesající incidence není doposud zcela objasněna (Howson et al. 1986; Silverberg et al. 1990). V rámci lokalizace nádorů je v posledních dvaceti letech popisován vzestup podílu karcinomů proximálního žaludku a gastroezofageální junkce.

Karcinomy žaludku v naší zemi představují přibližně 2% všech zhoubných nádorů, zatímco jejich podíl na úmrtnosti mezi všemi malignitami je o něco vyšší, tj. přibližně 4-5%. Celosvětové incidenci karcinomu žaludku suverénně vévodí Japonsko s 55,4 novými případy na 100 000 obyvatel ročně (GLOBOCAN 2002). České republice v celosvětovém řebříčku incidence patřilo v roce 2002 celkově 36. místo u mužů a 30. místo u žen.

Podle údajů z Národního onkologického registru Ústavu zdravotnických informací a statistiky České republiky byla celková incidence karcinomu žaludku v České republice v roce 2005 15,5 případů na 100 000 obyvatel; celková mortalita na tento typ nádoru ve stejném roce činila 11,9 případů na 100 000 obyvatel. V roce 2005 bylo v České republice hlášeno celkem 1585 nových případů karcinomu žaludku, z toho 919 u mužů (incidence 18,4/100 000 obyvatel) a 666 u žen (incidence 12,7/100 000 obyvatel). Incidence karcinomu žaludku v České republice byla v roce 2005 mírně vyšší než činil evropský standard (17,2/100 000 obyvatel u mužů; 8,8/100 000 obyvatel u žen). Muži v České republice onemocní karcinomem žaludku asi 1,4 krát častěji než ženy. Meziroční změna incidence karcinomu žaludku v České republice byla v roce 2005 o 7,6% nižší než v roce předchozím, což činí

v absolutních číslech o 131 případů méně než v roce 2004. V roce 2005 zemřelo v České republice na karcinom žaludku celkem 1296 obyvatel z toho 755 mužů (mortalita 15,1/100 000 obyvatel) a 541 žen (mortalita 10,3/100 000 obyvatel). Mortalita na karcinom žaludku v České republice byla v roce 2005 opět mírně vyšší než evropský standard (14,4/100 000 obyvatel u mužů; 7,0/100 000 obyvatel u žen). Nejvyšší incidence i mortalita byla v České republice v roce 2005 zaznamenána ve věkové skupině 70-79 let, u mužů v o něco nižším věku než u žen (www.svod.cz, www.uzis.cz).

Etiologie

Rizikovými faktory pro vznik karcinomu žaludku jsou obezita, zvýšený kalorický příjem, nitrosaminy v potravě a vodě, strava chudá na vlákninu, nedostatečný příjem vitamínu A a C, kouření, vyšší věk, chronická atrofická gastritida, achlorhydrie, změny sliznice při perniciózní anémii, infekce Helikobakterem pylori a virem Epstein-Barrové. Náchylnější ke vzniku této choroby jsou lidé s krevní skupinou A. Karcinom žaludku vzniká častěji v anastomóze po parciální gastrektomii pro vředovou chorobu ("pahýlový karcinom"). Naopak při vzniku karcinomu žaludku nebyl prokázán rizikový vliv alkoholu ani ionizujícího záření.

Histopatologie

Nejčastějším histologickým typem zhoubných nádorů žaludku je adenokarcinom (přibližně 90-95%). Druhým nejčastějším maligním onemocněním je primární nehodgkinský lymfom žaludku; méně často se v žaludku vyskytuje gastrointestinální stromální tumor, leiomyosarkom (2%), dlaždicobuněčný karcinom (1%), adenoakantom (1%), karcinoid (1%) a malobuněčný karcinom. Jen velmi vzácně bývá žaludek postižen metastázou z jiného primárního ložiska.

Šíření nádoru

Karcinom žaludku se může šířit přímým prorůstáním do omenta, slinivky, jater, bránice, příčného tračníku a jeho závěsu, duodena, sleziny. K šíření po peritoneální dutině může dojít poté, co nádor prorostl skrze celou stěnu žaludku a jeho peritoneální kryt. K mikroskopickému subklinickému šíření mimo hlavní lézi může docházet proximálním i distálním směrem díky bohatému systému lymfatických cest v submukóze a subseróze žaludeční stěny. Díky bohaté lymfatické drenáži žaludku existuje mnoho cest možného šíření nádorových buněk do regionálních mízních uzlin. Z nejčastějších bývají postiženy uzliny v oblasti malé a velké křivatury žaludku (např. gastrické a gastroepiploické uzliny); často bývá postižen systém uzlin kolem truncus coeliacus a jeho větví (např. uzliny kolem porta hepatis a hilu sleziny, uzliny suprapankreatické a pankreatikoduodenální); taktéž přilehlé paraaortální a distální paraesofageální uzliny mohou být metastaticky postiženy. Žilní drenáž žaludku jde primárně cestou portální žíly do jater, která bývají metastaticky postižena až u 30% nově diagnostikovaných karcinomů.

Stanovení diagnózy a vstupní vyšetření

Diagnóza karcinomu žaludku se obvykle stanovuje gastrokopicky s vícenásobnou endoskopickou biopsií a následným histologickým vyšetřením, méně často je karcinom zjištěn peroperačně u pacientů s pokročilým nádorovým onemocněním a symptomatikou obstrukce horní trávicí trubice. Vstupní vyšetření při nově diagnostikovaném karcinomu žaludku zahrnuje anamnézu, fyzikální vyšetření, laboratorní vyšetření hematologické, biochemické a stanovení CEA; dále rentgen žaludku s baryovou kontrastní látkou, rentgen plic, CT břicha a CT nebo UZ pánve (zejména u žen k vyloučení Krukenbergerova tumoru ovaria).

Endosonografie (EUS) může lépe zobrazit perigastrické uzliny, hloubku invaze nádoru a jeho případnou invazi do perigastrických orgánů při pochybnostech o operabilitě. Laparoskopie s peritoneální laváží se provádí v případě suspektní diseminace po peritoneu, nebo v případě hraniční operability před rozhodnutím mezi radikální resekcí a paliativní léčbou. Chirurgický staging má nejpřesnější výtěžnost, včetně možnosti odběru regionálních mízních uzlin k histologickému vyšetření.

Prognostické faktory

Nejvýznamnějším prognostickým faktorem pro přežití nemocných s karcinomem žaludku je rozsah vlastního onemocnění. Frekvence přežití klesá s velikostí primárního tumoru, stejně jako s rozsahem šíření cestou lymfatických uzlin (Hartley et al. 1987). Pokud jsou přítomny vzdálené metastázy, nebo šíření nádoru přes peritoneální kryt žaludku, je následek onemocnění prakticky vždy fatální. Horší prognózu mají nádory lokalizované v kardinii žaludku; extrémně špatnou prognózu mají difúzní formy karcinomu prorůstající celou svalovinou žaludku (tzv. linitus plastica).

TNM klasifikace

Stanovení stupně rozsahu karcinomu žaludku, podobně jako u ostatních solidních malignit, vychází z UICC (International Union Against Cancer) TNM klasifikace zhoubných novotvarů, jejíž aktuální šesté vydání z roku 2002 (česká verze z roku 2004) klasifikuje stadia tohoto onemocnění následujícím způsobem.

T – primární nádor

TX primární nádor nelze hodnotit

T0 bez známek primárního nádoru

Tis karcinom in situ: intraepiteliální nádor bez invaze do lamina propria

T1 nádor postihuje lamina propria nebo submukózu

T2 nádor postihuje muscularis propria nebo subserosu

T2a nádor postihuje muscularis propria

T2b nádor postihuje subserosu

T3 nádor se šíří na serózu (viscerální peritoneum) bez invaze do okolních struktur

T4 nádor se šíří do okolních struktur

Pozn.: Nádor se může šířit přes muscularis propria do vazů gastrokolických nebo gastrohepatických nebo do velkého či malého omenta bez penetrace viscerálního peritonea, které kryje tyto struktury. V tomto případě je nádor klasifikován jako T2. Pokud nastane perforace viscerálního peritonea kryjícího gastrické vazy nebo omentum (malé i velké), pak je nádor klasifikován jako T3. Okolními strukturami žaludku jsou slezina, příčný tračník, játra, bránice, pankreas, stěna břišní, nadledvina, ledvina, tenké střevo a retroperitoneum. Intramurální šíření do duodena a jícnu je klasifikováno největší hloubkou invaze v kterékoliv této lokalizaci včetně žaludku.

Regionálními mízními uzlinami žaludku jsou uzliny perigastrické podél malého a velkého zakřivení žaludku, dále uzliny podél aa. gastrica sinistra, hepatica communis, lienalis, truncus coeliacus a uzliny hepatoduodenální. Regionálními mízními uzlinami gastroezofageální junkce jsou uzliny parakardiální, uzliny podél a. gastrica sin., coeliacké, diafragmatické a dolní mediastinální paraezofageální. Postižení ostatních nitrobřišních mízních uzlin, jako jsou retropankreatické, mezenterické a paraaortální se klasifikuje jako metastázy vzdálené.

N – regionální mízní uzliny

NX regionální uzliny nelze hodnotit

N0 v regionálních uzlinách nejsou metastázy

N1 metastázy v 1 až 6 regionálních mízních uzlinách

N2 metastázy v 7 až 15 regionálních mízních uzlinách

N3 metastázy ve více než 15 regionálních mízních uzlinách

Pozn.: Histologické vyšetření vzorků z regionální lymfadenektomie má standardně zahrnovat 15 a více mízních uzlin. Jsou-li mízní uzliny negativní, ale nebylo dosaženo standardně vyšetřovaného počtu, klasifikuje se jako pN0.

M - vzdálené metastázy

MX vzdálené metastázy nelze hodnotit

M0 nejsou vzdálené metastázy

M1 vzdálené metastázy

Kategorie pT, pN a pM odpovídají kategoriím T, N a M.

ROZDĚLENÍ DO STADIÍ

0:	Tis	N0	M0	IIIA:	T2a/b	N2	M0
IA:	T1	N0	M0		T3	N1	M0
IB:	T1	N1	M0		T4	N0	M0
	T2a/b	N0	M0	IIIB:	T3	N2	M0
II:	T1	N2	M0	IV:	T4	N1-3	M0
	T3	N0	M0		T1-3	N3	M0
	T2a/b	N1	M0		jakékoliv T	jakékoliv N	M1

3.1.2. Strategie léčby lokálně pokročilých karcinomů žaludku

Dlouhodobé výsledky léčby adenokarcinomu žaludku nejsou příznivé. Přes klesající incidenci onemocnění i v našem státě zůstává karcinom žaludku na předních místech v příčinách úmrtí na nádorová onemocnění. Jedinou doposud akceptovanou kurativní léčbou karcinomu žaludku je radikální chirurgická resekce. V době stanovení diagnózy onemocnění je léčebný chirurgický zákrok technicky možný pouze u 50-60% lokalizovaných nádorů. Nicméně pouze u 25-40% těchto pacientů je chirurgický zákrok potenciálně kurativní. U více než 50% pacientů s lokalizovaným onemocněním tedy nelze provést kurativní resekci, tj. širokou resekci primárního nádoru s doporučenou vzdáleností resekční linie 5 cm od longitudinálních hranic tumoru. Navíc jenom malá část nemocných po radikální operaci přežívá 5 let. Proto musí být chirurgická léčba obvykle doplněna léčbou onkologickou.

3.1.2.1. Chirurgická léčba

Doposud žádná prospektivní randomizovaná studie nestanovila optimální chirurgickou strategii léčby karcinomu žaludku (Kern 1989). Obecně preferovaným chirurgickým zákrokem u karcinomu těla a antra žaludku je subtotální gastrektomie, při které je odstraněno přibližně 80% žaludku společně s gastrohepatickým a gastrokolickým ligamentem, přilehlými lymfatickými uzlinami a proximální částí duodena. Rozsáhlejší nebo proximálněji uložené karcinomy obvykle vyžadují chirurgický zákrok v rozsahu totální gastrektomie. U nádorů gastroezofageální junkce a kardie žaludku přichází v úvahu proximální resekce žaludku. Vzhledem k tendenci nádoru šířit se cestou submukozních lymfatických pletení, je od chirurga vyžadováno resekovat porci nádoru společně s 5 cm makroskopicky zdravými okraji proximálním i distálním směrem. Pro zachování adekvátních okrajů je tedy někdy nevyhnutné

resekovat současně část přiléhajícího jícnu či duodena. Některými autory je obhajována metoda stanovení adekvátnosti resekčních okrajů rychlými peroperačními zmraženými řezy (Douglass et al. 1985). Výsledky několika retrospektivních studií totiž prokázaly patologicky pozitivní longitudinální okraje až u 25% provedených “kurativních” resekcí (Allum et al. 1989; Siewert et al. 1987; Whittington et al. 1990).

Kontroverzní otázkou zůstává také rozsah lymfadenektomie, která by měla radikální operaci karcinomu žaludku doprovázet. Lymfadenektomie etáže D1, která znamená odstranění perigastrických lymfatických uzlin, je standardním postupem u většiny nemocných. Rozšíření lymfadenektomie o etáž D2 znamená navíc odstranění uzlin kolem truncus coeliacus, splenické tepny a hilu sleziny. Podle dostupných výsledků randomizovaných studií není jednoznačně prokázáný přínos rozšířené lymfadenektomie na přežití nemocných nebo snížení rizika lokoregionální recidivy onemocnění (Bonenkamp et al. 1999; Cuschieri et al. 1999). Oproti tomu jsou rozšířené výkony doprovázeny prokazatelně vyšší mortalitou a morbiditou (Bonenkamp et al. 1995).

Nekurativní gastrektomie může být indikována tam, kde může operační zákrok přinést úspěšný debulking nádoru, navzdory nemožnosti odstranění celého makroskopického onemocnění. Takovýto výkon by měl být doplněn o označení reziduálních tumorových hmot kontrastními klipy, které napomáhají přesnějšímu zacílení pooperační radioterapie.

3.1.2.2. Adjuvantní onkologická léčba

Chemoterapie

Schémata cytostatické adjuvantní léčby jsou založena na kombinaci 5-fluorouracilu s leukovorinem, ev. dalšími cytostatiky (epirubicin, cisplatina, etoposid, taxany, aj.). Jednoznačný přínos adjuvantní chemoterapie na přežití nemocných však nebyl dosud

prokázán. V metaanalýze 20 studií na celkovém počtu 3658 pacientů byl hodnocen význam adjuvantní chemoterapie po kurativní resekci karcinomu žaludku ve srovnání se samostatnou chirurgickou léčbou. Podle výsledků této metaanalýzy je přínos adjuvantní chemoterapie pro zlepšení přežití zanedbatelný; adjuvantní chemoterapie však může snížit riziko smrti u některých nemocných až o 18% (Mari et al. 2000). Výsledky jiné metaanalýzy 14 klinických studií na celkovém počtu 4573 pacientů naznačují pozitivní vliv adjuvantní chemoterapie i na délku přežití nemocných, avšak v závěru autoři nedocházejí k jednoznačnému doporučení a doporučují provedení dalších randomizovaných, dvojitě slepých, placebem kontrolovaných studií (Hu et al. 2002). Jedna taková studie následně prokázala pouze mírné (13%) zlepšení 5-letého celkového přežití po přidání adjuvantní systémové chemoterapie (Cunningham et al. 2006).

Radioterapie

Rovněž nebyl u karcinomu žaludku prokázán vliv na celkové přežití ani u samostatně aplikované adjuvantní radioterapie. U nemocných, u kterých není indikována konkomitantní chemoradioterapie, však může oddálit vznik lokální recidivy nádoru s ní spojených symptomů.

Chemoradioterapie

Kombinovaná chemoradioterapie má oproti samostatné radioterapii či chemoterapii řadu teoretických výhod. Je při ní dosaženo synergního účinku v ozářeném objemu a chemoterapie má navíc šanci postihnout mikrometastázy i v oblastech mimo cílový objem radioterapie. Význam adjuvantní onkologické léčby po radikální R0 resekci byl výrazně posunut kupředu s publikací americké prospektivní randomizované studie Intergroup 0166 - SWOG 9008

(MacDonald et al. 2001). V této studii bylo prokázáno signifikantní zlepšení mediánu celkového přežití nemocných s lokálně pokročilým karcinomem žaludku nebo gastroezofageální junkyce po radikální chirurgické resekci, léčených pooperační kombinovanou chemoradioterapií (36 měsíců) ve srovnání s mediánem doby přežití nemocných léčených pouze chirurgickou léčbou (27 měsíců). Adjuvantní chemoradioterapie v této studii spočívala v aplikaci 45 Gy zevní radioterapie na operovanou oblast, s konkomitantní aplikací pěti cyklů chemoterapie 5-fluorouracil/leukovorin v Mayo režimu. Adjuvantní konkomitantní chemoradioterapie přinesla prodloužení přežití zejména u „high risk“ pokročilých karcinomů s přítomností rizikových faktorů, jako je prorůstání nádoru skrze celou stěnu žaludku, přítomnost uzlinového postižení, nebo přítomnost nádoru v blízkosti okrajů resekátu. Podle aktuálních NCCN (National Comprehensive Cancer Network) Guidelines (verze 2.2009) již platí rozšířená indikace adjuvantní chemoradioterapie pro všechny tumory patologického stadia pT2-4 pN0 a pro všechny pT stadia při průkazu pozitivních uzlin (pN+) po kurativní (R0) resekci za současné absence vzdálených metastáz (M0); dále je adjuvantní chemoradioterapie doporučována také jako léčebná metoda první volby pro všechny subradikální resekce s nálezem mikroskopicky (R1), nebo makroskopicky (R2) pozitivních resekčních okrajů, opět za předpokladu absence vzdálených metastáz (www.nccn.org). Adjuvantní kombinovaná chemoradioterapie se tak stala standardní metodou léčby pro většinu operovaných nemocných.

Při indikaci adjuvantní chemoradioterapie je nutná spolupráce s chirurgy a patology. Pro plánování adjuvantní radioterapie je vhodné označení anastomózy a operačního pole chirurgickými svorkami, vhodné je odebrání a vyšetření dostatečného počtu břišních uzlin (alespoň 15 regionálních lymfatických uzlin). Adjuvantní radioterapie musí být cílena na místa s nejvyšším rizikem rekurence onemocnění, tj. na chirurgickou anastomózu, operační pole a spádovou lymfatickou oblast. Při patologicky prokázaném postižení lymfatických uzlin metastázami a/nebo při inadekvátním chirurgickém uzlinovém stagingu musí oblast cílového

objemu adjuvantní radioterapie zahrnovat spádové lymfatické uzliny vždy. Na samostatné adjuvantní ozáření lůžka tumoru může být pomýšleno pouze u negativního patologického stadiu adekvátně chirurgicky disekované spádové lymfatické oblasti (tj. 15 a více negativních vyšetřených uzlin).

Radioterapie dvěma individuálně tvarovanými protilehlými poli (předozadní AP/zadopřední PA) obvykle postačí k zahrnutí celého cílového objemu lůžka tumoru a spádové lymfatické oblasti. Technika více polí může přinést další žádané snížení dávky a toxicity na okolní zdravé tkáně, zejména pak na tenké střevo (Henning et al. 2000). Přetížení předního pole u AP/PA techniky nám umožní dosáhnout snížení dávky na oblast míchy, čehož lze s výhodou využít zejména při radioterapii nádorů v oblasti gastroezofageálního přechodu a kardié žaludku, kde se cílový objem nachází v těsné blízkosti páteře. Stejného snížení dávky na míchu můžeme dosáhnout použitím techniky tří nebo čtyř tvarovaných polí za současného zvýšení homogenity ozáření cílového objemu, zde ale musíme počítat s mírným navýšením dávky na játra a ledviny.

Dostatečná ochrana ledvin před ionizujícím zářením je nezbytnou součástí radioterapie v oblasti epigastria. Podmínkou je, aby minimálně 2/3 jedné plně funkční ledviny dostaly maximální dávku 20 Gy. Při ozařování nádorů proximálních partií žaludku může cílový objem zaujímat až 50% levé ledviny, s nutností stínit co největší část pravé ledviny; u nádorů uložených v distálních partiích žaludku je situace obrácená. Před zahájením samotné radioterapie je vhodné doplnit morfologické vyšetření urogenitálního systému o dynamickou scintigrafii ledvin, k posouzení jejich skutečné exkreční funkce. Při použití těchto postupů se s pozdními funkčními následky poškození ledvin prakticky nesetkáme (Willett et al. 1986).

Intraoperační radioterapie (IORT)

Aletrnativní metodou k adjuvantní radioterapii karcinomu žaludku je intraoperační radioterapie, při které se záhy po resekci nádoru aplikuje 10-35 Gy zavní radioterapie přímo do operačního pole. Tato léčba je poměrně náročná na technické vybavení pracoviště, současně vyžaduje úzkou spolupráci chirurgů a radioterapeutů, může však přinést značné zkrácení celkové doby léčby za současného snížení toxických reakcí zdravých tkání oproti adjuvantní zevní radioterpii. Japonská randomizovaná studie prokázala zlepšení přežití u kombinace chirurgická resekce plus IORT, oproti chirurgické resekci samotné (Abe et al. 1988). Avšak v přímém srovnání IORT s konvenční adjuvantní radioterapií nebylo prokázáno žádné signifikantní prodloužení přežití navzdory tomu, že frekvence lokoregionálních relapsů onemocnění byla ve skupině s 20 Gy IORT signifikantně nižší než u adjuvantní radioterapie 50 Gy (Sindelar et al. 1993). Přímé srovnání IORT a adjuvantní kombinované chemoradioterapie není zatím k dispozici, také proto zůstává IORT u karcinomu žaludku nadále metodou experimentální.

3.1.2.3. Neoadjuvantní onkologická léčba

Cílem předoperační onkologické léčby je zejména dosáhnout zmenšení celkové nádorové masy a usnadnění následné chirurgické resekce lokálně pokročilých onemocnění; dále pak snížení frekvence irresekalibilních nádorů; zvýšení procenta radikálních R0 resekcí; a snížení rizika lokální rekurence onemocnění po radikální operaci.

Předoperační radioterapii u karcinomu žaludku testovali čtyři prospektivní randomizované studie, tři ruské a jedna čínská. Všechny prokázaly zlepšené přežití u nemocných po předoperační radioterapii, bez signifikantního zhoršení peroperační mortality (Zhang et al. 1998; Talaev et al. 1990; Shchepotin et al. 1994, Kosse 1990). Pro metodologické problémy

však nejsou výsledky těchto studií jednoznačně přijímány v západní Evropě a USA. Stejně tak studie samostatné předoperační chemoterapie nepřinesly uspokojivé výsledky.

Neoadjuvantní kombinovaná chemoradioterapie karcinomu žaludku zatím taktéž nepatří mezi standardní metody léčby. Slibné výsledky předoperační chemoradioterapie však byly recentně publikovány několika světovými centry a zejména díky dobrým výsledkům adjuvantní chemoradioterapie se v posledních letech více autorů zaměřuje na aplikaci této léčebné metody v neoadjuvanci, kde může nemocným přinést další benefit (Ajani et al. 2006; Patel et al. 2007; Rohatgi et al. 2006; Wydmanski et al. 2007; Klautke et al. 2004; Allal et al. 2005; Petera et al. 2002; Fujitani et al. 2007).

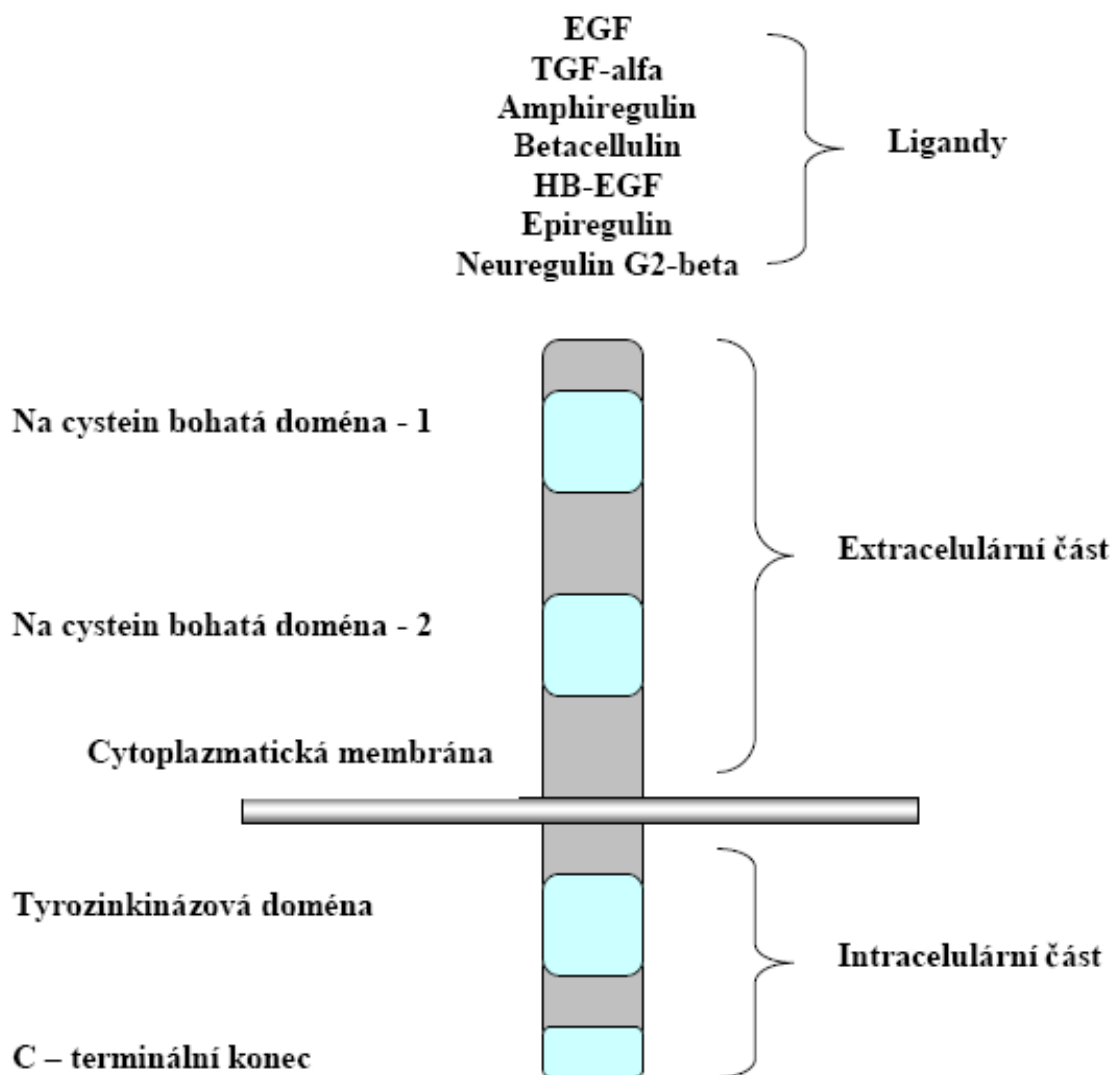
EGFR A JEHO ÚLOHA V RADIOTERAPII

3.2.1. Obecný úvod

Růstové faktory mají nezastupitelnou roli v regulaci buněčného cyklu a v udržování tkáňové homeostázy. Narušení exprese a aktivity receptorů pro růstové faktory tak může vést k alteraci proliferační rovnováhy s následnou iniciací nádorového růstu. Z dosavadních znalostí víme, že narušení exprese receptorů pro růstové faktory může ovlivnit i citlivost nádorové tkáně k cytotoxické léčbě, zvláště pak k ionizujícímu záření (Kasid et al. 1993; Haimovitz-Friedman 1998). Dominantní zájem v této oblasti vzbuzuje receptor pro epidermální růstový faktor, jehož nemalá úloha v mediaci nádorové radiorezistence předurčuje velkou snahu o inhibici jeho funkce za účelem zvýšení radiokurability nádorových onemocnění.

Receptor pro epidermální růstový faktor

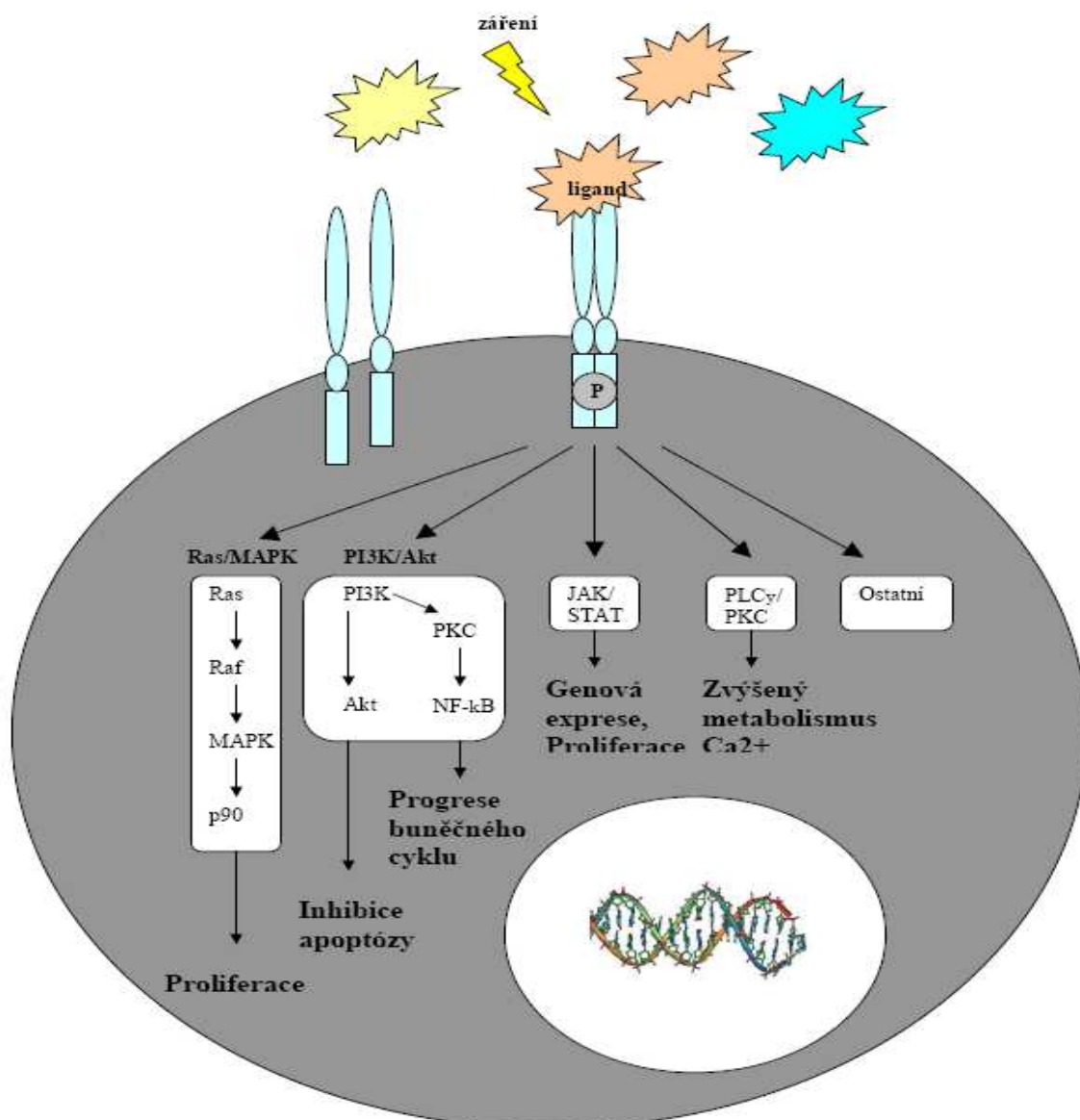
Receptor pro epidermální růstový faktor (EGFR, HER1, erbB-1) je 170-kD vážící a 1186-aminokyselin dlouhý transmembránový glykoprotein. Jeho produkce je kódovaná genem EGFR1 na chromozomu 7. EGFR je jedním ze čtyř členů rodiny erbB tyrozinkinázových receptorů, do které řadíme také HER2 (erbB-2), HER3 (erbB-3) a HER4 (erbB-4). Tyto receptory se skládají z extracelulární domény sloužící pro vazbu ligandu, transmembranózní lipofilní domény a intracelulární cytoplazmatické domény, která vykazuje tyrozinkinázovou aktivitu (Carpenter 1987; Yarden 2001). Přirozenými aktivačními ligandy EGFR je zejména epidermální růstový faktor (EGF) a transformující růstový faktor alfa (TGF α), ale také např. amphiregulin, epiregulin, betacellulin, heparin-binding EGF (HB-EGF) a neuregulin G2-beta (Watanabe et al. 1994, Chrysosghelos et al. 1994; Toyoda et al. 1997; Wells 1999).



Obrázek 1. Zjednodušené znázornění struktury receptor pro epidermální růstový faktor.

Po vazbě ligandu na receptor dojde k homodimerizaci dvou extracelulárních EGFR domén, nebo k heterodimerizaci domény EGFR s jiným z členů erbB rodiny. Poté dochází k internalizaci vzniklých dimerů a následná autofosforylace intracelulární C-terminální tyrozinkinázové domény vede k aktivaci cytoplasmatických transdukčních proteinových kaskád, jejichž prostřednictvím se informace přeneše až k buněčnému jádru (Schmidt-Ullrich et al. 2000; Schmidt-Ullrich et al. 1999; Ullrich et al. 1990; Wiley 2003; Herbst 2004). Nejdůležitější signální cestou je Ras/Raf/MAPK, jejíž aktivace vede k zvýšení proliferační

aktivity a akceleraci buněčné repopulace; dále pak signální cesta PI3K/AKT, jejíž aktivace má zejména cytoprotektivní antiapoptotický účinek. Další důležitou signální cestou je JAK/STAT, jejíž aktivace způsobuje zvýšenou expresi genů v rámci buněčné proliferace, a dále pak cesta PLC γ /PKC, která zodpovídá za zvýšení intracelulárního metabolismu vápníku. EGFR může být také translokován do jádra, kde působí jako transkripční faktor korelující s vysokou proliferační aktivitou (Lin et al. 2001; Waugh et al. 2001; Oksvold et al. 2002).



Obrázek 2. Znárodnění transdukčních signálních cest a výsledných buněčných dějů EGFR.

Funkce EGFR

EGFR hraje důležitou roli v regulaci buněčného cyklu, buněčné proliferace, diferenciaci a buněčného přežívání epidermálních tkání. Aktivace EGFR přidružených nitrobuněčných systémů vede k nastartování proliferace těchto tkání. EGFR je taktéž klíčovým faktorem zachování normální funkce a reparace zdravých epidermálních tkání, ve kterých je jeho exprese přísně regulována. Aberantně zvýšená exprese EGFR pak může zahájit nekontrolovanou buněčnou proliferaci, jejímž výsledkem je vznik epiteliálních prekanceróz až karcinomů.

Kromě podpory buněčné proliferace je EGFR zapojen do řady dalších buněčných procesů. Exprese EGFR například zvyšuje motilitu nádorových buněk (Verbeek et al. 1998) a podmiňuje vznik velkých a rychle metastazujících nádorů (Turner et al. 1996). Zvýšená invazivita a metastatický potenciál nádorových buněk koreluje s přítomností EGFR v experimentálních (Damstrup et al. 1998; Xie et al. 1995) i klinických (Prakash et al. 1997) studiích. Několik studií prokázalo, že vazba EGF na receptor nádorových buněk vede k zablokování apoptózy po vystavení buněk smrtícím faktorům (Gibson et al. 1999; Leu et al. 2000; Payne et al. 1999; McClellan et al. 1999; Lan et al. 1999; Caraglia et al. 1999). Tento proces je zejména důležitý v situacích, kdy je overexprese EGFR provázena zvýšenou produkcí jeho ligandů (Di Marco et al. 1989; Morishige et al. 1991), výsledkem čehož je nastartování antiapoptických mechanismů k zachování nádorové viability.

3.2.2. Nádorová exprese EGFR

Existuje několik mechanismů, jak dochází ke zvýšení aktivity EGFR u nádorových buněk. Hlavním z nich je overexprese receptoru, která zvyšuje hustotu extracelulárních domén a usnadňuje tak jejich dimerizaci po aktivaci ligandem. Dalším mechanismem je nadměrná

aktivace receptoru přirozeným ligandem při jeho zvýšené produkci, genová amplifikace EGFR1 (pravá či spojená s nadměrnou prezentací genu při polyzomii chromozomu 7), přítomnost aktivační mutace EGFR s neregulovanou signalizací receptoru, nebo ztráta negativních intracelulárních regulačních mechanismů.

Overexprese EGFR je považována za stěžejní mechanismus vzniku některých epiteliálních nádorů. Zvýšená exprese či aktivita tohoto receptoru již byla popsána u karcinomu plic, prsu, žaludku, jícnu, prostaty, hlavy a krku, kolorekta, vaječníku, endometria, děložního čípku, močového měchýře a multiformního glioblastomu (Salomon et al. 1995; Hu et al. 1997; Walker et al. 1999; Ekstrand et al. 1991; Mandelsohn et al. 2000; Nicholson et al. 2001; Herbst et al. 2002; Arteaga et al. 2002, Rubin Grandis et al. 1996; Goldstein et al. 2001; Rusch et al. 1997).

Výsledkem aktivace EGFR na povrchu nádorových buněk je progresse buněčného cyklu, urychlení buněčné proliferace, nádorového růstu, diferenciacce a angiogeneze, prodloužení buněčného přežívání inhibicí apoptózy a snížení senzitivity nádorových buněk k cytotoxické léčbě. Zvýšené expresi EGFR se připisuje korelace s vyšším stadiem onemocnění, zvýšenou agresivitou onemocnění, zhoršeným přežíváním, rozvojem vzdálených metastáz, horším stupněm nádorové diferenciacce a sníženou citlivostí k cytostatické léčbě a radioterapii (Maurizi et al. 1996; Wells et al. 2000; Dickstein et al. 1995; Rubin Grandis et al. 1998; Neskovic-Konstantinovic et al. 1999; Nicholson et al. 2001; Ang et al. 2002). Přesný mechanismus tohoto fenoménu však doposud není přesně definován, navíc existují další studie, ve kterých prognostický vliv overexprese EGFR prokázán nebyl (McKay et al. 2002; Hirsch et al. 2003; Spano et al. 2005; Meert et al. 2002; Lee et al. 2002; Leong et al. 2004; Leung et al. 2001).

Tabulka 1. Příklady publikovaných frekvencí exprese EGFR u různých typů nádorů.

Typ nádoru (reference)	Expresa EGFR [%]
Tračník (Goldstein et al. 2001; Salomon et al. 1995)	25-77

Hlava a krk (Salomon et al. 1995; Schartinger et al. 2004; Soulieres et al. 2004)	43-100
Pankreas (Salomon et al. 1995; Abbruzzese et al. 2001; Uegaki et al. 1997)	30-95
NSCLC (Salomon et al. 1995; De Pas et al. 2004; Rusch et al. 1997)	32-84
Ledvina (Salomon et al. 1995; Langner et al. 2004; Yoshida et al. 1997)	50-93
Prs (Salomon et al. 1995; Abd El-Rehim et al. 2004)	14-91
Vaječník (Salomon et al. 1995; Elie et al. 2004)	35-70
Gliom (Salomon et al. 1995; Liu et al. 2003)	40-63
Močový měchýř (Chow et al. 1997)	72

Obecně lze předpokládat určitou variabilitu exprese EGFR mezi jednotlivými typy nádorů, např. mezi karcinomem prsu a karcinomem plic. Dokonce i v rámci nemalobuněčného karcinomu plic panuje určitá heterogenita EGFR exprese mezi jednotlivými subtypy nádoru: 33% u velkobuněčného karcinomu, 40 % u adenokarcinomu a 80% u dlaždicobuněčného karcinomu plic (Hirsch et al. 2003). Podobná variabilita je ale popisována také mezi výsledky jednotlivých zkoumání u stejných histologických typů nádorů (Tabulka 1). Pro tuto různorodost existuje několik možných vysvětlení: 1) na rozdíl od tradičních metod histopatologického zkoumání původu a vzhledu nádorových tkání, moderní molekulární techniky již u řady „stejných“ nádorů prokázaly velkou heterogenitu stran jejich cytogenetické a proteinové exprese (např. HER-2 u karcinomů prsu); 2) určité diskrepance mohou pocházet z různých metod měření a hodnocení exprese (Spaulding et al. 2002); 3) rozdíly mohou být také následkem falešné negativity při odběru málo reprezentativního vzorku nádoru, nebo při nízké senzitivitě imunohistochemického barvení. Ať už je důvod jakýkoliv, výrazná variabilita exprese EGFR snižuje možnosti jeho prognostického testování (Artaega 2002).

3.2.3. Laboratorní stanovení EGFR

Snaha o stanovení aktivity EGFR jako prognostického či prediktivního markeru naráží na řadu problematických vlivů. Ty většinou vznikají kombinací více faktorů, jako je metoda odběru a přípravy tkáňových vzorků, metoda hodnocení receptorové aktivity a nežádoucí vliv

reagencií užívaných při diagnostických postupech, které mohou vést k narušení či ztrátě antigenové exprese. Heterogenita laboratorních a hodnotících metod může sehrát značnou roli v rozporuplných až konfliktních výsledcích některých studií. Preciznost, spolehlivost a uniformita ve stanovování aktivity EGFR je stále ve vývoji. Nicméně i kdybychom dosáhli značné přesnosti a reprodukovatelnosti metod stanovení hladiny receptorové exprese nebo počtu EGFR genových kopií, stejně by nemusely adekvátně odrážet skutečný stav receptorové aktivity, ani závislost nádoru na regulační dysfunkci.

Pro detekci exprese EGFR lze užít celou řadu zaběhlých technik. Základem jsou testy proteinové exprese, např. imunohistochemie (IHC), Western-blot analýza, ELISA a FACS. Dále lze užít testy transkripce RNA, např. Northern-blot analýza a RT-PCR; nebo testy DNA, např. kvantitativní PCR, Southern-blot analýza a FISH. Přehled jednotlivých technik je uveden v tabulce 2.

Tabulka 2. Možnosti detekce EGFR v nádorové tkáni.

Metoda	Limitace
<i>Metody detekce in situ</i>	
IHC	Nedostatečná standardizace
FISH	Žádná
<i>Extrakční metody</i>	
Western blot	Technická náročnost
Northern blot	Technická náročnost
Southern blot	Technická náročnost
RT-PCR	Technická náročnost
Kvantitativní PCR	Technická náročnost
ELISA	Žádná
Průtoková cytometrie	Žádná

Imunohistochemie (IHC)

V současnosti nejvíce užívanou metodou stanovení exprese EGFR je imunohistochemie, kterou užívá většina studií zabývajících se prediktivní a prognostickou rolí EGFR. Široké rozšíření tohoto testu je způsobeno snadnou dostupností testovacích reagentů a technik, dále

jeho jednoduchostí a rychlostí provedení. Na rozdíl od extrakčních technik má IHC výhodu v možnosti zachování tkáňové morfolgie a integrity, která může poskytnout důležitou dodatečnou informaci s ohledem na distribuci cílové molekuly v nádorovém vzorku. Imunohistochemie je dosud nejspolehlivější metodou stanovení exprese EGFR, ale její interpretace je při nedostatku standardních technik hodnocení matoucí. Kvalita informací poskytnutých imunohistochemií je závislá na kvalitě užitých reagensů a na kvalitě metody hodnocení zkušeným patologem. Možnost srovnání výsledků exprese mezi jednotlivými laboratořemi je podmíněna standardizací technik tkáňového odběru, zpracování, fixací, barvení a odečítání za použití identického skórovacího systému. Standardním imunohistochemickým setem vyvinutým pro stanovení exprese EGFR je monoklonální myší IgG₁ protilátka proti lidskému EGFR (EGFR pharmDxTM, DakoCytomation), která byla schválena FDA (Food and Drug Administration) za účelem identifikace EGFR pozitivních nádorů, před zařazením do klinických studií zkoumajících anti-EGFR monoklonální protilátku cetuximab (Erbix^R).

Imunohistochemie má sice potenciál v kvalitativním rozlišování nádorů na základě exprese EGFR, ale neposkytuje skutečnou kvantitativní analýzu. Několik autorů se tak snažilo vyvinout skórovací algoritmy k numerickému hodnocení IHC exprese EGFR (Kersemakers et al. 1999; Hirsch et al. 2003; Scartozzi et al. 2004; Spano et al. 2005; Cunningham et al. 2004). I přes četné rozdíly mezi jednotlivými metodami, všechna hodnocení exprese EGFR jsou založena na srovnání procentuálního rozsahu a intenzity imunohistochemického barvení (Tabulka 3).

Hlavním rizikem imunohistochemického hodnocení je nebezpečí falešně negativního výsledku, způsobeného slabým barvením z důvodu nízké senzitivity, nebo z důvodu odlišné exprese EGFR v různých regiorech nádoru. Další stinnou stránkou skórovacích systémů je to, že nejsou striktně kvantitativní a jejich interpretace je vyloženě subjektivním procesem. Nedostatek objektivní stránky hodnocení lze částečně odstranit vícenásobným zaslepeným

hodnocením např. dvěma až třemi zkušenými histopatology. Jednotný skórovací systém by však byl ku prospěchu při srovnávání výsledků exprese EGFR z jednotlivých studií. Srovnávající studie hodnotící jednotlivé skórovací systémy imunohistochemického barvení nejen u EGFR ukázala, že nejkonzistentnější výsledky přináší co nejjednodušší skórování s dobře definovanými kritérii (Adams et al. 1999).

Tabulka 3. Publikované skórovací systémy hodnocení imunohistochemické exprese EGFR.

Reference	Rozsah barvení [% pozitivních buněk]	Intenzita barvení	Celkové skóre
Cunningham et al. 2004	≤10% 11-20% 21-35% >35%	slabá střední silná	není určeno
Hirsch et al. 2003	kontinuální proměnná od 0% do 100%	1 = negativní 2 = slabá 3 = střední 4 = silná	procento buněk násobené intenzitou barvení (0-400) - 0-200 = nízká exprese - 201-300 = střední exprese - 301-400 = vysoká exprese
Kersemaekers et al. 1999	0 = negativní 1 = 1-25% 2 = 26-50% 3 = 51-75% 4 = 76-100%	0 = negativní 1 = slabá 2 = střední 3 = silná	součet intenzity a rozsahu barvení (0-7) - 0 = negativní exprese - 2-3 = nízká exprese - 4-5 = střední exprese - 6-7 = vysoká exprese
Spano et al. 2005	0 = negativní 1 = 1-25% 2 = 26-50% 3 = >50%	0 = negativní 1 = slabá 2 = střední 3 = silná	násobek intenzity a rozsahu barvení (0-9) <6 = nízká exprese >6 = vysoká exprese
Kim et al. 2006	0 = negativní 1 = 1-25% 2 = 26-50% 3 = 51-75% 4 = 76-100%	0 = negativní 1 = slabá 2 = střední 3 = silná	součet intenzity a rozsahu barvení (0-7) - 0-3 = nízká exprese - 4-7 = vysoká exprese
Giralt et al. 2005	1 = <5% 2 = 5-25% 3 = 26-50% 4 = 51-75% 5 = 76-100%	0 = negativní 1 = slabá 2 = střední 3 = silná	<5% = negativní exprese ≥5% = pozitivní exprese >50% a/nebo grade 3 intenzity barvení = vysoce pozitivní exprese

Ostatní metody hodnocení exprese EGFR

Na rozdíl od HER-2 receptoru u karcinomu prsu, u kterého je popsána vysoká míra korelace vztahu IHC exprese a genové amplifikace stanovené metodou FISH, je u EGFR vztah mezi proteinovou expresí a genovou amplifikací mnohem nepřehlednější a méně prozkoumaný.

Jistá míra korelace mezi genovou amplifikací EGFR1 (15%), nadměrnou reprezentací genu při polyzomií chromosomu 7 (39%) a proteinovou expresí EGFR (49%) byla prokázána u karcinomu jícnu (Sunpaweravong et al. 2005). Podobná korelace byla prokázána také u nemalobuněčného karcinomu plic (Hirsch et al. 2003). Ne všechny studie však našly jasný vztah mezi proteinovou expresí EGFR a počtem jeho genových kopií. Například studie srovnávající expresi EGFR u 222 vzorků karcinomu prsu našla IHC overexpresi EGFR u 17,3 % nádorů; pouze u 13% z nich byla metodou FISH nalezena amplifikace genu EGFR1, a pouze 20% IHC pozitivních nádorů vykazovalo zvýšenou amplifikaci prvního intronu (jako úroveň transkripce genu) při hodnocení metodou kvantitativní RT-PCR (Kersting et al. 2004). Výsledek této studie naznačuje, že přinejmenším u karcinomu prsu jsou FISH a RT-PCR při průkazu amplifikace EGFR inferiorní ke konvenčnímu IHC stanovení proteinové exprese. Podobně dopadla studie analyzující amplifikaci genu EGFR metodou RT-PCR u kolorektálních karcinomů se známou imunohistochemickou expresí proteinu EGFR (Layfield et al. 2003). Výsledky této studie ukázaly, že oba parametry byly na sobě nezávislé.

Předběžná data tedy naznačují, že srovnání počtu genových kopií a proteinové exprese EGFR má prozatím omezený klinický význam. Nicméně data pocházejí ze studií, které byly závislé na nestandardizovaných IHC systémech hodnocení proteinové exprese, provedené na omezeném počtu nádorů, bez řešení otázky heterogenity exprese EGFR uvnitř nádorů. Pokud však necháme metodologické překážky stranou, imunohistochemie představuje nejlepší současnou metodu prognostického zkoumání EGFR (Dei Tos et al. 2005).

3.2.4. Mutace EGFR

Kromě normální molekuly receptoru pro epidermální růstový faktor se můžeme často setkat také s jeho mutovanou formou. Mezi nejčastější se řadí mutace EGFRvI, II a III, které podmiňují tři odlišné delece v extracelulární doméně receptoru. Nejlépe popsanou a nejčastější z nich je mutace EGFRvIII, která se ve zdravých tkáních nenachází, ale byla již popsána v celé řadě nádorů, zejména pak u glioblastomu, karcinomu prostaty, karcinomu prsu a NSCLC (Frederick et al. 2000; Moscatello et al. 1995). Tato mutovaná forma receptoru postrádá zevní doménu pro vazbu ligandu a má nezávisle aktivovanou, zato však oslabenou tyrozinkinázu (Moscatello et al. 1996; Wong et al. 1992; Nishikawa et al. 1994; Batra et al. 1995).

Nejvíce diskutované a zkoumané jsou mutace EGFR u nemalobuněčného karcinomu plic, které jsou přítomny u 10% případů NSCLC v Evropě a Severní Americe a až u 30-40% pacientů z oblasti východní Asie. Mutace jsou pozorovány zejména v exonech 18-21; mezi nejčastější pak patří delece v exonu 19, nebo bodová mutace v exonu 21 (Sharma et al. 2007). Tyto mutace jsou spojeny s klinickými charakteristikami nemocných, kteří nikdy nekouřili, typicky u žen, osob asijského etnika a jedinců s histologicky prokázaným adenokarcinomem (Shigematsu et al. 2005; Marchetti et al. 2005). Naopak mutace v genu K-ras jsou častější u kuřáků s NSCLC (Ahrendt et al. 2001; Husgafvel-Pursiainen et al. 1993). K-ras je efektor v signální dráze EGFR a jeho mutace se objevují zhruba u 20-30% případů NSCLC (Aviel-Ronen et al. 2006) a až u 35% případů kolorektálního karcinomu.

Právě mutace genu K-ras vzbuzuje v letošním roce velkou diskusi, vzhledem k jeho vlivu na efektivitu cílené inhibice EGFR monoklonální protilátkou cetuximab (Erbix^R, ImClone Systems Incorporated, New York, USA), která byla v únoru 2004 schválena FDA k léčbě kolorektálních karcinomů rezistentních k léčbě irinotekanem. V případě mutace genu K-ras je

totiž signalizace cestou EGFR trvale stimulovaná, a proto inhibice vlastní molekuly receptoru EGFR cetuximabem nezastaví nádorovou proliferaci (Eberhard et al. 2005; Han et al. 2006; Pao et al. 2005). Naopak nádory s přirozeným, nemutovaným genem K-ras mají tuto signální cestu funkční a lze ji tak cetuximabem zablokovat. Přítomnost přirozeného, tzv. divokého typu (“wild-type”) genu K-ras se zdá být lepším prediktorem léčebné odpovědi k biologické léčbě než samotné stanovení exprese EGFR.

Stanovení mutací genu K-ras, podobně jako EGFR, se provádí PCR amplifikací exonů 12 a 13 (resp. 19 a 21) s následnou sekvenací produktů (Tang et al. 2005; Ogino et al. 2005). Většího využití v poslední době nachází metoda real-time PCR, využívající fluorescenčně značené oligonukleotidy ke specifické amplifikaci příslušného genu (Amado et al. 2008), především díky nově dostupným komerčním kitům (TheraScreen K-RAS a TherScreen EGFR29, DXS Diagnostic, UK).

3.2.5. Prognostická a prediktivní hodnota EGFR

Signifikantní korelace mezi expresí EGFR, kratší dobou do rekurence onemocnění a zkrácením celkového přežití již byla zjištěna u karcinomu vaječníku, laryngu, prsu, nemalobuněčného karcinomu plic, multifornního glioblastomu i u karcinomu žaludku (Fisher-Colbrie et al. 1997; Klijn et al. 1994; Maurizi et al. 1996; Selvaggi et al. 2004; Shinojima et al. 2003; Lieto et al. 2007). Přehledné zpracování 200 studií (zahrnující > 20 000 pacientů) se poté pokusilo rozeznat prognostickou roli zvýšené exprese EGFR na redukované celkové a bezpříznakové přežití u nádorů exprimujících EGFR (Nicholson et al. 2001). U deseti typů nádorů, u kterých byla data adekvátní pro statistickou analýzu, byla prokázána silná (70%) prognostická hodnota exprese EGFR u nádorů hlavy a krku, vaječníku, děložního čípku, močového měchýře a nádorů jícnu; střední (50%) prognostická hodnota u karcinomu žaludku, prsu, endometria a tračnicku; a slabá (30%) prognostická hodnota u NSCLC.

Několik imunohistochemických studií prokázalo, že exprese EGFR v nádorové tkáni je značně heterogenní s klesající intenzitou exprese do periferie, kde nádor prorůstá do okolní zdravé tkáně (Goldstein et al. 2001). Existují také důkazy toho, že zvýšená exprese EGFR v nádorové periférii zhoršuje přežití u pacientů s metastatickým karcinomem kolorekta (Kearsley et al. 1991). Tato sledování naznačují, že EGFR může hrát vysoce specifickou roli v nádorovém růstu a invazi (Green et al. 1983). Pokud je tato teorie pravdivá, lze předpokládat vliv EGFR také na riziko vzniku vzdálených metastáz.

Experimentálně byla po podání cetuximabu prokázána inhibice metastazování u myší nesoucích nádorovou linii 253J B-V (Perrotte et al. 1999), nebo buňky lidského karcinomu prostaty (Karashima et al. 2002). Dále byla po podání cetuximabu prokázána redukce spontánních metastáz u myších xenograftů maligního melanomu (Naramura et al. 1993). Existuje však pouze málo klinických studií srovnávajících intenzitu exprese EGFR v primárních nádorech a jejich vzdálených metastázách. Jednou z výjimek je studie, která popisovala horší prognózu při zvýšené expresi EGFR v periférii nádorů kolorekta a současně prokázala, že exprese EGFR v místech největší invaze do zdravé tkáně koreluje s expresí EGFR ve vzdálených metastázách (Kearsley et al. 1991). Další studie, která používala metodu RT-PCR k hodnocení hladin EGFR mRNA u karcinomu kolorekta, prokázala shodnou aktivitu EGFR v primárních i vzdálených ložiscích (Sinicrope et al. 2002). Oproti tomu studie srovnávající IHC expresi EGFR u CRC a jeho uzlinových metastázách zde nenalezla žádnou signifikantní asociaci (McKay et al. 2002). Podobně ani v další studii nebyla nalezena asociace mezi expresí EGFR z primárního ložiska kolorektálního karcinomu (CRC) a ze vzdálených metastáz jater, plic, mozku a kostí (Scartozzi et al. 2004). Stejní autoři navíc zaznamenali sedm EGFR pozitivních metastáz (15%) u pacientů s EGFR negativními primárními nádory. Autoři tak závěrem konstatují, že míra exprese EGFR v primárním nádoru není adekvátním klíčem k volbě EGFR-cílené terapie u karcinomů kolorekta.

Data z randomizované studie fáze II. BOND, která studovala účinnost 2. linie chemioterapie irinotecan plus cetuximab u metastatického CRC prokázala, že pravděpodobnost léčebné odpovědi je nezávislá na hladině nádorové exprese EGFR (Cunningham et al. 2004). Nelze namítat, že by byly výsledky zkresleny současným podáváním irinotecanu, protože ani v rameni s podáváním samotného cetuximabu, ani v další studii fáze II. s monoterapií cetuximabem nebyl vztah exprese EGFR k léčebné odpovědi prokázán (Saltz et al. 2004). Stejně tak se neprokázala prediktivní role exprese EGFR na léčebnou odpověď ke gefetinibu či erlotinibu u nemalobuněčného karcinomu plic (Perez-Soler 2004; Parra et al. 2004). Na druhou stranu retrospektivní studie na 16 pacientech s EGFR negativním metastatickým CRC prokázala, že 25% z nich mělo léčebnou odpověď k cetuximabu (Chung et al. 2005). Zdá se tedy, že imunohistochemická exprese EGFR není spolehlivou cestou k předurčení účinnosti terapie jeho inhibitory. Spolehlivějším prediktorem léčebné odpovědi se recentně stalo stanovení mutace K-ras.

3.2.6. EGFR a radioterapie

Co se týče vlivu EGFR na citlivost onemocnění k samotné radioterapii, nepanuje zde jednotný konsensus. Výsledky některých studií připisují EGFR úlohu při stanovení prognózy onemocnění po prodělané radioterapii (Rubin Grandis et al. 1998; Ang et al. 2002; Giralt et al. 2005; Demiral et al. 2004), jiné zase prediktivní roli léčebné odpovědi k radioterapii (Eriksen et al. 2005; Barker et al. 2001; Giralt et al. 2002), další studie pak zkoumají možnosti funkční modulace aktivity EGFR ve snaze o zvýšení účinnosti radioterapie (Krause et al. 2005; Toulany et al. 2003). Nežádoucí dopad zvýšené exprese EGFR na lokální kontrolu onemocnění po frakciované radioterapii je nejlépe doložen u nádorů, u kterých je radikální radioterapie užívána jako jediná léčebná modalita, tj. u karcinomů děložního hrdla, hlavy a krku a u glioblastomů (Maurizi et al. 1996; Ang et al.

2002; Ang et al. 2004; Zhu et al. 1996; Pillai et al. 1998; Chua et al. 2004; Eriksen et al. 2004; Atasoy et al. 2004; Barker et al. 2001; Demiral et al. 2004, Murat et al. 2008). Přesto že se korelace mezi expresí EGFR a špatnou klinickou prognózou nemocných po kurativní radioterapii zdá být přesvědčivá, kauzalita a efekt tohoto vztahu zůstává nadále otázkou.

EGFR a radiorezistence

Jistou aritmetickou závislost radiorezistence na expresi EGFR naznačily výsledky *in vitro* studie, jejíž autoři nejprve provedli genovou transfekci EGFR do nádorových buněčných linií karcinomu vaječníku (OCA-I), které se jinak vyznačují velmi nízkou expresí EGFR, a následně pak metodou klonogenního přežívání měřily citlivost takto vzniklých buněčných linií k ionizujícímu záření. Výsledky jejich měření prokázaly 1.6x zvýšení radiorezistence u linií s vysokou expresí EGFR, 1.37x zvýšení radiorezistence u linií se středně vysokou expresí EGFR a konečně 1.28x zvýšení radiorezistence u linií s nízkou expresí EGFR (Liang et al. 2003). Tato studie navíc díky svému unikátnímu provedení prokázala, že i uměle navozená exprese EGFR zvyšuje rezistenci nádorových buněk k radioterapii. Stejní autoři poté vystavili transfekované linie OCA-I působení monoklonální protilátce proti EGFR (IMC-C225), což mělo za následek snížení exprese tohoto receptoru, snížení fosforylace jeho cytoplazmatických signálních cest (jako je AKT a MAPK) a zablokování dříve navozené radiorezistence. Tento experiment tak předkládá přímé důkazy o radiorezistenci podmíněné expresí EGFR a prokazuje možnost její inhibice prostřednictvím blokace receptorové aktivity.

EGFR a nádorová repopulace

Publikované radiobiologické studie shodně připisují EGFR kritickou úlohu ve zprostředkování cytoprotektivních a pro-proliferativních reakcí nádorových buněk po

expozici ionizujícímu záření. Přesný mechanismus jak EGFR zprostředkovává rezistenci k radiační terapii je stále zkoumán. Jak *in vitro*, tak *in vivo* studie shodně popisují schopnost ionizujícího záření imitovat roli aktivačního ligandu EGFR. Bylo zjištěno, že klinicky významné dávky radioterapie v rozmezí 1 – 5 Gy dokáží v průběhu několika minut a bez rozdílu aktivovat všechny ErbB receptory exprimované nádorovou buněčnou populací. Aktivace EGFR je zde definována několikanásobným nárůstem fosforylace tyrozinu, která není odlišitelná od aktivace příslušným růstovým faktorem (Bowers et al. 2001; Reardon et al. 1999; Lammering et al. 2001). Navíc opakovaná expozice nádorové tkáně radiační dávkou 2 Gy vede ke zvýšení buněčné exprese EGFR, která má za následek dávkově závislé zvýšení proliferační odpovědi nádoru jak po jednorázové, tak po opakované iradiaci (Contessa et al. 1999; Kavanagh et al. 1995).

Na základě těchto nálezů lze učinit závěr, že se radiací indukovaná exprese EGFR z velké části vztahuje právě k akcelerované nádorové repopulaci (Schmidt-Ullrich et al. 2000; Withers et al. 1988; Baumann et al. 2002). Zvýšení nádorové proliferace v průběhu radioterapie vede k zvýšené obnově nádorových klonogenních populací (Withers et al. 1988; Begg 1994; Fowler 1991), čímž působí kontraproduktivně vůči samotné léčbě zářením (Schmidt-Ullrich et al. 1999). Tvrzení, že aktivita EGFR významně přispívá k nádorové repopulaci se opírá také o *in vivo* studie, ve kterých byla prokázána závislost akcelerované repopulace nádorových tkání na hladině exprese EGFR (Milas et al. 2002; Milas et al. 1991; Eriksen et al. 2004; Atasoy et al. 2004). Aktivace transdukčních kaskád závislých na EGFR v průběhu buněčné iradiace vede k aktivaci biosyntetických pochodů, které v případě úspěšné reparace radiací indukovaného poškození zapříčiní nádorovou proliferaci (Amorino et al. 2002; Contessa et al. 2002).

EGFR a reparace radiačního poškození DNA

Zvýšená biosyntetická aktivita rychle proliferujících buněk může současně zvyšovat kapacitu procesu reparace DNA. Vliv EGFR na zvýšení reparace radiací poškozené DNA potvrzuje pozorování, že během inhibice EGFR dochází taktéž ke snížení reparace DNA. Na buněčné linii SCC-13Y, která byla inkubována s IMC-C225 po dobu 8 hodin a více v intervalu mezi dvěma frakcemi ozáření o dávce 3 Gy, byla nalezena redukovaná reparace subletálního poškození DNA oproti kontrolní linii bez inhibitorů EGFR, což platilo i pro reparaci potenciálně letálního poškození DNA po iradiaci nádorových linií jednotlivou dávkou radioterapie (Huang et al. 2000). Kritickou roli EGFR v procesu reparace DNA potvrjují i nálezy dalších autorů (Rodemann et al. 2007; Chen et al. 2007; Amorino et al. 2002). Role EGFR v iniciaci cytoprotektivní odpovědi lidských nádorových buněk po expozici ionizujícímu záření naznačuje, že funkční inhibice EGFR v průběhu radioterapie může této reakci předcházet, s výsledným zvýšením nádorové radiosenzitivity.

EGFR a angiogeneze

Některá publikovaná data podporují hypotézu, že exprese EGFR souvisí také s nádorovou angiogenezí. Důkazů pro toto tvrzení však není doposud mnoho. Experimentálně byla například prokázána inhibice angiogeneze po inkubaci nádorové tkáně s monoklonální protilátkou IMC-C225, která blokuje funkci EGFR (Huang et al. 2000). V této studii byla po aplikaci inhibitoru EGFR zaznamenána redukce IHC záchytu vaskulárního endoteliálního růstového faktoru (VEGF), který je za nádorovou angiogenezi zodpovědný. Formace nových cév byla v této studii redukována zejména po současné aplikaci inhibitoru EGFR a ionizujícího záření, zatímco po aplikaci obou léčebných modalit samostatně byla signifikantně nižší. Další studie po podání cetuximabu zaznamenala u epidermoidních karcinomů nejen

inhibici produkce VEGF a redukcí tvorby cévních struktur (Viloria-Petit et al. 1997), ale také snížení exprese interleukinu 8 (IL-8) a růstového faktoru fibroblastů (FGF), za současné involuce již existujících cév (Perotte et al. 1999). Taktéž inkubace lidských endoteliálních buněk s inhibítorem tyrozinkinázy EGFR (ZD-1839) vedla *in vitro* k zastavení formování cévních tubulů a ke ztrátě spojení mezi jednotlivými buňkami (Huang et al. 2002). Podobně byla prokázána redukce vaskularizace *in vivo* poté, co byla myším s lidskými nádorovými xenografty aplikována molekula ZD-1839 (Huang et al. 2002). Antiangiogenní vlastnost inhibitorů EGFR a tedy i jejich schopnost navodit nádorovou hypoxii však může mít na výsledek radioterapie jak pozitivní tak i negativní dopad (Zips et al. 2003).

EGFR a frakcionace radioterapie

Klinická data naznačují, že vysoké hodnoty exprese EGFR mohou být asociovány s vyšším výskytem lokálních recidiv nádorů po frakcionované radioterapii. Zejména zmíněná frakcionace pak může v této problematice sehrát významnou roli. V Ericksenově studii, v rámci známého projektu DAHANCA 6 a 7, byla zkoumána prediktivní role exprese EGFR na léčebné výsledky radioterapie karcinomů hlavy a krku v závislosti na odlišné frakcionaci (Eriksen et al. 2005). Výsledky prokázaly, že karcinomy s vysokou expresí EGFR odpovídají signifikantně lépe na akcelerovanou radioterapii než na standardní frakcionaci, zatímco u nádorů s nízkou expresí rozdíl v účinnosti signifikantní není. Tento poznatek naznačuje, že overexprese EGFR je s největší pravděpodobností spojena s rychlejší klonogenní repopulací nádoru, což nakonec potvrzují výsledky další studie (Atasoy et al. 2004). Vysoká exprese EGFR v nádorové tkáni by tak mohla indikovat rapidní repopulaci nádorových buněk a selektovat tak pacienty, kteří by měli větší přínos z akcelerované frakcionace. Jinými slovy lze říci, že zvýšená exprese EGFR snižuje účinnost radioterapie tím více, čím delší je celková doba léčby. Vliv exprese EGFR na klonogenní repopulaci nádoru během frakcionované

radioterapie již byl prokázán také experimentálně *in vitro* (Schmidt-Ullrich et al. 1999) a *in vivo* na myších xenograftech lidského dlaždicobuněčného karcinomu (Petersen et al. 2003).

Bohužel zvýšena hladina exprese proteinu EGFR nemusí jistě znamenat skutečnou zvýšenou aktivitu receptoru v klonogenní populaci nádoru (Schmidt-Ullrich et al. 2003). Navíc již dříve zmíněná evidence jasně prokazuje, že exprese EGFR v nádorové tkáni v průběhu frakcionované radioterapie stoupá. Výchozí hodnota receptorové exprese tak není dostačujícím parametrem pro volbu alternativní frakcionace radioterapie. Rozumnějším léčebným postupem než akcelarovat radioterapii je nalézt vhodný postup inhibice funkce EGFR v průběhu léčby.

3.2.7. Možnosti inhibice EGFR

Poprvé byla inhibice buněčné proliferace po aplikaci monoklonální protilátky proti EGFR popsána již v roce 1981 (Schreiber et al. 1981). Na tuto studii pak navázala řada dalších autorů s obdobnými výsledky (Masui et al. 1984; Modjtahedi et al. 1998; Saleh et al. 1999; Huang et al. 1999; Bianco et al. 2002). Tyto *in vitro* experimenty se shodují s nálezy zpomaleného růstu nádorů po aplikaci inhibitorů EGFR *in vivo* (Baumann et al. 2003; Shintani et al. 2003; Huang et al. 2002; Sirotiak et al. 2000; Prewett et al. 1998; Overholser et al. 2000; Gutowski et al. 1991; Aboud-Pirak et al. 1988). V jedné studii byla po aplikaci monoklonální protilátky proti EGFR dokonce zaznamenána úplná eradikace nádorových buněk bez použití další cytotoxické terapie (Yang et al. 1999). Z dosavadních znalostí o vlastnostech EGFR tak logicky vyplývá, že se stal nadějným terčem výzkumu cílené biologické terapie. V průběhu komplexního procesu signalizace, od navázání ligandu na receptor až po aktivaci transdukčních cest a alteraci genové exprese v jádře, existuje mnoho příležitostí k cílené terapeutické intervenci (Tabulka 4).

Tabulka 4. Možnosti inhibice EGFR ve vývoji a v praxi (aktuální v únoru 2009).

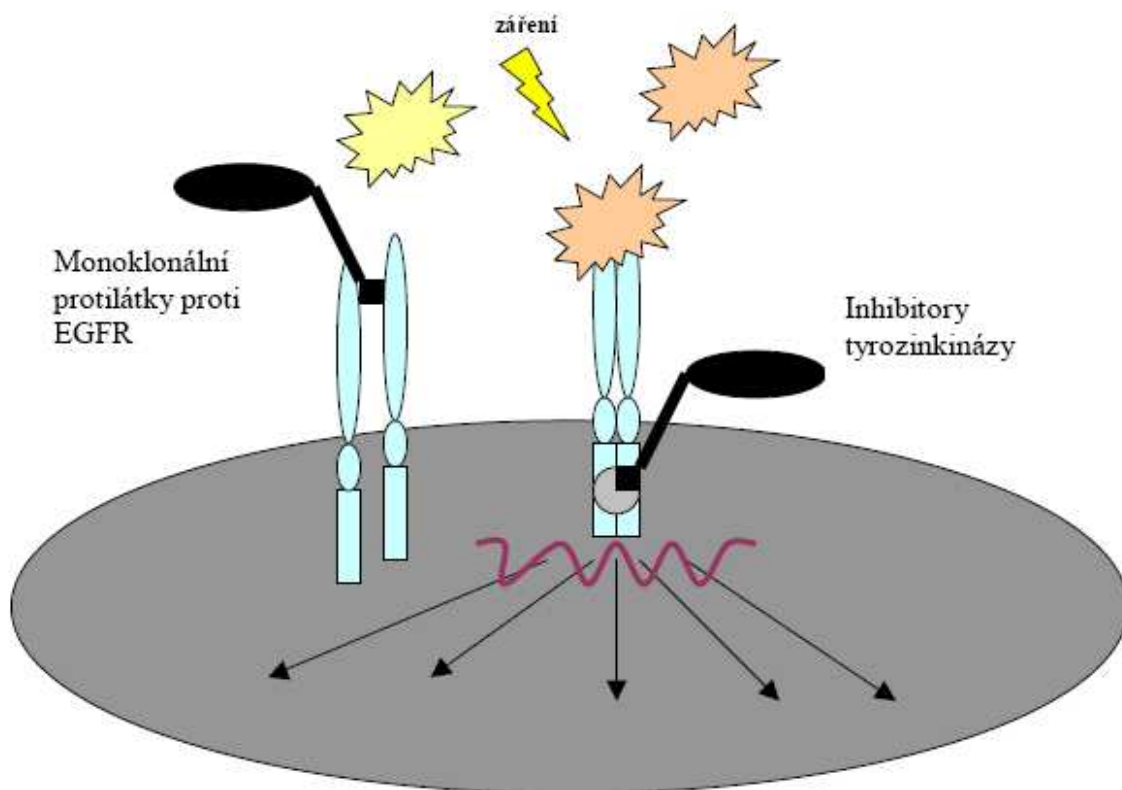
Název látky	Cíl	Stadium vývoje
protilátky proti EGFR		
cetuximab (IMC-C225)	EGFR	v klinické praxi
panitumumab (ABX-EGF)	EGFR	v klinické praxi
matuzumab (EMD72000)	EGFR	fáze II
nimotuzumab (TheraCIM)	EGFR	fáze I
inhibitory tyrozinkinázy		
erlotinib (OSI-774)	EGFR	v klinické praxi
gefitinib (ZD1839)	EGFR	v klinické praxi
EKB-569	EGFR	fáze I
CL-3877785	EGFR	preklinické
HKI-272	EGFR, HER2	fáze I
BIBW-2992	EGFR, HER2	fáze I
PKI-166	EGFR, HER2	fáze I
lapatinib (GW-572016)	EGFR, HER2	v klinické praxi
CI-1033	EGFR, HER2, HER4	fáze II
PF-00299804	EGFR, HER2, HER4	fáze I
vandetanib (ZD6474)	EGFR, VEGF	fáze III
XL647	EGFR, HER2, VEGF	fáze II
AEE788	EGFR, HER2, VEGF	fáze I
dominantně negativní mutanty		
EGFR-CD533	EGFR	fáze II
vakcína proti EGF		
	EGFR	fáze I/II

Jednu léčebnou strategii představují monoklonální protilátky namířené proti extracelulární receptorové doméně. Různé pracovní skupiny již vyvinuly celou řadu protilátek namířených proti EGFR. Dvě takové protilátky (M225 a M528) prokázaly schopnost soutěžit s EGF při vazbě na receptor, inhibovat fosforylaci závislou na intracelulární tyrozinkináze a současně snižovat počet EGFR navozením jejich zvýšené internalizace. Vzniklý komplex protilátka-receptor je po internalizaci degradován, dochází tak k inhibici signálních cest EGFR, což přispívá k trvalé bloádě jeho funkce (Thomas et al. 2004). Nadějným inhibitorem se stala

zejména molekula M225, která byla posléze chimerizována do konstantního regionu lidského imunoglobulinu G1, za vzniku chimérické monoklonální protilátky IMC-C225, známé jako „cetuximab“ (Erbitux^R, ImClone Systems Incorporated, New York, USA). „Polidštěná“ IMC-C225 má vyšší vazebnou kapacitu na extracelulární doménu EGFR než M225 (tj. asi 5x vyšší afinita k EGFR než jeho přirozené ligandy) a má také delší biologický poločas v séru (Goldstein et al. 1995; Bos et al. 1996). Navíc humanizace této protilátky snižuje riziko vzniku imunologické reakce proti myšímú antigenu (Herbst et al. 2002). Cetuximab v experimentech inhibuje buněčnou proliferaci u celého spektra lidských nádorů (Huang et al. 2002). V únoru 2004 byl cetuximab ve své první klinické indikaci schválen FDA k léčbě kolorektálních karcinomů rezistentních k léčbě irinotekanem. Do stejné skupiny humanizovaných monoklonálních inhibitorů EGFR patří „panitumumab“ (Vectibix^R, ABX-EGF, Amgen Inc., Thousand Oaks, Kalifornie, USA); „matuzumab“ (EMD72000, Merck, Whitehouse Station, New Jersey, USA); a „nimotuzumab“ (TheraCIM, YM Biosciences Inc., Mississauga, Ontaro, Kanada), u kterého byla prokázána bezpečnost v monoterapii u pacientů s pokročilými karcinomy hlavy a krku v kombinaci s radioterapií (Brade et al. 2007; Crombet et al. 2004).

Druhou možností inhibice aktivity EGFR představuje podání syntetických inhibitorů cytoplazmatické tyrozinkinázy (tyrosine kinase inhibitors, TKI). Jedná se o inhibitory o malé molekule, které soutěží s molekulou adenosin-trifosfátu při vazbě na kinázovou doménu (Fry et al. 1994). TKI jsou dosud nejúspěšnějšími látkami používanými k zacílení EGFR. A v současnosti rychle narůstá jejich počet v různé fázi klinického i preklinického vývoje (Tabulka 4). Klinické uplatnění již našly perorální reverzibilní TKI „gefitinib“ (Iressa^R, ZD1839, Astra Zeneca, Macclesfield, Velká Británie), který byl FDA schválen pro monoterapii chemorezistentních nemalobuněčných karcinomů plic (Cohen et al. 2004); a „erlotinib“ (Tarceva^R, OSI-774, OSI Pharmaceuticals, Melville, New York, USA) s vysokou

specifitou k EGFR (Woodburn 1999), který našel klinické uplatnění v léčbě NSCLC a u adenokarcinomu pankreatu.



Obrázek 3. Zjednodušené znázornění základních možností inhibice EGFR.

Třetí možností inhibice EGFR je genová terapie vektorem nesoucím dominantně negativní mutantu tohoto receptoru. Tato metoda, popsaná v experimentech a zkoumaná v klinických studiích, užívá adenovirového vektoru s mutantou označenou jako EGFR-CD553. Tato mutanta postrádá kompletní cytoplazmatickou doménu o 553 aminokyselinách a nepřevádí tudíž žádnou transformační nebo proliferační aktivitu (Kashles et al. 1991; Redemann et al. 1992). Vzniklé dominantně negativní EGFR uplatňují svou aktivitu také na proteinové úrovni, formováním nefunkčních receptorových komplexů s ostatními receptory z rodiny ErbB (Bowers et al. 2001; Lammering et al. 2001).

Jako doposud poslední popsanou možností inhibice EGFR jsou vakcíny zacílené na tento receptor, zkoumané zejména u NSCLC. Jeden ze způsobů vakcinace spočívá ve využití ligandu EGF napojeného na nosný protein tak, aby se zabránilo navázání ligandu na receptor díky indukci protilátek s aktivitou proti EGF. Kubánský výzkumný tým léčil přes 100 pacientů s pokročilým NSCLC, z nichž si více než 60% vytvořilo protilátky proti EGF. Pacienti s vysokým titrem protilátek vykazovali lepší přežití než jedinci s nízkým titrem. Na výsledky randomizované studie fáze II se ještě čeká (Crombet et al. 2004; Gonzalez et al. 2003).

3.2.8. Inhibice EGFR v radioterapii

Od cílené inhibice EGFR probíhající současně s radioterapií lze očekávat synergický účinek (Schmidt-Ulrich et al. 2000; Harari et al. 2001). Radioterapie navíc představuje klíčovou léčbu u mnoha epiteliálních nádorů. Modulace funkce EGFR jako strategie ovlivnění léčebného efektu radioterapie tak v současnosti nabývá na důležitosti (Lammering 2005; Zips et al. 2008). Význam kombinace cílené biologické léčby a radioterapie navíc podporuje nezvratný fakt, že samotná biologická léčba u solidních nádorů obvykle nedokáže přinést definitivní kurativní efekt. Naopak samotná radioterapie sice představuje vysoce účinnou metodu k dosažení eradikace klonogenních nádorových populací, avšak je známo, že rekurence nádoru často vzniká jen z jedné či několika málo přeživších klonogenních buněk (Baumann et al. 1990; Steel 2002). Pokud by novodobá biologická léčba dokázala zničit byť jen omezený počet klonogenů, mohla by být její kombinace s radioterapií dostačující k signifikantnímu zvýšení lokální kontroly onemocnění. Ke stejnému výsledku by mohl vést i samotný senzitivizační efekt biologické léčby k radioterapii.

Jako první byla v průběhu radioterapie zkoumána inhibice EGFR na receptorové úrovni. Autoři studie, která zkoumala lokální iradiaci lidských nádorových xenograftů (A431) implantovaných do myši za současné aplikace IMC-C225, popsali 1.6x násobné zvýšení radiosenzitivity po aplikaci jedné dávky IMC-C225 a 3.6x násobné zvýšení radiosenzitivity po aplikaci tří dávek této protilátky s časovým odstupem (Milas et al. 2000). Aplikace IMC-C225 záhy po iradiaci zlepšila lokální kontrolu nádoru také v další studii u nádorové linii A431 (Krause et al. 2003) a dále také ve studii u nádorové linie FaDu (Nasu et al. 2001). Zatímco linie A431 vykazuje vysokou overexpresi EGFR (Wrann et al. 1979) a značnou závislost postradiačního antiproliferativního účinku na počtu aplikací IMC-C225, u FaDu linie je tento efekt vyjádřen v mnohem menší míře. Další autoři současně publikovali preklinické studie, potvrzující signifikantní zvýšení klinického účinku kombinace radioterapie a IMC-C225 u širokého spektra epiteliálních lidských nádorových xenograftů (Huang et al. 1999; Huang et al. 2000; Raben et al. 1999; Saleh et al. 1999; Bianco et al. 2000; Balaban et al. 1996; Buchsbaum et al. 2002). Zajímavé je zjištění, že interakce mezi IMC-C225 a iradiací je významnější v *in vivo* studiích, než bylo předpokládáno z výsledků *in vitro* testů. *In vivo* tak nejspíše sehrávají roli i jiné faktory než pouhá inhibice proliferačního růstu (Harari et al. 2001; Nasu et al. 2001). Mezi tyto faktory nejspíše patří IMC-C225 indukovaná inhibice reparace poškození DNA, zvýšení radiosenzitivity vyplývající ze specifického narušení distribuce fází buněčného cyklu, posílení radiací indukované apoptózy, inhibice angiogeneze, nebo snížení migrační a invazivní kapacity nádoru (Harari et al. 2002). Během výzkumu se ukázalo, že EGFR ovlivňuje molekulu DNA-dependentní proteinkinázy (Bandyopadhyay et al. 1998), a že léčba IMC-C225 může zapříčinit její redistribuci z jádra do cytosolu, což má za následek snížení reparace poškozené DNA (Huang et al. 2000). Navíc aplikace IMC-C225 signifikantně snižuje tvorbu nových cév v místě inokulace nádorových buněk linie A431, což

svědčí o jejím přímém inhibičním vlivu na nádorovou angiogenezi, nejspíše na podkladě inhibice mRNA a proteosyntézy angiogenních faktorů (Milas et al. 2000; Perrotte et al. 1999).

Inhibitory tyrozinkinázy

V kombinaci s radioterapií byly zkoumány také nízkomolekulární inhibitory cytoplasmatické tyrosinkinázy EGFR, nejvíce pak molekuly ZD-1839, OSI-774 a CI-1033. Stejně jako u IMC-C225 existují preklinická data o zvýšení radiosenzitivity v *in vitro* a *in vivo* studiích také pro ZD-1839 a CI-1033 (Huang et al. 2002; Raben et al. 2001; Rao et al. 2000; She et al. 2003). ZD-1839 je perorálně dostupný inhibitor EGFR, jehož schopnost zvýšit cytotoxicitu ionizujícího záření již byla prokázána u širokého spektra nádorů, včetně karcinomu plic, pankreatu, tračníku, glioblastomu a karcinomu hlavy a krku (Williams et al. 2002; Raben et al. 2004; Stea et al. 2002; Solomon et al. 2002). U myších xenograftů lidského karcinomu tračníku přinesla kombinace ZD-1839 a radioterapie 1.6x vyšší účinnost léčby než u radioterapie samotné (Williams et al. 2002). Kombinace ZD-1839 a radioterapie navíc prokázala synergistický účinek na inhibici buněčného růstu u lidských dlaždicobuněčných karcinomů (Huang et al. 2002). Nedávno publikovaná čínská studie prokázala zvýšení radiosenzitivity *in vitro* také u karcinomu žaludku, které byly před zahájením radioterapie exponovány molekule gefitinibu (Cao et al. 2007).

CI-1033 inhibuje tyrozinkinázovou aktivitu všech čtyř členů rodiny ErbB receptorů. Preklinické studie u ErbB overexprimujících karcinomů prsu prokázaly supraaditivní efekt kombinace CI-1033 s frakcionovanou radioterapií (Rao et al. 2000).

Další *in vitro* studie potvrdila zvýšení citlivosti nádorové tkáně pankreatu k chemoradioterapii založené na gemcitabinu po přidání molekuly OSI-774 (erlotinib) (Morgan et al. 2008). Pravděpodobně je jen otázkou času, kdy klinická studie prokáže zvýšení radiokurability karcinomů pankreatu při kombinaci právě s touto molekulou, která již našla své

klinické uplanění v kombinaci s výše zmíněným gemcitabinem v paliativní léčbě karcinomu pankreatu.

Genová terapie

Třetím zkoušeným postupem inhibice aktivity EGFR je modifikace genomu nádorových buněk za použití vektoru dominantně negativního EGFR, který je zprostředkován adenovirovým genovým transferem. Overexprese geneticky upravené molekuly EGFR-CD533 narušuje funkci celého systému ErbB tyrozinkináz skrze proteinové interakce, čímž je schopna funkční inhibice radiací aktivované ErbB signalizace (Bowers et al. 2001; Lammering et al. 2001; Contessa et al. 2002). Tento mechanismus genové terapie prokazatelně zvyšuje radiosenzitivitu u různých typů lidských nádorů, nezávisle na značné odlišnosti exprese EGFR a jiných ErbB receptorů (Lammering et al. 2001). Navíc bylo *in vitro* prokázáno, že užití EGFR-CD533 blokuje radiací indukovanou signalizaci a snižuje přežívání klonogenních nádorových buněk u xenograftů lidského karcinomu prsu (MDA-MB-231). Transdukce nádorů cestou EGFR-CD533 přináší 1.85x zvýšenou radiosenzitivitu ve srovnání s kontrolními nádory. Zajímavé je, že toto zvýšení cytotoxicity ionizujícího záření vykazují zejména nádory s nízkou počáteční expresí EGFR. Navzdory prokazatelnému přínosu EGFR-CD533 naráží tato léčba na úskalí techniky genové terapie, zejména na nízkou úspěšnost infekce vektorovým přenašečem.

Klinický přínos inhibice EGFR v radioterapii

Doposud prezentované preklinické poznatky prokazují racionalitu inhibice EGFR v radioterapii, avšak pouze klinická data mohou prokázat její nezvratný léčebný prospěch.

První klinické studie sledující interakci modulátorů EGFR s radioterapií se začaly objevovat teprve v posledních letech. U mnoha molekul, včetně IMC-C225 a ZD-1839, již byla prokázána dobrá tolerance při kombinaci s radioterapií nebo chemoradioterapií (Cohen et al. 2000) a slibné výsledky této léčby již byly publikována pro karcinomy hlavy a krku a pro NSCLC (Robert et al. 2001; Vokes et al. 2003).

Prozatím nejvýznamnější a nejslibnější výsledky přinesla mezinárodní randomizovaná studie srovnávající samostatnou radioterapii a radioterapii v kombinaci s týdenní aplikací cetuximabu v radikální léčbě lokálně pokročilých dlaždicobuněčných karcinomů hlavy a krku (Bonner et al. 2006). Do obou ramen bylo zařazeno více než 200 pacientů a u obou skupin byla hodnocena celkově dobrá tolerance léčby. U nemocných s kombinovanou léčbou bylo prokázáno prodloužení trvání lokoregionální kontroly onemocnění tak i signifikantní prodloužení celkového přežití. Přidáním cetuximabu bylo dosaženo snížení rizika progresse onemocnění a smrti až o 30%. Až na akneiformní kožní vyrážku, která je při léčbě cetuximabem častější, nebyl mezi skupinami nalezen žádný signifikantní rozdíl v akutní toxicitě. Tato studie zcela určitě představuje určitý milník v kombinaci radioterapie a biologické léčby.

Ve strategické léčbě inhibitory EGFR zůstává přes veškerý vývoj řada otázek. Neví se například, zda tato léčba působí pouze na nádory nadměrně exprimující EGFR, navíc doposud neznáme nejlepší metodu ani vhodný systém hodnocení exprese tohoto receptoru. Také není prozkoumána účinnost radioterapie u nádorů exprimujících EGFR s přítomností aktivační mutace K-ras. Také není jasné, zda je zapotřebí kompletní inaktivace EGFR ke zprostředkování maximální radiosenzibilizace nádoru, či zda zde hrají roli interakce EGFR z jinými z členů ErbB event. jiné receptorové rodiny. Je zapotřebí dalších preklinických studií k došetření přesné biologické úlohy EGFR v radioterapii. Nadále také zůstává úkolem vědců, rozpoznat optimální dávky a frekvenci podávání modulátorů EGFR v kombinaci s frakcionovanou radioterapií, aby bylo dosaženo maximálního synergního účinku.

3.2.9. Radioterapie a proteiny p53, p21 a p16

Vzhledem k tomu že léčebný účinek radioterapie závisí především na apoptóze nádorových buněk indukované poškozením molekuly DNA ionizujícím zářením (Lowe et al. 1993), může aktivita regulátorů buněčného cyklu a apoptózy predikovat citlivost nádorů k radioterapii u rozličných histologických typů malignit.

Protein p53 je známý jako „molekulární strážník“, sloužící jako transkripční faktor, který reguluje geny zodpovědné za nádorovou diferenciaci. Ztráta nádorově supresorové funkce p53 hraje významnou roli v kancerogenezi mnoha typů nádorů (Finlay et al. 1989). Gen p53 je lokalizovaný na krátkém raménku chromozomu 17 a jeho proteinový produkt hraje významnou roli v regulaci buněčného cyklu a apoptózy. Jeho aktivita je významná zejména po působení faktorů poškozujících buněčnou DNA (Kastan et al. 1995). Ztráta funkce p53 usnadňuje přeměnu zdravé buňky v nádorovou, ovlivňuje citlivost nádorové buňky k chemoterapii i radioterapii, a působí v nádorových buňkách další genovou nestabilitu (Kastan et al. 1991).

Protein p21 patří do skupiny inhibitorů cyklin dependentních kináz. Jeho transkripce je aktivovaná proteinem p53, zejména jako odpověď na genotoxický stres. Protein p53 prostřednictvím proteinu p21 navozuje zablokování buněčného cyklu ve fází G1 a tím zabraňuje replikaci poškozené DNA. Ztráta funkce p21 u lidských nádorových buněk vede selhání kontroly buněčného cyklu, indukci polyploidity a navození apoptózy jako odezvy na poškození DNA (Waldman et al. 1996). Publikovaná data naznačují, že ztráta funkce p21 může vyústit ve zvýšenou citlivost nádorových buněk k ionizujícímu záření také mechanismem nezávislým na apoptóze (Wouters et al. 1997).

Protein p16, vznikající transkripcí tumor supresorového genu, kontroluje vstup buňky do S fáze buněčného cyklu prostřednictvím inhibice CDK-4 zprostředkované fosforylace proteinu

RB. U různých typů malignit může dojít k narušení různé etáže cyklin D1/p16/RB cesty. Abnormní exprese p16 může postihnout nejen biologické vlastnosti nádoru, ale i jeho citlivost k léčbě poškozující DNA, jako je například radioterapie.

4. SOUBOR PACIENTŮ A POUŽITÁ METODIKA

4.1. Soubor pacientů

V období mezi lednem 1999 a prosincem 2006 bylo na klinice onkologie a radioterapie Fakultní nemocnice v Hradci Králové léčeno předoperační chemoradioterapií celkem 58 pacientů s histologicky verifikovaným lokálně pokročilým adenokarcinomem žaludku, u kterých běžná stagingová vyšetření neprokázala přítomnost vzdálených metastáz. Jako součást rutinních stagingových vyšetření podstoupili nemocní před zahájením terapie následující vyšetření: celkové fyzikální vyšetření, esofagoduodenoskopio s endoskopickou ultrasonografií (EUS), rentgenové vyšetření horního gastrointestinálního traktu s baryovou kontrastní látkou, CT břicha a UZ jater, rentgenové vyšetření plic, základní hematologické a biochemické vyšetření krve včetně hladin CEA. Histologická diagnóza karcinomu žaludku byla stanovena z endoskopické biopsie nádoru, klinické T a N stadium bylo určeno endosonograficky.

U 22 pacientů nebylo možné vyšetřit nádorovou tkáň imunohistochemicky, vzhledem k insuficientnímu vzorku biopsie. Proto bylo do studie zařazeno pouze 36 pacientů s imunohistochemicky vyšetřitelným předléčebným vzorkem nádoru. V souboru bylo 29 mužů a 7 žen, s průměrným věkem v době diagnózy 61 let (28-80 let). Nádory se nacházely převážně v oblasti žaludečního těla (17 pacientů), dále v oblasti kardie žaludku (11 pacientů), antra pyloru (5 pacientů) a fundu žaludku (3 pacienti). Stadium nádoru v době diagnózy bylo hodnoceno dle TNM klasifikace zhoubných novotvarů (UICC 2002, 6. vydání, česká verze z roku 2004). Ve skupině nemocných zařazených do studie byla zaznamenána stadia T2 (10 pacientů), T3 (20 pacientů) a T4 (6 pacientů). Pouze 5 nemocných nemělo v době stanovení diagnózy známky šíření nádoru do regionálních uzlin, hodnoceno endosonograficky a dle CT břicha. Zbýlých 31 nemocných bylo klasifikováno jako stadium N1; žádný pacient nebyl klasifikován jako N2 stadium. Rozdělení klinických stadií dle TNM klasifikace tedy činilo:

stadium IB (2 pacienti), stadium II (11 pacientů), stadium IIIA (17 pacientů) a stadium IV (6 pacientů). Histologicky se jednalo ve všech případech o adenokarcinom, se stupni nádorové diferenciace: stupeň 1 (2 případy), stupeň 2 (14 případů) a stupeň 3 (20 případů).

4.2. Léčba

Radioterapie

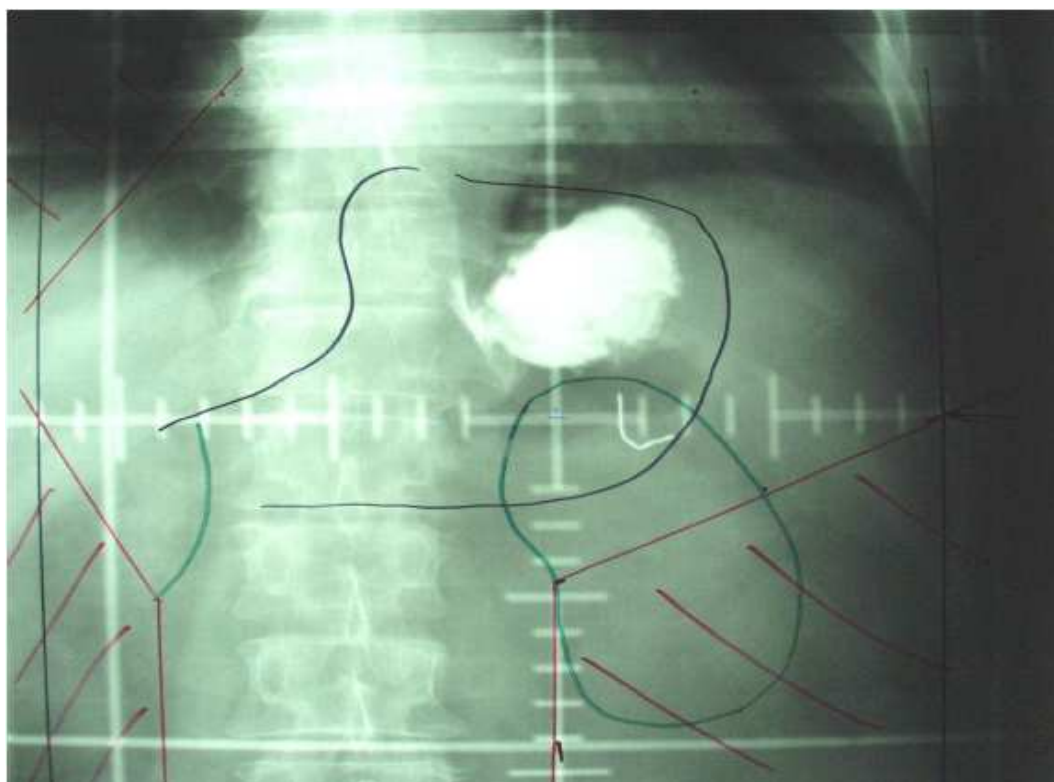
Pacienti byli léčeni následující technikou ozařování: supinační poloha na zádech, ruce podél těla, případně s válečkem pod kolena k vyrovnání lumbální lordózy; rentgenový simulační snímek po per os podání baryové kontrastní látky na rentgenovém simulátoru Ximatron CX (Varian Medical Systems Inc., Palo Alto, USA). Pro definici plánovacích cílových objemů a rizikových orgánů byla použita data z výpočetní tomografie (Siemens Somatom DR Plus). K plánování byly použity plánovací systémy CadPlan Treatment Planning System (Varian Medical Systems Inc., Palo Alto, USA) a novější plánovací systém Eclipse (Varian Medical Systems Inc., Palo Alto, USA). Objemy GTV, CTV a PTV byly v plánovacím systému definovány v souladu s doporučeními ICRU 50 (International Commission on Radiation Units and Measurements Report 50 Recommendation).

Objem CTV zahrnoval celý žaludek s celou viditelnou a případně i perigastrickou propagací tumoru (= GTV), včetně spádových lymfatických uzlin (uzliny podél velké a malé křivky žaludku; uzliny pankreatickoduodenální; splenické; suprasplenické; uzliny v oblasti porta hepatis; přiléhající paraaortální uzliny) s minimálním lemem 1 cm k pokrytí případného mikroskopického šíření onemocnění. V případě nádorů uložených v oblasti kardií žaludku zahrnoval CTV také abdominální úsek jícnu a spádové lymfatické uzliny podél truncus coeliacus; arteria gastrica sinistra; dolní mediastinální a paraezofageální. Objem PTV zahrnoval oblast celého CTV s lemem 1 cm zajišťujícím případné nepřesnosti v nastavení.

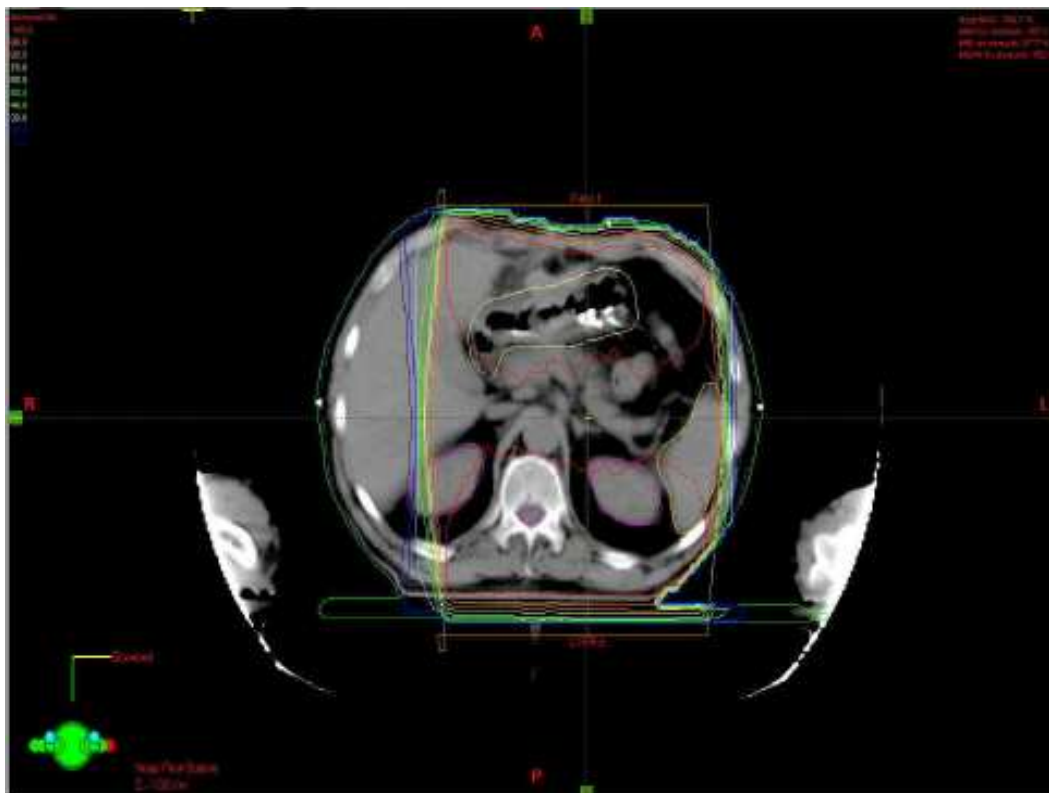
Kromě cílových objemů byly konturovány také rizikové orgány s příslušnými tolerančními dávkami: ledviny (20 Gy); játra (30 Gy); mícha (45 Gy); tenké střevo (45 Gy).

Samotná radioterapie byla u všech nemocných zajištěna dvěma konformními poli (AP, PA) s individuálním tvarováním polí pomocí individuálně zhotovených bloků či dynamického vícelamelového kolimátoru (MLC). Ozařovací technika byla modifikována dle potřeby tak, aby byla ušetřena tkáň alespoň jedné celé funkční ledviny. Funkce ledvin byla před zahájením léčby hodnocena pomocí dynamické scintigrafie ledvin. Předepsaná dávka záření byla aplikována lineárním urychlovačem Clinac 600C (Varian Medical Systems Inc., Palo Alto, USA) s dynamickým vícelamelovým kolimátorem, nebo lineárním urychlovačem Clinac 2100C (Varian Medical Systems Inc., Palo Alto, USA), vždy za použití fotonů o energii brzděného záření 6 - 15 MV konvenční frakcionací, tj. 1.8 - 2 Gy na frakci s aplikací pěti frakcí záření týdně (pondělí až pátek).

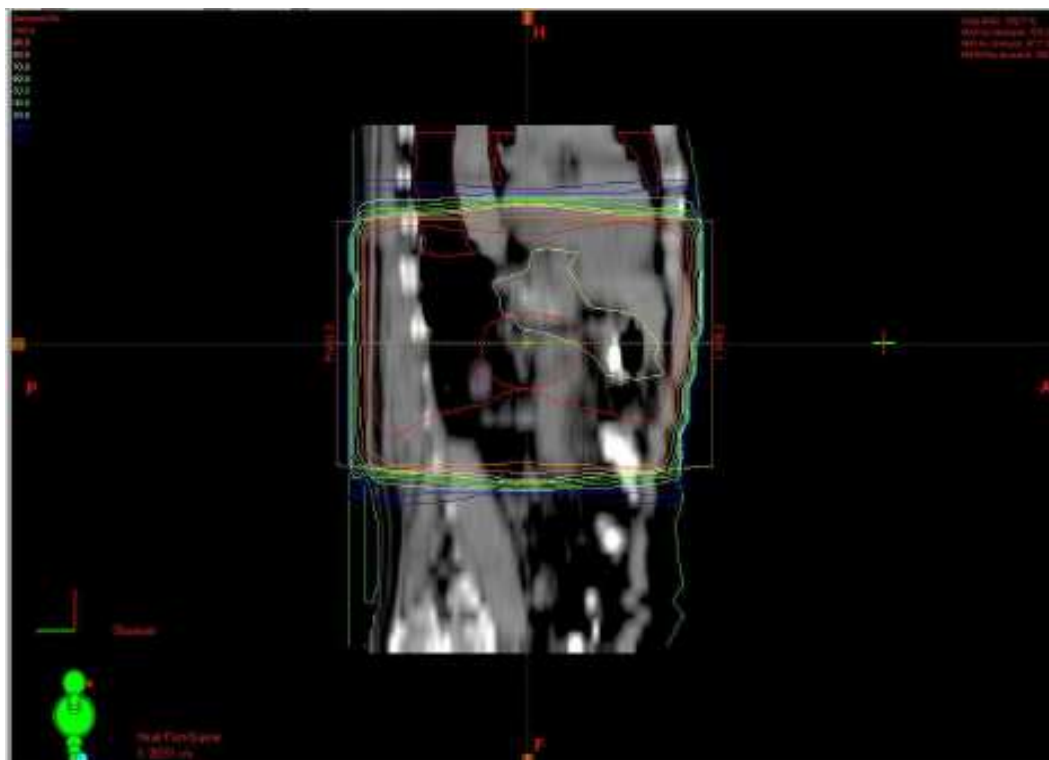
Přesnost nastavení byla kontrolována alespoň jednou týdně pomocí systému portálového zobrazení. Tolerovaná chyba nepřesnosti nastavení byla 5 mm v každém směru.



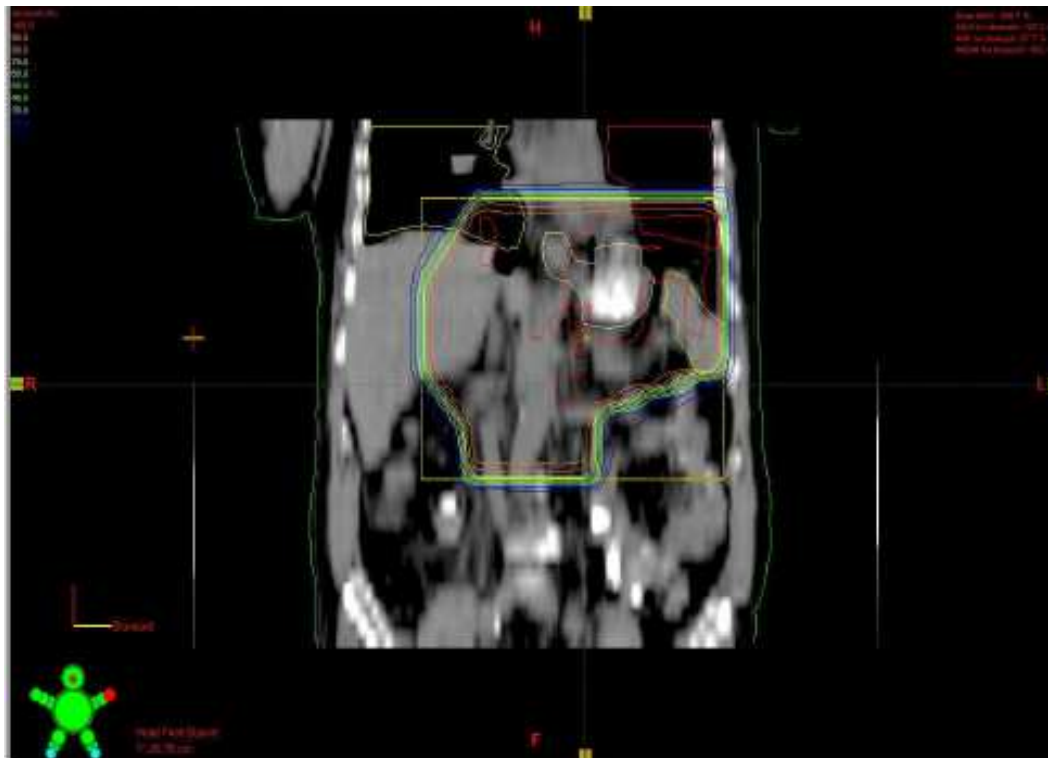
Obrázek 4. Simulační snímek předožadního pole při ozařování oblasti žaludku (zakreslen žaludek, ledviny, šrafovaně jsou znázorněny vykrývací bloky).



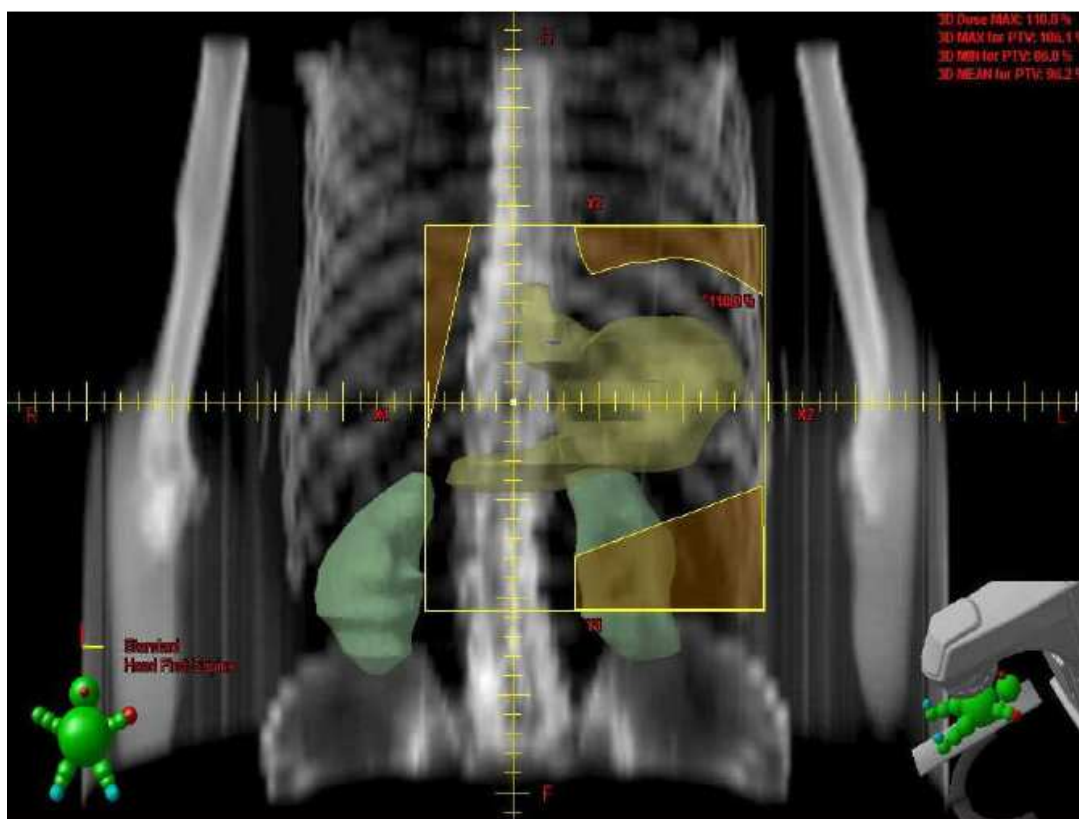
Obrázek 5. Transverzální isodózní plán na CT řezech (15 MV, AP/PA).



Obrázek 6. Sagitální isodózní plán na CT řezech (15 MV, AP/PA).



Obrázek 7. Frontální isodózní plán na CT řezech (15 MV, AP/PA).



Obrázek 8. Virtuální zobrazení předozadního pole s digitálně rekonstruovaným obrazem.

Jedenáct pacientů bylo léčeno celkovou dávkou záření 45 Gy (25 frakcí po 1.8 Gy v průběhu pěti týdnů); čtrnáct pacientů obdrželo dávku 40 Gy (20 frakcí po 2 Gy v průběhu čtyř týdnů); a jedenáct pacientů obdrželo dávku 30 Gy (15 frakcí po 2 Gy v průběhu tří týdnů). Rozdíly v aplikované dávce záření byly způsobeny následujícími faktory: pacienti kteří obdrželi dávku 30 Gy byli léčeni dříve, než byly publikována výsledky studie fáze III Intergroup Trial (INT 0116), která prokázala dobrou toleranci a dobré výsledky adjuvantní chemoradioterapie žaludku s aplikací dávky 45 Gy (Macdonald et al. 2001). Pacienti, kteří obdrželi dávku 40 Gy měli karcinom kardie nebo fundu žaludku, u kterých díky proximálnímu uložení nádoru poblíž páteře nebylo možné aplikovat plných 45 Gy za současného dodržení toleranční dávky na míchu při konvenční AP/PA technice.

Chemoterapie

Konkomitantní chemoterapie byla u všech 36-ti pacientů založena na kontinuální infuzi 5-fluorouracilu 200 mg/m²/den, aplikovaného v průběhu celé radioterapie, vždy kontinuálně od pondělí do pátku s přestávkou v období víkendu. Kontinuální chemoterapie byla technicky zajištěna centrálním žilním přístupem v podobě žilní kanyly či žilního port-systému a přenosné lékové pumpy. Dvacet-čtyři pacientů v dobrém celkovém stavu (performance status < 2 dle WHO) a s dobrými ledvinnými funkcemi podstoupili navíc aplikaci cisplatiny 30 mg/m² D1 s týdenními odstupy po dobu zevní radioterapie. Osm z těchto pacientů, kteří shodně dostali 30 Gy iradiace, dostalo navíc paclitaxel 60 mg/m² D1 s týdenními odstupy.

U pacientů, kteří dostali 40-45 Gy radioterapie, proběhla kompletní série konkomitantní chemoterapie společně se zevní iradiací. U pacientů s 30 Gy ozáření byla chemoterapie aplikována ve dvou identických sériích; první proběhla indukčně 3 týdny před zahájením radioterapie a druhá pak současně s radioterapií.

Všichni nemocní byli léčeni za hospitalizace na lůžkovém oddělení kliniky onkologie a radioterapie ve Fakultní nemocnici v Hradci Králové. Hodnocení tolerance léčby probíhalo za denní kontroly stavu nemocného ošetřujícím lékařem; pacientova hmotnost a laboratorní kontroly krevního obrazu a základní biochemie byly měřeny vždy alespoň jednou týdně.

Všichni nemocní podstoupili konkomitantní chemoradioterapii v plánovaném rozsahu a tolerovali ji bez větších obtíží. Podpůrná léčba zahrnovala profylaktické a symptomatické podávání setronových antiemetik; případné dyspepsie horního typu byly tlumeny inhibitory protonové pumpy a metoklopramidem; každou týdenní potenciaci cisplatinou předcházela předepsaná prehydratace s následnou forsírovanou diurézou manitolem a 24-hodinovým sledováním příjmu a výdeje tekutin; případný nutriční event. minerálový deficit pacientů byl hrazen sippingem, event. parenterální cestou při významnějším deficitu.

Chirurgický zákrok

Chirurgická léčba následovala 4-6 týdnů po ukončení neoadjuvantní chemoradioterapie. Typ chirurgického zákroku závisel na lokalizaci a rozsahu primárního nádoru: 11 pacientů podstoupilo subtotální gastrektomii; 8 pacientů podstoupilo totální gastrektomii; 5 pacientů mělo proximální gastrektomii; a 12 pacientů podstoupilo pouze explorativní laparotomii s nálezem inoperabilního nádorového procesu.

En bloc disekce přilehlých orgánů byla provedena v případě podezření na jejich infiltraci nádorem. Součástí operace byla disekce dostupných perigastrických lymfatických uzlin. Extenzivní disekce lymfatických uzlin nebyla rutinně prováděna.

Tabulka 5. Shrnutí léčby nemocných (n = 36).

Dávka radioterapie
<ul style="list-style-type: none"> • 30Gy (15 frakcí/3 týdny): 11 pacientů (31%)
<ul style="list-style-type: none"> • 40Gy (20 frakcí/4 týdny): 14 pacientů (38%)
<ul style="list-style-type: none"> • 45Gy (25 frakcí/5 týdnů): 11 pacientů (31%)
Konkomitantní chemoterapie
<ul style="list-style-type: none"> • Kontinuální 5-fluorouracil: 36 pacientů (100%)
<ul style="list-style-type: none"> • Týdenní cisplatina: 24 pacientů (67%)
<ul style="list-style-type: none"> • Týdenní paclitaxel: 8 pacientů (22%)
Chirurgická léčba
<ul style="list-style-type: none"> • Subtotální gastrektomie: 11 pacientů (31%)
<ul style="list-style-type: none"> • Totální gastrektomie: 8 pacientů (22%)
<ul style="list-style-type: none"> • Proximální gastrektomie: 5 pacientů (14%)
<ul style="list-style-type: none"> • Inoperabilní nádor: 12 pacientů (33%)

4.3. Hodnocení léčebné odpovědi

Po operačním zákroku a histopatologické studii resekovaného materiálu byl stanoven patologický staging onemocnění dle UICC kritérií (International Union Against Cancer, TNM klasifikace zhoubných novotvarů, 6. vydání z roku 2002, česká verze z roku 2004). R0 resekce byla definována jako odstranění celého nádoru s alespoň 1 mm čistými resekčními okraji. Pozitivní léčebná odpověď byla definována jako redukce T-stadia nádoru alespoň o jeden stupeň, a/nebo nález intenzivních regresivních změn nádorové tkáně během histopatologického hodnocení. Patologická kompletní remise (pCR) byla definována jako absence nádoru v resekovaném materiálu. Perioperační nález inoperabilního tumoru po proběhlé chemoradioterapii byl hodnocen jako negativní léčebná odpověď.

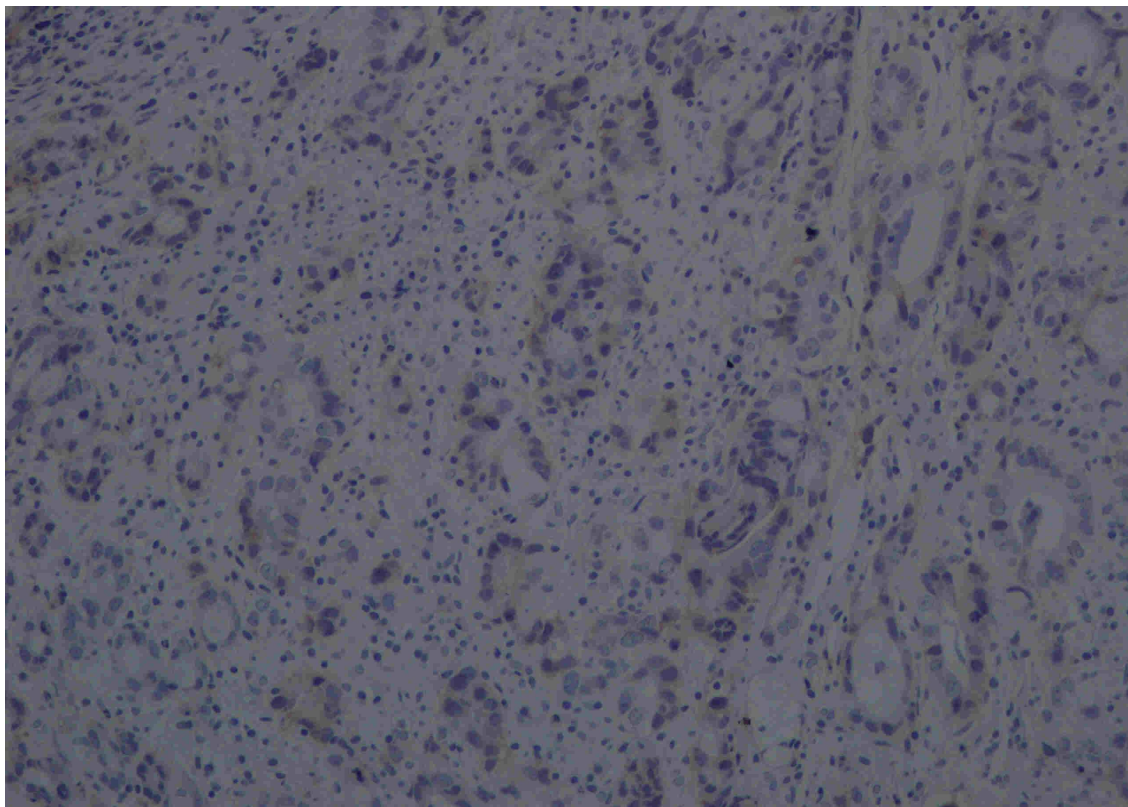
4.4. Laboratorní stanovení EGFR

Rutině fixované parafinové bloky předléčebných nádorových biopsií byly mikrotomem nakrájeny na řezy o tloušťce 3 μm . Řezy tkáňových bloků byly deparafinovány xylenem a následně rehydrovány. Pro optimalizaci antigenní prezentace byla tkáň proteolyticky natrávena proteinázou K. Endogenní peroxidázová aktivita byla zablokována pomocí roztoku 3% peroxidu. Tkáňové řezy byly následně inkubovány 30 minut při pokojové teplotě v médiu s monoklonální myší antihumánní IgG1 protilátkou proti EGFR (EGFR pharmDxTM, K1492, DakoCytomation, Glostrup, Dánsko). Následně byl vzorek inkubován dalších 30 minut se značeným HRP polymerem. Po 10-ti minutách inkubace s roztokem barviva DAB+ byl celý systém vizualizován a následně kontrastně obarven hematoxilinem. Jako negativní kontrola exprese EGFR byly použity EGFR pharmDx kontrolní preparáty dodávané společně s aplikovanou monoklonální protilátkou. Tyto formalinem fixované parafinové papreparáty obsahovaly lidské buněčné linie se střední a nízkou expresí EGFR. Hotové preparáty byly nakonec odečteny světelnou mikroskopií.

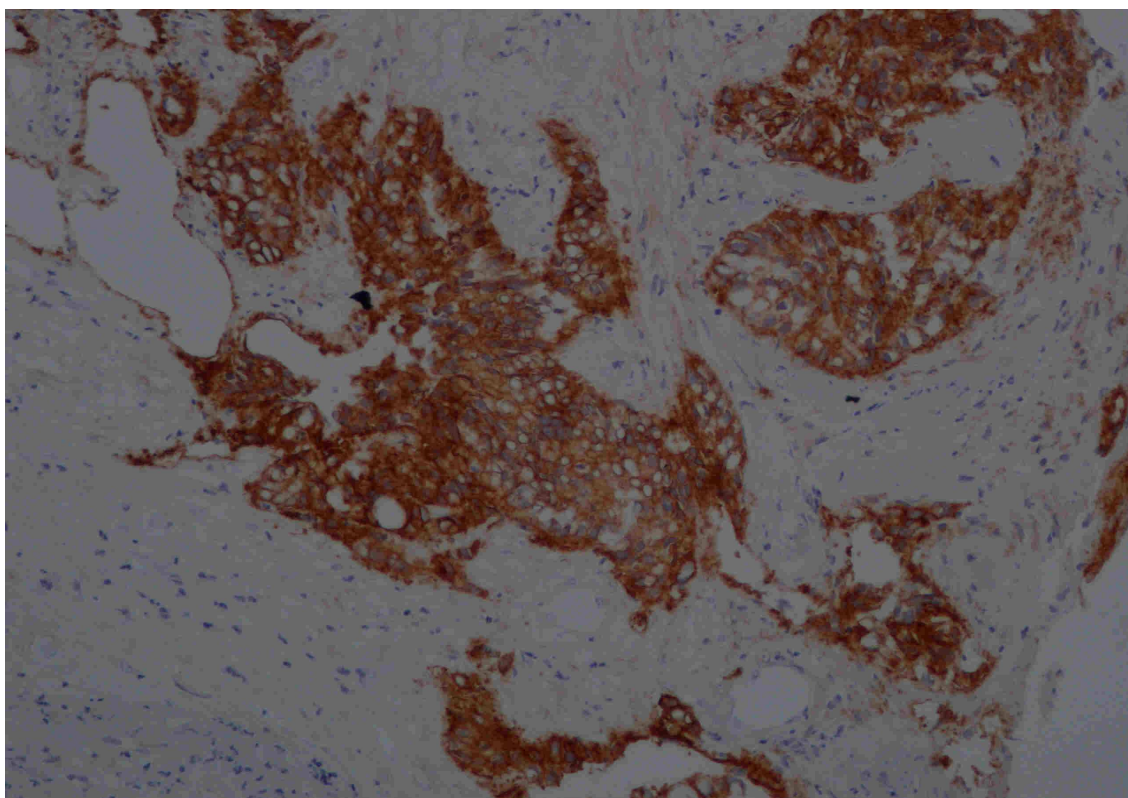
4.5. Hodnocení imunohistochemické exprese EGFR

U všech preparátů byla exprese EGFR hodnocena zkušeným histopatologem, který nebyl obeznámen s výsledky léčebné odpovědi nádorů k předoperační chemoradioterapii.

Hladina cytoplazmatické a membránové exprese EGFR byla hodnocena semikvantitativně za použití imunoreaktivního skórovacího systému (IRS). Hodnota IRS (0-7) byla získána součtem koeficientu intenzity barvení nádorových buněk (0 = žádná, 1 = slabá; 2 = střední; 3 = silná intenzita) a koeficientu rozsahu barvení stanoveného procentem barvicích se nádorových buněk (0 = < 5%; 1 = 6 až 25%; 2 = 26 až 50%; 3 = 51 až 75%; 4 = 76 až 100% buněk). Hodnota IRS 0-3 byla definována jako nízká exprese EGFR, hodnota IRS 4-7 jako vysoká exprese EGFR. Stejný skórovací systém hodnocení imunohistochemické exprese EGFR byl publikován již dříve (Kim et al. 2006).



Obrázek 9. Negativní exprese EGFR u tubulárního adenocarcinomu žaludku (200x, IRS 0).



Obrázek 10. Pozitivní exprese EGFR u tubulárního adenocarcinomu žaludku (200x, IRS 7).

4.6. Statistická analýza

Korelace mezi silou exprese EGFR a klinickými/histopatologickými charakteristikami pacientů a nádorů byla analyzována za pomoci chí-kvadrátového testu. Fisherův exaktní test ve čtyřpolní tabulce byl použit, pokud počet sledovaných případů klesl pod 10. Prediktivní hodnota pohlaví, lokalizace nádoru, nádorového stadia, nádorové diference, stavu lymfatických uzlin, dávky radioterapie, aplikace cisplatin a stavu exprese EGFR na léčebnou odpověď k chemoradioterapii byla hodnocena za pomoci multivariantní stupňovité logistické regrese. Všechny statistické testy byly hodnoceny na hladině významnosti 5%. Veškerá statistická analýza byla provedena statistickým softwarem NCSS 2004 (NCSS, Keyville, Utah, USA).

5. VÝSLEDKY

Po absolvování předoperační chemoradioterapie podstoupilo 24 pacientů chirurgický léčebný zákrok. Sedmnáct pacientů (47%) mělo pozitivní léčebnou odpověď k chemoradioterapii: 8 pacientů (22%) s nálezem patologické kompletní remise a 9 pacientů (25%) s nálezem downsatgingu tumoru. Celkem 20 pacientů (56 %) podstoupilo R0 radikální resekci. U 12-ti pacientů (33%) proběhla pouze explorativní laparotomie s nálezem inoperabilního tumoru. Negativní patologický uzlinový nález byl hodnocen u 11 z 31 pacientů s počátečním N+ stadiem.

Tabulka 6. Přehled klinických a patologických stadií onemocnění ($n = 36$).

Klinické stadium	n	Patologické stadium	n
cT2cN0	2	pCR	8
cT2cN1	8	pT1pN0	2
cT3cN0	3	pT2pN0	4
cT3cN1	17	pT2pN1	7
cT4cN1	6	pT3pN0	2
		pT4pN1	1
		Inoperabilní	12

Vysoká exprese EGFR (IRS 4 – 7) byla nalezena v 8 biopsiích, frekvence vysoké exprese EGFR v souboru tedy činila 22%. Zbylých 28 biopsií mělo nízkou expresi EGFR (IRS 0 – 3). Nebyla prokázán žádný signifikantní prognostický vliv pohlaví, lokalizace nádoru, nádorového stadia, nádorové diferenciace, stavu lymfatických uzlin, dávky radioterapie, ani aplikace cisplatinu na léčebnou odpověď nádorů k chemoradioterapii. Multivariantní logistická regresní analýza prokázala, že jediný signifikantně prediktivní vliv na celkovou léčebnou odpověď nádorů k chemoradioterapii měla míra exprese EGFR v předléčebné nádorové biopsii ($p = 0.015$, $OR = 0.06$, $95\% CI = 0.01 - 0.3$). Další výsledky prokázaly

signifikantní asociaci mezi vysokou expresí EGFR a negativní léčebnou odpovědí nádorů k chemoradioterapii. Pozitivní léčebná odpověď byla prokázána u 57% (16/28) pacientů s nízkou expresí EGFR a u 13% (1/8) pacientů s vysokou expresí EGFR ($p = 0.044$). U žádného z osmi pacientů s vysokou expresí EGFR nebyla nalezena patologická kompletní remise, ve srovnání s 8/28 (29%) pacientů s nízkou expresí EGFR ($p = 0.16$).

Tabulka 7. Výsledky imunohistochemie EGFR (n = 36).

Intenzita barvení nádorových buněk	
•	0 (žádná): 16 pacientů (44%)
•	1 (slabá): 12 pacientů (33%)
•	2 (střední): 5 pacientů (14%)
•	3 (silná): 3 pacienti (9%)
Rozsah barvení nádorových buněk	
•	0 (<5%): 19 pacientů (53%)
•	1 (6–25%): 7 pacientů (19%)
•	2 (26–50%): 2 pacienti (6%)
•	3 (51–75%): 4 pacienti (11%)
•	4 (76–100%): 4 pacienti (11%)
Výsledná exprese EGFR	
•	Nízká (IRS 0-3): 28 pacientů (78%)
•	Vysoká (IRS 4-7): 8 pacientů (22%)

6. VÝZNAM EXPRESE PROTEINŮ p53, p21 A p16

Jako vedlejší cíl práce byl v předpovídání léčebné odpovědi k předoperační chemoradioterapii u pacientů s lokálně pokročilým karcinomem žaludku zkoumán význam imunohistochemické exprese proteinů p53, p21 a p16. Soubor pacientů, léčba, hodnocení léčebné odpovědi, hodnocení imunohistochemické exprese molekul p53, p21 a p16, jakož i statistická analýza získaných dat byly identické jako v části „soubor pacientů a použítá metodika“ hodnocení vlivu exprese EGFR.

Laboratorní stanovení exprese p53, p21 a p16

Rutině fixované parafinové bloky předléčebných nádorových biopsií žaludku byly mikrotomem nakrájeny na řezy o tloušťce 3 μm . Řezy tkáňových bloků byly deparafinovány xylenem a následně rehydrovány. Tkáňové vzorky nádorových biopsií všech pacientů v souboru obsahovaly dostatečné množství materiálu pro imunohistochemickou analýzu. Všechny tkáňové vzorky byly testovány následujícím panelem protilátek: monoklonální protilátka proti lidské molekule p53 (klon DO-7, DakoCytomation, Glostrup, Dánsko); monoklonální protilátka proti lidské molekule p21^{WAF1/CIP1} (klon, SX118, DakoCytomation, Glostrup, Dánsko), histologický kit CINtecTM p16^{INK4a} (klon E6H4, DakoCytomation, Glostrup, Dánsko). Imunohistochemické barvení proteinů p53, p21 a p16 bylo provedeno přesně podle návodu výrobce. Při odečítání intenzity barvení byly použity příslušné pozitivní a negativní kontrolní preparáty, dodávané výrobcem společně s barvicím kitem. Hladina intenzity nukleární exprese proteinů p53, p21 a p16 byla vyhodnocena semikvantitativně prostřednictvím stejného imunoreaktivního skórovacího systému (tj. IRS hodnota 0-7 bodů) jako při hodnocení exprese EGFR; stejně tak byly nastaveny hranice hodnot IRS, tj. IRS skóre 0-3 značící nízkou expresi a IRS skóre 4-7 značící vysokou expresi sledovaných proteinů.

Výsledky

Vysoká exprese p53 byla nalezena v 15-ti biopsiích (42%), vysoká exprese p21 v 10-ti biopsiích (28%) a vysoká exprese p16 v 7-mi biopsiích (19%). Ostatní biopsie vykazovaly ve zbylých případech nízkou expresi jednotlivě pro konkrétní sledovaný protein.

Tabulka 8. Výsledky imunohistochemie proteinů p53, p21 a p16.

Intenzita barvení nádorových buněk			
	p16	P21	p53
0 (žádná)	18 pacientů (50%)	2 pacienti (5%)	11 pacientů (31%)
1 (slabá)	10 pacientů (28%)	11 pacientů (31%)	13 pacientů (36%)
2 (střední)	2 pacienti (5%)	19 pacientů (53%)	5 pacientů (14%)
3 (silná)	6 pacientů (17%)	4 pacienti (11%)	7 pacientů (19%)
Rozsah barvení nádorových buněk			
	p16	p21	p53
0 (<5%)	24 pacientů (67%)	6 pacientů (17%)	14 pacientů (39%)
1 (6–25%)	5 pacientů (14%)	22 pacientů (61%)	4 pacienti (11%)
2 (26–50%)	2 pacienti (5%)	7 pacientů (19%)	4 pacienti (11%)
3 (51–75%)	1 pacient (3%)	1 pacient (3%)	7 pacientů (19%)
4 (76–100%)	4 pacienti (11%)	0 pacientů (0%)	7 pacientů (19%)
Výsledná exprese proteinů			
	p16	p21	p53
Nízká (IRS 0-3)	7 pacientů (19%)	10 pacientů (28%)	15 pacientů (42%)
Vysoká (IRS 4-7)	29 pacientů (81%)	26 pacientů (72%)	21 pacientů (58%)

Multivariantní logistická analýza neprokázala signifikantní vliv exprese p53 na celkovou léčebnou odpověď (OR = 1.40; 95% CI = 0.163 – 11.90, p = 0.76), ani na výskyt pCR (OR = 1.03; 95% CI = 0.678 – 1.570, p = 0.88); nebyl nalezen žádný signifikantní vliv exprese p21 na celkovou léčebnou odpověď (OR = 0.17; 95% CI = 0.019 – 1.420, p = 0.10), ani na výskyt pCR (OR = 1.68; 95% CI = 0.828 – 3.410, p = 0.15); stejně tak nebyl nalezen signifikantní

vliv exprese p16 na celkovou léčebnou odpověď (OR = 0.63; 95% CI = 0.062 – 6.480, p = 0.70), jakožto ani na výskyt pCR (OR = 0.99; 95% CI = 0.679 – 1.450, p = 0.97). Pozitivní léčebná odpověď k chemoradioterapii byla zaznamenána u 52% (11/21) pacientů s nízkou expresí p53 a u 40% (6/15) pacientů s vysokou expresí p53 (p = 0.21); dále u 54% (14/26) pacientů s nízkou expresí p21 a u 30% (3/10) pacientů s vysokou expresí p21 (p = 0.14); a nakonec u 48% (14/29) pacientů s nízkou expresí p16 a u 43% (3/7) pacientů s vysokou expresí p16 (p = 0.32). Patologická kompletní remise byla nalezena u 19% (4/21) pacientů s nízkou expresí p53 a u 27% (4/15) pacientů s vysokou expresí p53 (p = 0.27); dále u 23% (6/26) pacientů s nízkou expresí p21 a u 20% (2/10) pacientů s vysokou expresí p21 (p = 0.34); a nakonec u 24% (7/29) pacientů s nízkou expresí p16 a u 14% (1/7) pacientů s vysokou expresí p16 (p = 0.36).

7. DISKUSE

Znalost genetických a fenotypových odlišností u karcinomu žaludku by nás mohla vést k cílenějšímu léčebnému postupu, stejně tak jako k přesnější předpovědi nádorové odpovědi k léčbě. V současnosti však u karcinomů žaludku neexistují spolehlivé prediktory léčebné odpovědi k (chemo)radioterapii, které by mohly být snadno vyhodnoceny před zahájením samotné protinádorové terapie. Identifikace faktorů predikujících léčebnou odpověď k předoperační chemoradioterapii se však zdá být nezbytná při výběru pacientů indikovaných k neoadjuvantní léčbě a těch, u kterých by z důvodu nádorové rezistence předoperační léčba vedla pouze k zbytečnému oddálení operace.

Prediktivní a prognostický význam exprese EGFR konkrétně u 511 pacientů s adenokarcinomem žaludku sledovala recentní korejská studie (Kim et al. 2008). Imunohistochemická overexprese EGFR v této studii byla zaznamenána u 27% nádorů žaludku a signifikantně korelovala s vyšším věkem nemocných, vyšším stupněm diferenciaci a vyšším stadiem onemocnění. Multivariantní analýzou byla overexprese EGFR prokázána jako významný nezávislý negativní prognostický faktor. Autoři studie na závěr konstatují, že cílená anti-EGFR terapie může u karcinomu žaludku výhledově znamenat významný pokrok v léčbě tohoto onemocnění. Jiná studie sledující frekvenci výskytu strukturálních abnormalit EGFR u 77 případů karcinomu žaludku zaznamenala pouze velmi nízkou frekvenci mutací tohoto receptoru (2.5%) u karcinomu žaludku, na rozdíl od popisovaných mutací u jiných typů karcinomů, zejména pak NSCLC (Moutinho et al. 2008). Další dostupné údaje o vztahu EGFR k prognóze nemocných s karcinomem žaludku jsou méně přehledné.

V prezentované disertační práci jsem hodnotil význam míry imunohistochemické exprese EGFR v předléčebné biopsii karcinomů žaludku jako prediktivního faktoru léčebné odpovědi k předoperační chemoradioterapii. Dostupná publikovaná data popisují různorodé spektrum (6-86%) overexprese EGFR u lidských karcinomů žaludku (Tokunaga et al. 1995; Takehana et al. 2003; Dragovich et al. 2006; Mammano et al. 2006; Kim et al. 2008). Navzdory nízké

frekvenci výskytu overexprese EGFR (22%) v našem souboru pacientů jsme zjistili signifikantní vztah exprese EGFR a léčebné odpovědi po neoadjuvantní chemoradioterapii. Tyto výsledky jsou konzistentní s výsledky podobných studií u jiných typů nádorů. Podle dostupných informací věřím, že tato studie je první publikovanou prací, která zkoumala prediktivní roli EGFR u pacientů s karcinomem žaludku léčených předoperační chemoradioterapií.

Zjištěné výsledky mohou mít významný klinický dopad na léčbu nemocných s pokročilým karcinomem žaludku. Jednou z možností implementace výsledků do praxe je zavedení rutinního barvení EGFR v endoskopických biopsiích, které vedly ke stanovení diagnózy adenokarcinomu žaludku. Znalost exprese EGFR by pak mohla hrát důležitou roli při rozhodování o strategii léčby nemocných. Při zvažování předoperační chemoradioterapie jako primární léčby by vysoká exprese EGFR mohla znamenat spíše nevhodnost indikace tohoto postupu a nemocný by měl bez větších odkladů podstoupit operační zákrok. Naopak nádory s nízkou expresí EGFR a hraniční operabilitou by byly vhodnými adepty pro neoadjuvantní léčbu. Při rozhodování o strategii léčby by však nadále hrál stěžejní roli rozsah onemocnění, přítomnost uzlinového postižení a vzdálených metastáz, věk a celkový zdravotní stav nemocného. Např. pacienti se symptomatikou obstrukce horní trávicí trubice v době diagnózy budou zřejmě nadále indikováni k neodkladnému primárnímu chirurgickému zákroku nezávisle na znalosti radiosenzitivity jejich onemocnění. Finanční otázka léčby zde hraje zanedbatelnou roli, vezmeme-li v potaz, že pokud není finančně náročná konkomitantní chemoradioterapie provedena předoperačně, bude u většiny nemocných za stejných nákladů vzhledem k aktuálním léčebným standardům indikována v léčbě adjuvantní. Léčba pacientů by měla probíhat centralizovaně v nemocnicích s bohatými zkušenostmi s chirurgickou léčbou karcinomů žaludku a s kvalitním personálním a přístrojovým vybavením radioterapie.

Výsledky této studie mohou být dále inspirací pro klinické zkoumání kombinace předoperační radioterapie karcinomu žaludku s biologickou blokádu funkce EGFR jeho

inhibitory. Existuje však jen málo experimentálních studií sledujících radiosenzitizaci buněk karcinomů žaludku aplikací inhibitorů EGFR *in vitro*, zatímco klinická evidence na pacientech zcela chybí. Snad jedinou recentně dostupnou experimentální studií je čínská radiobiologická studie, která prokázala *in vitro* zvýšení radiosenzitivity dvou ze sedmi odlišných linií lidského adenokarcinomu žaludku exprimujících EGFR po jejich předchozí expozici gefitinibu, selektivnímu inhibitoru EGFR tyrozinkinázy (Cao et al. 2007). Autoři této studie prokázali signifikantní redukci přeživších nádorových buněk jednak při zvýšení dávky radioterapie, tak ale i při zvýšení koncentrace samotného gefitinibu. Závěrem se pak shodují na tom, že aplikace gefitinibu s následnou iradiací může zvýšit radiosenzitivitu nádorových linií karcinomů žaludku s vysokou expresí EGFR jednak inhibicí buněčné proliferace, ale také zvýšenou indukcí apoptózy a redistribucí fází buněčného cyklu.

Dokud však nebude přínos anti-EGFR strategie v potenciaci radioterapie karcinomu žaludku potvrzen randomizovanou prospektivní studií, zůstane kombinovaná neoadjuvantní „bioradioterapie“ jen součástí experimentů. Nelze pak opomenout ani ekonomickou stránku případné kombinace biologické léčby a radioterapie. Zatímco finanční náklady na léčbu jednoho pacienta konvenční předoperační chemoradioterapií v dávce 45 Gy ve 25-ti frakcích technikou AP/PA s rentgenovou simulací, týdenní verifikací, dozimetrickou kontrolou při první frakci ozáření, konkomitantní kontinuální chemoterapií 5-fluorouracil $200\text{mg}/\text{m}^2$ a týdenní aplikaci cisplatinu $40\text{mg}/\text{m}^2$ s antiemetickou profylaxí a za hospitalizace činí přibližně 98,000 Kč (jedná se o čisté náklady, které lze vykázat zdravotní pojišťovně kódem dle aktuálního sazebníku; v kalkulaci nejsou zahrnuty odběry a vyšetření krve, obvazový materiál, výživa, ani náklady na ošetřující personál); finanční nákladnost léčby by pak radikálně vzrostla, pokud by se k potenciaci radioterapie místo chemoterapie užívala konkomitantní aplikace cetuximabu v obdobném dávkovém schématu jako u potenciace radioterapie karcinomů hlavy a krku. V takovém případě by se cena léčby jednoho pacienta

vyšplhala přibližně na 220,000 Kč. Rozhodujícím faktorem by ale měla být účinnost léčby, nikoliv její cena.

Při koncipování dalších klinických studií je důležité brát v úvahu nejen míru imunohistochemické exprese EGFR, ale také případnou přítomnost aktivační mutace K-ras, která dle aktuálních znalostí činí nádorové tkáně rezistentní k inhibitorům EGFR. Aktivační mutaci K-ras lze nalézt přibližně u 30% lidských nádorů a její přítomnost hraje kritickou roli ve snížené citlivosti nádorů k cytotoxické léčbě, včetně radioterapie (Bernhard et al. 2000; Toulany et al. 2005; Toulany et al. 2006; Cengel et al. 2006). Nemutovaná, tzv. divoká forma („wild-type“) K-ras může být nadměrně aktivovaná při nadměrné expresi nebo zvýšené aktivaci svých signálních partnerů, zejména pak EGFR. Tuto aktivitu pak vytváří mutovaná forma K-ras i v případě negativní exprese EGFR nebo při absenci jeho přirozených ligandů. V takovém případě není samotná exprese EGFR dostatečným prediktorem jeho skutečné aktivity, čili ani citlivosti nádorů k cytotoxické léčbě. Tato domněnka byla v uplynulém roce klinicky potvrzena při sledování účinnosti biologické terapie karcinomu kolorekta monoklonálními protilátkami proti EGFR. Klinická data prokazující nadřazenost průkazu aktivační mutace K-ras nad expresí EGFR v predikci nádorové radiorezistence zatím chybí. Stejně tak nebyl dosud prokázán vztah mezi mutací K-ras a radisenzitivitou u karcinomu žaludku.

Předchozí pokusy korelovat stav exprese p53, p21 a p16 s léčebnou odpovědí u pacientů léčených předoperační radioterapií nebo chemoradioterapií dopadly rozporuplně. Některé studie připisují těmto regulátorům buněčného cyklu úlohu v predikování radiosenzitivity, zejména u adenokarcinomů rekta (Spitz et al. 1997; Fu et al. 1998; Qiu et al. 2000; Suzuki et al. 2004; Komuro et al. 2005), dlaždicobuněčných karcinomů hlavy a krku (Couture et al. 2002), a karcinomů jícnu (Takeuchi et al. 2003; Sohda et al. 2004). Nicméně jiné studie zase neshledaly rozdíly v léčebné odpovědi mezi nádory s pozitivní a negativní expresí těchto proteinů (Wilson et al. 1995; Tan et al. 1997; Sanuders et al. 1999; Lavertu et al. 2001; Koelbl

et al. 2001; Reerink et al. 2004). Stejně tak ani naše zkoumání neprokázalo klinickou významnost exprese p53, p21 či p16 v predikci léčebné odpovědi karcinomů žaludku k předoperační chemoradioterapii.

Za určitý nedostatek předkládané práce považují nízký počet sledovaných pacientů a inhomogenitu léčebných dávek radioterapie a chemoterapie, která vyplývala z měnících se léčebných standardů našeho pracoviště v průběhu času. Za diskusi stojí také rozdílná technika stanovení rozsahu onemocnění před a po aplikaci chemoradioterapie. Zatímco před léčbou byl staging onemocnění stanovován převážně endosonograficky, léčebná odpověď byla hodnocena již jen stanovením patologického stagingu nebo perioperačně chirurgem. Opakování endosonografie nebo CT vyšetření s odstupem času po proběhlé chemoradioterapii by však mohlo přinést značně zavádějící údaje, díky neschopnosti těchto technik rozeznat jizevnaté, zánětlivé a edematózní změny od aktivního nádorového procesu. Tento nedostatek by mohlo odstranit provedení PET/CT před a po neoajuvantní léčbě. Této technice však v době průběhu léčby nemocných stála v cestě její špatná dostupnost a finanční nákladnost. Navíc diskutabilní zůstává případné ideální načasování PET/CT ke stanovení léčebné odpovědi po chemoradioterapii, ke spolehlivému rozeznání reparačních procesů od zbytkového nádoru tak, abychom současně stihly naplánovat operační zákrok s odstupem 4-6 týdnů od chemoradioterapie.

Otázkou na závěr zůstává, jakým směrem vést další výzkum v dosud málo úspěšné léčbě pokročilého karcinomu žaludku. Operační technika již se zdá dosáhla svého vrcholného bodu a aktuální literatura posledních let již nepřináší žádné převratné změny v chirurgických postupech léčby tohoto onemocnění. Stejně tak měnící se zkoumané režimy a dávky chemoterapie ať už v adjuvantním nebo neoadjuvantním podání nepřináší signifikantní změny v dlouhodobém přežití nemocných. Jednou z možností zlepšení výsledků léčby je použití nových technik radioterapie v předoperační nebo pooperační chemoradioterapii. Samostatné použití techniky IMRT (Intensity Modulated Radiation Therapy) v léčbě karcinomu žaludku

postrádá praktický význam, protože nás zde netrápí akutní ani pozdní toxicita léčby, není tedy prvotní důvod hledat techniku šetření zdravých tkání. Ani není dostatek důkazů pro to, že případné navýšení dávky záření na tumor má vliv na léčebnou odpověď karcinomu žaludku či přežití nemocných (Taremi et al. 2007). Technika IGRT (Image Guided Radiation Therapy) u karcinomu žaludku naopak nachází své logické opodstatnění vzhledem k tomu, že žaludek je cílovou strukturou radioterapie, která během léčby vykazuje značné pohyby a výrazné změny ve své náplni (Watanabe et al. 2008). Za pomoci kombinace IGRT s aplikací kontrastních svorek do sliznice žaludku nebo spolykáním per os kontrastní látky před každou frakcí radioterapie by bylo možné dosáhnout redukce nežádoucích pohybů cílového objemu a zpřesnění léčby zářením. I tato technika má však své limitace a u radiorezistentních nádorů nepřinese nemocným žádný další benefit. Je tedy logické hledat cestu, kterou dokážeme současně s rozvojem moderních technologií radioterapie dosáhnout zvýšení nádorové radiosenzitivity. Zdá se, že biologická anti-EGFR cílená léčba má v této oblasti největší potenciál.

8. ZÁVĚRY

Výsledky předkládané práce prokazují statisticky signifikantní asociaci mezi imunohistochemickou expresí receptoru pro epidermální růstový faktor a negativní léčebnou odpovědí lokálně pokročilých adenokarcinomů žaludku k předoperační chemoradioterapii. Klinickým dopadem výsledků mé práce je možnost stanovování míry exprese EGFR v předléčebné nádorové biopsii adenokarcinomů žaludku s cílem předpovídání jejich léčebné odpovědi k chemoradioterapii.

Prediktivní význam imunohistochemické exprese proteinů p53, p21 a p16 nebyl na rozdíl od exprese EGFR statisticky signifikantní, u exprese proteinu p21 však byla naznačena hraniční statistická významnost.

9. SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY

Abbruzzese JL, Rosenberg A, Xiong Q, et al. Phase II study of anti-epidermal growth factor receptor (EGFR) antibody cetuximab (IMC-C225) in combination with gemcitabine in patients with advanced pancreatic cancer. *Proc Am Soc Clin Oncol* 2001;20:A518.

Abd El-Rahim DM, Pinder SE, Paish CE, et al. Expression and co-expression of the members of the epidermal growth factor receptor (EGFR) family in invasive breast carcinoma. *Br J Cancer* 2004;91:1532-1542.

Abe M, Takahashi M, Ono K, Tobe T, Inamoto T. Japan gastric trials in intraoperative radiation therapy. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 1988;15:1431-1433.

Aboud-Pirak E, Hurwitz E, Pirak ME, Bellot F, Schlessinger J, Sala M. Efficacy of antibodies to epidermal growth factor receptor against KB carcinoma in vitro and in nude mice. *J Natl Cancer Inst* 1988;80:1605-1611.

Adams EJ, Green JA, Clark AH, Youngson JH. Comparison of different scoring systems for immunohistochemical staining. *J Clin Pathol* 1999;52:75-77.

Ahrendt SA, Decker PA, Alawi EA, et al. Cigarette smoking is strongly associated with mutation of the K-ras gene in patients with primary adenocarcinoma of the lung. *Cancer* 2001;92:1525-1530.

Ajani JA, Mansfield PF, Crane CH, et al. Paclitaxel-based chemoradiotherapy in localized gastric carcinoma: degree of pathologic response and not clinical parameters dictated patient outcome. *J Clin Oncol* 2005;23(6):1237-1244.

Ajani JA, Mansfield PF, Janjan N, et al. Multi-institutional trial of preoperative chemoradiotherapy in patients with potentially resectable gastric carcinoma. *J Clin Oncol* 2004;22(14):2774-2780.

Ajani JA, Winter K, Okawara GS, et al. Phase II trial of preoperative chemoradiation in patients with localized gastric adenocarcinoma (RTOG 9904): quality of combined modality therapy and pathologic response. *J Clin Oncol* 2006;24(24):3953-3958.

Allal AS, Zwahlen D, Brundler MA, et al. Neoadjuvant radiochemotherapy for locally advanced gastric cancer: long-term results of a phase I trial. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 2005;63(5):1286-1289.

Allum WH, Hallissey MT, Ward LC, Hockey MS. A controlled, prospective, randomized trial of adjuvant chemotherapy or radiotherapy in resectable gastric cancer: Interim report. British Stomach Cancer Group. *Br J Cancer* 1989;60:739-744.

Amado RG, Wolf M, Peeters M, et al. Wild-type KRAS is required for panitumumab efficacy in patients with metastatic colorectal cancer. *J Clin Oncol* 2008;26:1626-1634.

Amorino GP, Hamilton VM, Valerie K, Dent P, Lammering G, Schmidt-Ullrich RK. Epidermal growth factor receptor dependence of radiation-induced transcription factor activation in human breast carcinoma cells. *Mol Biol Cell* 2002;13:2233-2244.

Ang KK, Andratschke NH, Milas L. Epidermal growth factor receptor and response of head-and-neck carcinoma to therapy. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 2004;58:959-965.

Ang KK, Berkey BA, Tu X, et al. Impact of epidermal growth factor receptor expression on survival and pattern of relapse in patients with advanced head and neck carcinoma. *Cancer Res* 2002;62:7350-7356.

Arteaga CL. Epidermal growth factor receptor dependence in human tumors: more than just expression? *Oncologist* 2002;7(Suppl 4):31-39.

Arteaga CL. Overview of epidermal growth factor receptor biology and its role as a therapeutic target in human neoplasia. *Semin Oncol* 2002;29:3-9.

Atasoy BM, Bentzen SM, Trott KR. The epidermal growth factor receptor is involved in accelerated repopulation in squamous cell carcinoma of the head and neck. *Exp Strahlenther Klin Strahlenbiol* 2004;13:39-41.

Aviel-Ronen S, Blackhall FH, Shepherd FA, Tsao MS. K-ras mutations in non-small-cell lung carcinoma: a review. *Clin Lung Cancer* 2006;8:30-38.

Balaban N, Moni J, Shannon M, et al. The effect of ionizing radiation on signal transduction: antibodies to EGF receptor sensitize A431 cells to radiation. *Biochim Biophys Acta* 1996;1314:147-156.

Bandyopadhyay D, Mandal M, Adam L, Mendelsohn J, Kumar R. Physical interaction between epidermal growth factor receptor and DNA-dependent protein kinase in mammalian cells. *J Biol Chem* 1998;273:1568-1573.

Barker FG, Simmons ML, Chang SM, et al. EGFR overexpression and radiation response in glioblastoma multiforme. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 2001;51:410-418.

Batra SK, Castelino-Prabhu S, Wikstrand CJ, et al. Epidermal growth factor ligand-independent, unregulated, cell-transforming potential of a naturally occurring human mutant EGFRvIII gene. *Cell Growth Differ* 1995;6:1251-1259.

Baumann M, Dubois W, Suit HD. Response of human squamous cell carcinoma xenografts of different sizes to irradiation: relationship of clonogenic cells, cellular radiation sensitivity in vivo, and tumor rescuing units. *Radiat Res* 1990;123:325-330.

Baumann M, Krause M, Zips D, et al. Selective inhibition of the epidermal growth factor receptor tyrosine kinase by BIBX1382BS and the improvement of growth delay, but not local control, after fractionated irradiation in human FaDu squamous cell carcinoma in the nude mouse. *Int J Radiat Biol* 2003;79:547-559.

Baumann M, Petersen C, Eicheler W, et al. Mechanisms of repopulation in experimental squamous cell carcinoma. In: Kogelnik HD, Lukas P, Sedlmayer F. *Progress in radiation-oncology*, vol. 7. Bologna, Monduzzi; 2002, p.417-422.

Begg AC. Prediction of repopulation rates and radiosensitivity in human tumours. *Int J Radiat Biol* 1994;65:103-108.

Bernhard EJ, Stanbridge EJ, Gupta S, et al. Direct evidence for the contribution of activated N-ras and K-ras oncogenes to increased intrinsic radiation resistance in human tumor cell lines. *Cancer Res* 2000;60:6597-6600.

Bianco C, Bianco R, Tortora G, et al. Antitumor activity of combined treatment of human cancer cells with ionizing radiation and anti-epidermal growth factor receptor monoclonal antibody C225 plus type I protein kinase A antisense oligonucleotide. *Clin Cancer Res* 2000;6:4343-4350.

Bianco C, Tortora G, Bianco R, et al. Enhancement of antitumor activity of ionizing radiation by combined treatment with selective epidermal growth factor receptor – tyrosine kinase inhibitor ZD1839 (Iressa). *Clin Cancer Res* 2002;8:3250-3258.

Bonenkamp JJ, Hermans J, Sasako M, et al. Extended lymph node dissection for gastric cancer. *N Engl J Med* 1999;340:908-914.

Bonenkamp JJ, Songun I, Hermans J, et al. Randomized comparison of morbidity after D1 and D2 dissection for gastric cancer in 966 Dutch patients. *Lancet* 1995;345:745-748.

Bonner JA, Harari PM, Giralt J, et al. Radiotherapy plus cetuximab for squamous-cell carcinoma of the head and neck. *N Engl J Med* 2006;354:567-578.

Bos M, Mendelsohn J, Bowden C et al. Phase I studies of anti-epidermal growth factor receptor (EGFR) chimeric monoclonal antibody C225 in patients with EGFR overexpressing tumors. *Proc Am Soc Clin Oncol* 1996;15:443a.

Bowers G, Reardon D, Hewitt T, et al. The relative role of ErbB1-4 receptor tyrosine kinases in radiation signal transduction responses of human carcinoma cells. *Oncogene* 2001;20:1388-1397.

Brade AM, Magalhaes J, Siu L, et al. A single agent, phase I pharmacodynamic study of nimotuzumab (TheraCIM-h-R3) in patients with advanced refractory solid tumors. *J Clin Oncol* 2007;25: abstrakt 14030.

Buchsbaum DJ, Bonner JA, Grizzle WE, et al. Treatment of pancreatic cancer xenografts with Erbitux (IMC-C225) anti-EGFR antibody, gemcitabine, and radiation. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 2002;54:1180-1193.

Cao WG, Ma T, Li JF, et al. Effect of gefitinib on radiosensitivity of gastric cancer cell lines. *Ai Zheng* 2007;26:1330-1335.

Caraglia M, Abbruzzese A, Leardi A, et al. Interferon-alpha induces apoptosis in human KB cells through a stress-dependent mitogen activated protein kinase pathway that is antagonized by epidermal growth factor. *Cell Death Differ* 1999;6:773-780.

Carpenter G. Receptors for epidermal growth factor and other polypeptide mitogens. *Annu Rev Biochem* 1987;56:881-914.

Cengel KA, Deutsch E, Stephens TC, Voong KR, Kao GD, Bernhard EJ. Radiosensitizing effects of the prenyltransferase inhibitor AZD3409 against RAS mutated cell lines. *Cancer Biol Ther* 2006;5:1206-1210.

Chen DJ, Nirodi CS. The epidermal growth factor: a role in repair of radiation induced DNA damage. *Clin Cancer Res* 2007;13:6555-6560.

Chow NH, Liu HS, Lee EI, et al. Significance of urinary epidermal growth factor and its receptor expression in human bladder cancer. *Anticancer Res* 1997;17:1293-1296.

Chrysogelos SA, Dickson RB. EGF receptor expression, regulation, and function in breast cancer. *Breast Cance Res Treat* 1994;29:29-40.

Chua DT, Nicholls JM, Sham JS, Au GK. Prognostic value of epidermal growth factor receptor expression in patients with advanced stage nasopharyngeal carcinoma treated with induction chemotherapy and radiotherapy. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 2004;59:11-20.

Chung KY, Shia J, Kemeny NE, et al. Cetuximab shows activity in colorectal cancer patients with tumors that do not express the epidermal growth factor receptor by immunohistochemistry. *J Clin Oncol* 2005;23:1803-1810.

Cohen MH, Williams GA, Sridhara R, et al. United States Food and Drug Administration Drug Approval summary: Gefitinib (ZD1839; Iressa) tablets. *Clin Cancer Res* 2004;10:1212-1218.

Cohen RB, Falcey JW, Paulter VJ, Fetzner K, Waksal H. Safety profile of the monoclonal antibody (MOAB) IMC-C225, an anti-epidermal growth factor receptor (EGFR) used in the treatment of EGFR-positive tumors. *Proc Am Soc Clin Oncol* 2000;19:A1862.

Contessa JN, Hampton J, Lammering G, et al. Ionizing radiation activates Erb-B receptor dependent Akt and p70 S6 kinase signaling in carcinoma cells. *Oncogene* 2002;21:4032-4041.

Contessa JN, Reardon DB, Todd D, et al. The inducible expression of dominant-negative epidermal growth factor receptor-CD533 results in radiosensitization of human mammary carcinoma cells. *Clin Cancer Res* 1999;5:405-411.

Couture C, Raybaud-Diogene H, Tetu B, et al. p53 and Ki-67 as markers of radioresistance in head and neck carcinoma. *Cancer* 2002; 94:713-722.

Crombet T, Osorio M, Cruz T, et al. Use of the humanized anti-epidermal growth factor receptor monoclonal antibody h-R3 in combination with radiotherapy in the treatment of locally advanced head and neck cancer patients. *J Clin Oncol* 2004;22:1646-1654.

Cunningham D, Humblet Y, Siena S, et al. Cetuximab monotherapy and cetuximab plus irinotecan in irinotecan-refractory metastatic colorectal cancer. *N Engl J Med* 2004;351:337-345.

Cunningham D, Allum WH, Stenning SP, et al. Perioperative chemotherapy versus surgery alone for resectable gastroesophageal cancer. *N Engl J Med* 2006;355:11-20.

Cuschieri A, Weeden S, Fielding J, et al. Patient survival after D1 and D2 resections for gastric cancer: long-term results of the MRC randomized surgical trial. Surgical Co-operative Group. *Br J Cancer* 1999;79:1522-1530.

Damstrup L, Rude Voldborg B, Spang-Thomsen M, Brunner N, Skovgaard Poulsen H. In vitro invasion of small-cell lung cancer cell lines correlates with expression of epidermal growth factor receptor. *Br J Cancer* 1998;78:631-640.

De Pas T, Pelosi G, de Braud F, et al. Modulation of epidermal growth factor receptor status by chemotherapy in patients with locally advanced non-small-cell lung cancer is rare. *J Clin Oncol* 2004;22:4966-4970.

Dei Tos AP, Ellis I. Assessing epidermal growth factor receptor expression in tumours: what is the value of current test methods? *Eur J Cancer* 2005;41:1383-1392.

Demiral AN, Sarioglu S, Birlik B, Sen M, Kinay M. Prognostic significance of EGF receptor expression in early glottic cancer. *Auris Nasus Laryng* 2004;31:417-424.

Di Marco E, Pierce JH, Fleming TP, et al. Autocrine interaction between TGF- α and the EGF receptor: quantitative requirements for induction of the malignant phenotype. *Oncogene* 1989;4:831-838.

Dickstein BM, Wosikowski K, Bates SE. Increased resistance to cytotoxic agents in ZR75B human breast cancer cells transfected with epidermal growth factor receptor. *Mol Cell Endocrinol* 1995;110:205-211.

Douglass HO, Nava HR. Gastric adenocarcinoma: management of the primary disease. *Semin Oncol* 1985;12:32-45.

Dragovich T, McCoy S, Fenoglio-Preiser CM, et al. Phase II trial of erlotinib in gastroesophageal junction and gastric adenocarcinomas: SWOG 0127. *J Clin Oncol* 2006;24:4922-4927.

Eberhard DA, Johnson BE, Amler LC, et al. Mutations in the epidermal growth factor receptor and in KRAS are predictive and prognostic indicators in patients with non-small-cell lung cancer treated with chemotherapy alone and in combination with erlotinib. *J Clin Oncol* 2005;23:5900-5909.

Ekstrand AJ, James CD, Cavanee WK, Seliger B, Pettersson RF, Collins VP. Genes for epidermal growth factor receptor, transforming growth factor alpha, and epidermal growth factor and their expression in human gliomas in vivo. *Cancer Res* 1991;51:2164-2172.

Elie C, Geay JF, Morcos M, et al. Lack of relationship between EGFR-1 immunohistochemical expression and prognosis in a multicentre clinical trial of 93 patients with advanced primary ovarian epithelial cancer (GINECO group). *Br J Cancer* 2004;91:470-475.

Eriksen JG, Buffa FM, Alsner J, Steiniche T, Bentzen SM, Overgaard J. Molecular profiles as predictive marker for the effect of overall treatment time of radiotherapy in supraglottic larynx squamous cell carcinomas. *Radiother Oncol* 2004;71:275-282.

Eriksen JG, Steiniche T, Askaa J, et al. The prognostic value of epidermal growth factor receptor is related to tumor differentiation and the overall treatment time of radiotherapy in squamous cell carcinomas of the head and neck. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 2004;58:561-566.

Eriksen JG, Steiniche T, Overgaard J. The influence of epidermal growth factor receptor and tumor differentiation on the response to accelerated radiotherapy of squamous cell carcinomas of the head and neck in the randomized DAHANCA 6 and 7 study. *Radiother Oncol* 2005;74:93-100.

Finlay CA, Hinds PW, Levine AJ. The p53 proto-oncogene can act as a suppressor of transformation. *Cell* 1989; 57:1083-1093.

Fisher-Colbrie J, Witt A, Heinzl H, et al. EGFR and steroid receptors in ovarian carcinoma: comparison with prognostic parameters and outcome of patients. *Anticancer Res* 1997;17:613-619.

Fowler JF. Rapid repopulation in radiotherapy: a debate on mechanism. The phantom of tumor treatment--continually rapid proliferation unmasked. *Radiother Oncol* 1991;22:156-158.

Frederick L, Wang XY, Eley G, James CD. Diversity and frequency of epidermal growth factor receptor mutations in human glioblastomas. *Cancer Res* 2000;60:1383-1387.

Fry DW, Kraker AJ, McMichael A, et al. A specific inhibitor of the epidermal growth factor receptor tyrosine kinase. *Science* 1994;265:1093-1095.

Fu CG, Tominaga O, Nagawa H, et al. Role of p53 and p21/WAF1 detection in patient selection for preoperative radiotherapy in rectal cancer patients. *Dis Colon Rectum* 1998; 41:68-74.

Fujitani K, Ajani JA, Crane CH, et al. Impact of induction chemotherapy and preoperative chemoradiotherapy on operative morbidity and mortality in patients with locoregional adenocarcinoma of the stomach or gastroesophageal junction. *Ann Surg Oncol* 2007;14:2010-2017.

Gibson S, Tu S, Oyer R, Anderson SM, Johnson GL. Epidermal growth factor protects epithelial cells against Fas-induced apoptosis. Requirement for Akt activation. *J Biol Chem* 1999;274:17612-17618.

Giralt J, de las Heras M, Cerezo L, et al. The expression of epidermal growth factor receptor results in a worse prognosis for patients with rectal cancer treated with preoperative radiotherapy: a multicenter, retrospective analysis. *Radiother Oncol* 2005;74:101-108.

Giralt J, Eraso A, Armengol M, et al. Epidermal growth factor receptor is a predictor of tumor response in locally advanced rectal cancer patients treated with preoperative radiotherapy. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 2002;54:1460-1465.

Goldstein NI, Prewett M, Zuklys K, Rockwell P, Mendelsohn J. Biological efficacy of a chimeric antibody to the epidermal growth factor receptor in a human tumor xenograft model. *Clin Cancer Res* 1995;1:1311-1318.

Goldstein NS, Armin M. Epidermal growth factor receptor immunohistochemical reactivity in patients with American Joint Committee on Cancer Stage IV colon adenocarcinoma: implications for a standardized scoring system. *Cancer* 2001;92:1331-1346.

Gonzalez G, Crombet T, Torres F, et al. Epidermal growth factor-based cancer vaccine for non-small-cell lung cancer therapy. *Ann Oncol* 2003;14:461-466.

Green MR, Basketter DA, Couchman JR, Rees DA. Distribution and number of epidermal growth factor receptors in skin is related to epithelial cell growth. *Dev Biol* 1983;100:506-512.

Gunderson LL. Gastric cancer – patterns of relapse after surgical resection. *Semin Radiat Oncol* 2002;12:150-161.

Gunderson LL, Sosin H. Adenocarcinoma of the stomach: Areas of failure in a reoperation series (second or symptomatic looks). Clinicopathologic correlation and implications for adjuvant therapy. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 1982;8:1-11.

Gutowski MC, Briggs SL, Johnson DA. Epidermal growth factor receptor-reactive monoclonal antibodies: xenograft antitumor activity alone and as drug immunoconjugates. *Cancer Res* 1991;51:5471-5475.

Haimovitz-Friedman A. Radiation-induced signal transduction and stress response. *Radiat Res* 1998;150(Suppl 5):S102-S108.

Han SW, Kim TY, Jeon YK, et al. Optimization of patient selection for gefitinib in non-small cell lung cancer by combined analysis of epidermal growth factor receptor mutation, K-ras mutation, and Akt phosphorylation. *Clin Cancer Res* 2006;12:2538-2544.

Harari PM, Huang SM. Epidermal growth factor receptor modulation of radiation response: preclinical and clinical development. *Semin Radiat Oncol* 2002;12:21-26.

Harari PM, Huang SM. Radiation response modification following molecular inhibition of epidermal growth factor receptor signaling. *Semin Radiat Oncol* 2001;11:281-289.

Hartley LC, Evans E, Windsor CJ. Factors influencing prognosis in gastric cancer. *Aust N Z J Surg* 1987;57:5-9.

Henning GT, Schild SE, Stafford SL, et al. Results of irradiation or chemoirradiation following resection of gastric adenocarcinoma. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 2000;46:589-598.

Herbst RS, Shin DM. Monoclonal antibodies to target epidermal growth factor receptor-positive tumors: a new paradigm for cancer therapy. *Cancer* 2002;94:1593-1611.

Herbst RS. Review of epidermal growth factor receptor biology. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 2004;59:21-26.

Hirsch FR, Varella-Garcia M, Bunn PA Jr, et al. Epidermal growth factor receptor in non-small-cell lung carcinomas: correlation between gene copy number and protein expression and impact on prognosis. *J Clin Oncol* 2003;21:3798-3807.

Howson CP, Hiyama T, Wynder EL. The decline in gastric cancer: epidemiology of an unplanned triumph. *Epidemiol Rev* 1986;8:1-27.

Hu G, Liu W, Mendelsohn J, et al. Expression of epidermal growth factor receptor and human papillomavirus E6/E7 proteins in cervical carcinoma cells. *J Natl Cancer Inst* 1997;89:1271-1276.

Hu JK, Chen ZX, Zhou ZG, et al. Intravenous chemotherapy for resected gastric cancer: meta-analysis of randomized controlled trials. *World J Gastroenterol* 2002;8:1023-1028.

Huang SM, Harari PM. Epidermal growth factor receptor inhibition in cancer therapy: biology, rationale and preliminary clinical results. *Invest New Drugs* 1999;17:259-269.

Huang SM, Harari PM. Modulation of radiation response after epidermal growth factor receptor blockade in squamous cell carcinomas: inhibition of damage repair, cell cycle kinetics, and tumor angiogenesis. *Clin Cancer Res* 2000;6:2166-2174.

Huang SM, Li J, Armstrong EA, Harari PM. Modulation of radiation response and tumor-induced angiogenesis after epidermal growth factor receptor inhibition by ZD1839 (Iressa). *Cancer Res* 2002;62:4300-4306.

Husgafvel-Pursiainen K, Hackman P, Ridanpaa M, et al. K-ras mutations in human adenocarcinoma of the lung: association with smoking and occupational exposure to asbestos. *Int J Cancer* 1993;53:250-256.

Karashima T, Sweeney P, Slaton JW, et al. Inhibition of angiogenesis by the anti-epidermal growth factor receptor antibody ImClone C225 in androgen-independent prostate cancer growing orthotopically in nude mice. *Clin Cancer Res* 2002;8:1253-1264.

Kashles O, Yarden Y, Fischer R, Ullrich A, Schlessinger J. A dominant negative mutation suppresses the function of normal epidermal growth factor receptors by heterodimerization. *Mol Cell Biol* 1991;11:1454-1463.

Kasid U, Pirollo K, Dritschilo A, Chang E. Oncogenic basis of radiation resistance. *Adv Cancer Res* 1993;61:195-233.

Kastan MB, Canman CE, Leonard CJ. P53, cell cycle control and apoptosis: implications for cancer. *Cancer Metastasis Rev* 1995; 14:3-15.

Kastan MB, Onyekwere O, Sidransky D, Vogelstein B, Craig RW. Participation of p53 protein in the cellular response to DNA damage. *Cancer Res* 1991; 51:6304-6311.

Kavanagh BD, Lin PS, Chen P, Schmidt-Ullrich RK. Radiation-induced enhanced proliferation of human squamous cancer cells in vitro: a release from inhibition by epidermal growth factor. *Clin Cancer Res* 1995;1:1557-1562.

Kearsley JH, Leonard JH, Walsh MD, Wright GR. A comparison of epidermal growth factor receptor (EGFR) and c-erbB-2 oncogene expression in head and neck squamous cell carcinomas. *Pathology* 1991;23:189-194.

Kennedy BJ. TNM classification for stomach cancer. *Cancer* 1970;26:971-983.

Kersemaekers AM, Fleuren GJ, Kenter GG, et al. Oncogene alterations in carcinomas of the uterine cervix: overexpression of the epidermal growth factor receptor is associated with poor prognosis. *Clin Cancer Res* 1999;5:577-586.

Kern KA. Gastric cancer: a neoplastic enigma. *J Surg Oncol Suppl* 1989;1:34-39.

Kersting C, Tidow N, Schmidt H, et al. Gene dosage PCR and fluorescence in situ hybridization reveal low frequency of egfr amplifications despite protein overexpression in invasive breast carcinoma. *Lab Invest* 2004;84:582-587.

Kim JS, Kim JM, Li S, et al. Epidermal growth factor receptor as a predictor of tumor downstaging in locally advanced rectal cancer patients treated with preoperative chemoradiotherapy. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 2006;66:195-200.

Kim MA, Lee HS, Lee HE, Jeon YK, Yang HK, Kim WH. EGFR in gastric carcinomas: prognostic significance of protein overexpression and high gene copy number. *Histopathology* 2008;52:738-746.

Klautke G, Foitzik T, Ludwig K, Ketterer P, Klar E, Fietkau R. Neoadjuvant radiochemotherapy in locally advanced gastric carcinoma. *Strahlenther Onkol* 2004;180:695-700.

Klijn JG, Look MP, Portengen H, et al. The prognostic value of epidermal growth factor receptor (EGF-R) in primary breast cancer: results of a 10 year follow-up study. *Breast Cancer Res Treat* 1994;29:73-83.

Koelbl O, Rosenwald A, Haberl M, Muller J, Reuther J, Flentje M. p53 and Ki-67 as predictive markers for radiosensitivity in squamous cell carcinoma of the oral cavity? an immunohistochemical and clinicopathologic study. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 2001; 49:147-154.

Komuro Y, Watanabe T, Tsurita G, Muto T, Nagawa H. Evaluating the combination of molecular prognostic factors in tumor radiosensitivity in rectal cancer. *Hepatogastroenterology* 2005; 52:666-671.

Kosse VA. Combined treatment of gastric cancer using hypoxic radiotherapy. *Vopr Onkol* 1990;36:1349-1353.

Krause M, Baumann M, Thames HD. In regard to Solomon et al. EGFR blockade with ZD1839 ("Iressa") potentiates the antitumor effects of single and multiple fractions of ionizing radiation in human A431 squamous cell carcinoma. *IJROBP* 2003;55:713-723. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 2003;57:300-301.

Krause M, Hessel F, Wohlfarth J, et al. Ultrafractionation in A7 human malignant glioma in nude mice. *Int J Radiat Biol* 2003;79:377-383.

Krause M, Ostermann G, Petersen C, et al. Decreased repopulation as well as increased reoxygenation contribute to the improvement in local control after targeting of the EGFR by C225 during fractionated irradiation. *Radiother Oncol* 2005;76:162-167.

Lammering G, Hewit TH, Hawkins WT, et al. Epidermal growth factor receptor as a genetic therapy target for carcinoma cell radiosensitization. *J Natl Cancer Inst* 2001;93:921-929.

Lammering G, Lin PS, Contessa JN, Hampton JL, Valerie K, Schmidt-Ullrich RK. Adenovirus-mediated overexpression of dominant negative epidermal growth factor receptor-CD533 as a gene therapeutic approach radiosensitizes human carcinoma and malignant glioma cells. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 2001;51:775-784.

Lammering G. Molecular predictor and promising target: will EGFR become a star in radiotherapy? *Radiother Oncol* 2005;74:89-91.

Lan L, Wong NS. Phosphatidylinositol 3-kinase and protein kinase C are required for the inhibition of caspase activity by epidermal growth factor. *FEBS Lett* 1999;444:90-96.

Langner C, Ratschek M, Rehak P, Schips L, Zigeuner R. Are heterogenous results of EGFR immunoreactivity in renal cell carcinoma related to non-standardised criteria for staining evaluation? *J Clin Pathol* 2004;57:773-775.

Lavertu P, Adelstein DJ, Myles J, Secic M. P53 and Ki-67 as outcome predictors for advanced squamous cell cancers of the head and neck treated with chemoradiotherapy. *Laryngoscope* 2001; 111:1878-1892.

Layfield LJ, Bernard PS, Goldstein NS. Color multiplex polymerase chain reaction for quantitative analysis of epidermal growth factor receptor genes in colorectal adenocarcinoma. *J Surg Oncol* 2003;83:227-231.

Lee JC, Wang ST, Chow NH, Yang HB. Investigation of the prognostic value of coexpressed erbB family members for the survival of colorectal cancer patients after curative surgery. *Eur J Cancer* 2002;38:1065-1071.

Leong JL, Loh KS, Putti TC, Goh BC, Tan LK. Epidermal growth factor receptor in undifferentiated carcinoma of the nasopharynx. *Laryngoscope* 2004;114:153-157.

Leu CM, Chang C, Hu C. Epidermal growth factor (EGF) suppresses staurosporine-induced apoptosis by inducing mcl-1 via the mitogen-activated protein kinase pathway. *Oncogene* 2000;19:1665-1675.

Leung TW, Cheung AN, Cheng DK, Wong LC, Ngan HY. Expressions of c-erbB-2, epidermal growth factor receptor and pan-ras proto-oncogenes in adenocarcinoma of the cervix: correlation with clinical prognosis. *Oncol Rep* 2001;8:1159-1164.

Liang K, Ang KK, Milas L, Hunter N, Fan Z. The epidermal growth factor receptor mediates radioresistance. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 2003;57(1):246-254.

Lieto E, Ferraraccio F, Orditura M, et al. Expression of vascular endothelial growth factor (VEGF) and epidermal growth factor receptor (EGFR) is an independent prognostic indicator of worse outcome in gastric cancer patients. *Ann Surg Oncol* 2008;15:69-79.

Lin SY, Makino K, Xia W, et al. Nuclear localization of EGF receptor and its potential new role as a transcription factor. *Nat Cell Biol* 2001;3:802-808.

Liu TF, Tatter SB, Willingham MC, Yang M, Hu JJ, Frankel AE. Growth factor receptor expression varies among high-grade gliomas and normal brain: epidermal growth factor

receptor has excellent properties for interstitial fusion protein therapy. *Mol Cancer Ther* 2003;2:783-787.

Lowe SW, Ruley HE, Jacks T, Housman DE. p53-dependent apoptosis modulates the cytotoxicity of anticancer agents. *Cell* 1993; 74:957-967.

MacDonald JS, Smalley SR, Benedetti J, et al. Chemoradiotherapy after surgery compared with surgery alone in adenocarcinoma of the stomach or gastroesophageal junction. *N Engl J Med* 2001;345:725-730.

Mammano E, Belluco C, Sciro M, et al. Epidermal growth factor receptor (EGFR): mutational and protein expression analysis in gastric cancer. *Anticancer Res* 2006;26:3547-50.

Marchetti A, Martella C, Felicioni L, et al. EGFR mutations in non-small-cell lung cancer: analysis of a large series of cases and development of a rapid and sensitive method for diagnostic screening with potential implications on pharmacologic treatment. *J Clin Oncol* 2005;23:857-865.

Mari E, Floriani I, Tinazzi A, et al. Efficacy of adjuvant chemotherapy after curative resection for gastric cancer: a meta-analysis of published randomised trials. A study of the GISCAD (Gruppo Italiano per lo Studio dei Carcinomi dell' Apparato Digerente). *Ann Oncol* 2000;11:837-843.

Masui H, Kawamoto T, Sato JD, Wolf B, Sato G, Mendelsohn J. Growth inhibition of human tumor cells in athymic mice by anti-epidermal growth factor receptor monoclonal antibodies. *Cancer Res* 1984;44:1002-1007.

Maurizi M, Almadori G, Ferrandina G, et al. Prognostic significance of epidermal growth factor receptor in laryngeal squamous cell carcinoma. *Br J Cancer* 1996;74:1253-1257.

McClellan M, Kievit P, Auersperg N, Rodland K. Regulation of proliferation and apoptosis by epidermal growth factor and protein kinase C in human ovarian surface epithelial cells. *Exp Cell Res* 1999;246:471-479.

McKay JA, Murray LJ, Curran S, et al Evaluation of the epidermal growth factor receptor (EGFR) in colorectal tumours and lymph node metastases. *Eur J Cancer* 2002;38:2258-2264.

Meert AP, Martin B, Delmotte P, et al. The role of EGF-R expression on patient survival in lung cancer: a systematic review with meta-analysis. *Eur Respir J* 2002;20:975-981.

Mendelsohn J, Baselga J. The EGF receptor family as targets for cancer therapy. *Oncogene* 2000;19:6550-6565.

Mendelsohn J. Epidermal growth factor receptor inhibition by a monoclonal antibody as anticancer therapy. *Clin Cancer Res* 1997;3:2703-2707.

Milas L, Akimoto T, Hunter NR, et al. Relationship between cyclin D1 expression and poor radioresponse of murine carcinomas. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 2002;52:514-521.

Milas L, Mason K, Hunter N, et al. In vivo enhancement of tumor radioresponse by C225 anti-epidermal growth factor receptor antibody. *Clin Cancer Res* 2000;6:701-708.

Milas L, Yamada S, Hunter N, Guttenberger R, Thomas HD. Changes in TCD50 as a measure of clonogen doubling time in irradiated and unirradiated tumors. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 1991;21:1195-1202.

Modjtahedi H, Affleck K, Stubberfield C, Dean C. EGFR blockade by tyrosine kinase inhibitor or monoclonal antibody inhibits growth, directs terminal differentiation and induces apoptosis in the human squamous cell carcinoma HN5. *Int J Oncol* 1998;13:335-342.

Morgan MA, Parsels LA, Kollar LE, Normolle DP, Maybaum J, Lawrence TS. The combination of epidermal growth factor receptor inhibitors with gemcitabine and radiation in pancreatic cancer. *Clin Cancer Res* 2008;14:5142-5149.

Morishige K, Kurachi H, Amemiya K, et al. Evidence for the involvement of transforming growth factor alpha and epidermal growth factor receptor autocrine growth mechanism in primary human ovarian cancers in vitro. *Cancer Res* 1991;51:5322-5328.

Moscatello DK, Holgado-Madruga M, Godwin AK, et al. Frequent expression of a mutant epidermal growth factor receptor in multiple human tumors. *Cancer Res* 1995;55:5536-5539.

Moscatello DK, Montgomery RB, Sundareshan P, McDanel H, Wong MY, Wong AJ. Transformational and altered signal transduction by a naturally occurring mutant EGF receptor. *Oncogene* 1996;13:85-96.

Moutinho C, Mateus AR, Milanezi F, Carneiro F, Seruca R, Suriano G. Epidermal growth factor receptor structural alterations in gastric cancer. *BMC Cancer* 2008;8:10.

Murat A, Migliavacca E, Gorlia T, et al. Stem cell-related „self-renewal“ signature and high epidermal growth factor receptor expression associated with resistance to concomitant chemoradiotherapy in glioblastoma. *J Clin Oncol* 2008;26:3015-3024.

Naramura M, Gillies SD, Mendelsohn J, Reisfeld RA, Mueller BM. Therapeutic potential of chimeric and murine anti-(epidermal growth factor receptor) antibodies in a metastasis model of human melanoma. *Cancer Immunol Immunother* 1993;37:343-349.

Nasu S, Ang KK, Fan Z, Milas L. C225 anti-epidermal growth factor receptor antibody enhances tumor radiocurability. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 2001;51:474-477.

Neskovic-Konstantinovic Z, Nikolic-Vukosavljevic D, Brankovic-Magic M, et al. Expression of epidermal growth factor receptor in breast cancer, from early stages to advanced disease. *J Exp Clin Cancer Res* 1999;18:347-355.

Nicholson RI, Gee JM, Harper ME. EGFR and cancer prognosis. *Eur J Cancer* 2001;37 (Suppl 4):S9-S15.

Nishikawa R, Ji XD, Harmon RC, et al. A mutant epidermal growth factor receptor common in human glioma confers enhanced tumorigenicity. *Proc Natl Acad Sci USA* 1994;91:7727-7731.

Ogino S, Kawasaki T, Brahmandam M, et al. Sensitive sequencing method for KRAS mutation detection by pyrosequencing. *J Mol Diagn* 2005;7:413-421.

Oksvold MP, Huitfeldt H, Stang E, Madshus I. Localizing the EGF receptor. *Nat Cell Biol* 2002;4:E22-23.

Overholser JP, Prewett MC, Hooper AT, Waksal HW, Hicklin DJ. Epidermal growth factor receptor blockade by antibody IMC-C225 inhibits growth of a human pancreatic carcinoma xenograft in nude mice. *Cancer* 2000;89:74-82.

Pao W, Wang TY, Riely GJ, et al. KRAS mutations and primary resistance of lung adenocarcinomas to gefitinib or erlotinib. *PLoS Med* 2005;2:e17.

Parra HS, Cavina R, Latteri F, et al. Analysis of epidermal growth factor receptor expression as a predictive factor for response to gefitinib ("Iressa", ZD1839) in non-small-cell lung cancer. *Br J Cancer* 2004;91:208-212.

Patel PR, Mansfield PF, Crane CH, et al. Clinical stage after preoperative chemoradiation is a better predictor of patient outcome than the baseline stage for localized gastric cancer. *Cancer* 2007;110:989-995.

Payne SG, Brindley DN, Guilbert LJ. Epidermal growth factor inhibits ceramide-induced apoptosis and lowers ceramide levels in primary placental trophoblasts. *J Cell Physiol* 1999;180:263-270.

Perez-Soler R. Phase II clinical trial data with the epidermal growth factor receptor tyrosine kinase inhibitor erlotinib (OSI-774) in non-small-cell lung cancer. *Clin Lung Cancer* 2004;6(Suppl 1):S20-23.

Perrotte P, Matsumoto T, Inoue K, et al. Anti-epidermal growth factor receptor antibody C225 inhibits angiogenesis in human transitional cell carcinoma growing orthotopically in nude mice. *Clin Cancer Res* 1999;5:257-265.

Petera J, Dvořák J, Melichar B, et al. Chemoradioterapie v neoadjuvantní léčbě karcinomu žaludku. *Klinická onkologie* 2002;15:216.218.

Petersen C, Eicheler W, Frommel A, et al. Proliferation and micromilieu during fractionated irradiation of human FaDu squamous cell carcinoma in nude mice. *Int J Radiat Biol* 2003;79:469-477.

Pillai MR, Jayaprakash PG, Nair MK. Tumour-proliferative fraction and growth factor expression as markers of tumour response to radiotherapy in cancer of the uterine cervix. *J Cancer Res Clin Ocol* 1998;124:456-461.

Prakash I, Mathur RP, Kar P, Ranga S, Talib VH. Comparative evaluation of cell proliferative indices and epidermal growth factor receptor expression in gastric carcinoma. *Indian J Pathol Microbiol* 1997;40:481-490.

Prewett M, Rothman M, Waksal H, Feldman R, Bander NH, Hicklin DJ. Mouse-human chimeric anti-epidermal growth factor receptor antibody C225 inhibits the growth of human renal cell carcinoma xenografts in nude mice. *Clin Cancer Res* 1998;4:2957-2966.

Qiu H, Sirivongs P, Rothenberger M, Rothenberger DA, Garcia-Aguilar J. Molecular prognostic factors in rectal cancer treated by radiation and surgery. *Dis Colon Rectum* 2000; 43:451-459.

Raben D, Bianco C, Milas L, Ang KK. Targeted therapies and radiation for the treatment of head and neck cancer: are we making progress? *Semin Radiat Oncol* 2004;14:139-152.

Raben D, Buchsbaum DJ, Gillespie Y, et al. Treatment of human intracranial gliomas with chimeric monoclonal antibody against the epidermal growth factor receptor increases survival of nude mice when treated concurrently with irradiation. *Proc Am Assoc Cancer* 1999;40:A1224.

Raben D, Helfrich D, Chan D, et al. The effects of ZD1839 on cell signaling processes and its growth effects with radiation and chemotherapy in human non-small cell lung cancer cells in vitro. *Clin Cancer Res* 2001;7:3805s.

Rao GS, Murray S, Ethier SP. Radiosensitization of human breast cancer cells by a novel ErbB family receptor tyrosine kinase inhibitor. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 2000;48:1519-1528.

Reardon DB, Contessa JN, Mikkelsen RB, et al. Dominant negative EGFR-CD533 and inhibition of MAPK modify JNK1 activation and enhance radiation toxicity of human mammary carcinoma cells. *Oncogene* 1999;18:4756-4766.

Redemann N, Holzmann B, von Rden T, Wagner EF, Schlessinger J, Ullrich A. Anti-oncogenic activity of signalling-defective epidermal growth factor receptor mutants. *Mol Cell Biol* 1992;12:491-498.

Reerink O, Karrenbeld A, Plukker JT, et al. Molecular prognostic factors in locally irresectable rectal cancer treated preoperatively by chamo-radiotherapy. *Anticancer Res* 2004;24:1217-1221.

Robert F, Ezekiel MP, Spencer SA, et al. Phase I study of anti--epidermal growth factor receptor antibody cetuximab in combination with radiation therapy in patients with advanced head and neck cancer. *J Clin Oncol* 2001;19:3234-3243.

Rodemann HP, Dittmann K, Toulany M. Radiation-induced EGFR-signalling and control of DNA-damage repair. *Int J Radiat Biol* 2007;83:781-791.

Rohatgi PR, Mansfield PF, Crane CH, et al. Surgical pathology stage by American Joint Commission on Cancer criteria predicts patient survival after preoperative chemoradiation for localized gastric carcinoma. *Cancer* 2006;107:1475-1482.

Roth AD, Allal AS, Brundler MA, et al. Neoadjuvant radiochemotherapy for locally advanced gastric cancer: a phase I-II study. *Ann Oncol* 2003;14:110-115.

Rubin Grandis J, Melhem MF, Barnes EL, Tweardy DJ. Quantitative immunohistochemical analysis of transformig growth factor-alpha and epidermal growth factor receptor in patients with squamous cell carcinoma of the head and neck. *Cancer* 1996;78:1284-1292.

Rubin Grandis J, Melhem MF, Gooding WE, et al. Levels of TGF-alpha and EGFR protein in head and neck squamous cell carcinoma and patient survival. *J Natl Cancer Inst* 1998;90:824-832.

Rusch V, Klimstra D, Venkatraman E, Pisters PW, Langenfeld J, Dmitrovsky E. Overexpression of the epidermal growth factor receptor and its ligand transforming growth factor alpha is frequent in resectable non-small cell lung cancer but does not predict tumor progression. *Clin Cancer Res* 1997;3:515-522.

Saleh MN, Raisch KP, Stackhouse MA, et al. Combined modality therapy of A431 human epidermoid cancer using anti-EGFr antibody C225 and radiation. *Cancer Biother Radiopharm* 1999;14:451-463.

Salomon DS, Brandt R, Ciardiello F, Normanno N. Epidermal growth factor-related peptides and their receptors in human malignancies. *Crit Rev Oncol Hematol* 1995;19:183-232.

Saltz LB, Meropol NJ, Loehrer PJ Sr, Needle MN, Kopit J, Mayer RJ. Phase II trial of cetuximab in patients with refractory colorectal cancer that expresses the epidermal growth factor receptor. *J Clin Oncol* 2004;22:1201-1208.

Saunders ME, MacKenzie R, Shipman R, Fransen E, Gilbert R, Jordan RC. Patterns of p53 gene mutations in head and neck cancer: full-length gene sequencing and results of primary radiotherapy. *Clin Cancer Res* 1999; 5:2455-2463.

Scartozzi M, Bearzi I, Berardi R, et al. Epidermal growth factor receptor (EGFR) status in primary colorectal tumors does not correlate with EGFR expression in related metastatic sites: implications for treatment with EGFR-targeted monoclonal antibodies. *J Clin Oncol* 2004;22:4772-4778.

Schmidt-Ullrich RK, Contessa JN, Dent P, et al. Molecular mechanisms of radiation-induced accelerated repopulation. *Radiat Oncol Investig* 1999;7:321-330.

Schmidt-Ullrich RK, Dent P, Grant S, Mikkelsen RB, Valerie K. Signal transduction and cellular radiation responses. *Radiat Res* 2000;153:245-257.

Schmidt-Ullrich RK, Contessa JN, Lammering G, Amorino G, Lin PS. EGFR receptor tyrosine kinases and cellular radiation responses. *Oncogene* 2003;22:5855-5865.

Schratinger VH, Kacani L, Andrie J, et al. Pharmacodiagnostic value of the HER family in head and neck squamous cell carcinoma. *ORL J Otorhinolaryngol Relat Spec* 2004;66:21-26.

Schreiber AB, Lax I, Yarden Y, Eshhar Z, Schlessinger J. Monoclonal antibodies against receptor for epidermal growth factor induce early and delayed effects of epidermal growth factor. *Proc Natl Acad Sci USA* 1981;78:7535-7539.

Selvaggi G, Novello S, Torri V, et al. Epidermal growth factor receptor overexpression correlates with a poor prognosis in completely resected non-small-cell lung cancer. *Ann Oncol* 2004;15:28-32.

Sharma SV, Bell DW, Settleman J, Haber DA. Epidermal growth factor receptor mutations in lung cancer. *Nat Rev Cancer* 2007;7:169-181.

Shchepotin IB, Evans SR, Chorny V, et al. Intensive preoperative radiotherapy with local hyperthermia for the treatment of gastric carcinoma. *Surg Oncol* 1994;3:37-44.

She Y, Lee F, Chen J, et al. The epidermal growth factor receptor tyrosine kinase inhibitor ZD1839 selectively potentiates radiation response of human tumors in nude mice, with a marked improvement in therapeutic index. *Clin Cancer Res* 2003;9:3773-3778.

Shigematsu H, Lin L, Takahashi T, et al. Clinical and biological features associated with epidermal growth factor receptor gene mutations in lung cancers. *J Natl Cancer Inst* 2005;97:339-346.

Shinojima N, Tada K, Shiraishi S, et al. Prognostic value of epidermal growth factor receptor in patients with glioblastoma multiforme. *Cancer Res* 2003;63:6962-6970.

Shintani S, Li C, Mihara M, et al. Enhancement of tumor radioresponse by combined treatment with gefitinib (Iressa, ZD1839), an epidermal growth factor receptor tyrosine kinase inhibitor, is accompanied by inhibition of DNA damage repair and cell growth in oral cancer. *Int J Cancer* 2003;107:1030-1037.

Siewert JR, Lange J, Bottcher K, Holscher M, Wieser HF, Gossner W. Stomach cancer: the current situation from the surgical viewpoint. *Dtsch Med Wochenschr* 1987;112:622-628.

Silverberg E, Boring CC, Squires TS. Cancer statistics, 1990. *CA Cancer J Clin* 1990;40:9-26.

Sindelar WF, Kinsella TJ, Tepper JE, et al. Randomized trial of intraoperative radiotherapy in carcinoma of the stomach. *Amer J Surg* 1993;165:178-186.

Sinicropo FA, Half E, Dannenberg K, et al. Expression levels of TS, DPD, EGFR, and HER2 mRNA in primary colorectal cancers and their corresponding metastases. *Proc Am Soc Clin Oncol* 2002;21:A2987.

Sirotnak FM, Zakowski MF, Miller VA, Scher HI, Kris MG. Efficacy of cytotoxic agents against human tumor xenografts is markedly enhanced by coadministration of ZD1839 (Iressa), an inhibitor of EGFR tyrosine kinase. *Clin Cancer Res* 2000;6:4885-4892.

Sohda M, Ishikawa H, Masuda N, et al. Pretreatment evaluation of combined HIF-1alpha, p53 and p21 expression is a useful and sensitive indicator of response to radiation and chemotherapy in esophageal cancer. *Int J Cancer* 2004; 110:838-844.

Solomon B, Hagekyriakou J, Trivett M, et al. Potentiation of the antitumor effect of ionizing radiation by ZD1839 ("Iressa") in vitro and in vivo in A431 cells. *Proc Am Assoc Cancer Res* 2002;43:1002.

Soulieres D, Senzer NN, Vokes EE, Hidalgo M, Agarwala SS, Siu LL. Multicenter phase II study of erlotinib, an oral epidermal growth factor receptor tyrosine kinase inhibitor, in patients with recurrent or metastatic squamous cell cancer of the head and neck. *J Clin Oncol* 2004;22:77-85.

Spano JP, Lagorce C, Atlan D, et al. Impact of EGFR expression on colorectal cancer patient prognosis and survival. *Ann Oncol* 2005;16:102-108.

Spaulding DC, Spaulding BO. Epidermal growth factor receptor expression and measurement in solid tumors. *Semin Oncol* 2002;29:45-54.

Spitz FR, Giacco GG, Hess K, et al. p53 immunohistochemical staining predicts residual disease after chemoradiation in patients with high-risk rectal cancer. *Clin Cancer Res* 1997; 3:1685-1690.

Stea B, Falsey RR, Carey SS, Martinez JD. Growth inhibition and radiosensitization of glioblastoma multiforme by the tyrosine kinase inhibitor ZD1839 (Iressa). *Proc Am Assoc Cancer Res* 2002;43:787.

Steel GG. Cell survival as a determinant of tumor response. In: Steel GG. *Basic clinical radiobiology*, 3rd ed. London, Arnold; 2002, p. 52-63.

Sunpaweravong P, Sunpaweravong S, Puttawibul P, et al. Epidermal growth factor receptor and cyclin D1 are independently amplified and overexpressed in esophageal squamous cell carcinoma. *J Cancer Res Clin Oncol* 2005;131:111-119.

Suzuki T, Sadahiro S, Fukasawa M, et al. Predictive factors of tumor shrinkage and histological regression in patients who received preoperative radiotherapy for rectal cancer. *Jpn J Clin Oncol* 2004; 34:740-746.

Takehana T, Kunitomo K, Suzuki S, et al. Expression of epidermal growth factor receptor in gastric carcinomas. *Clin Gastroenterol Hepatol* 2003;1:438-45.

Takeuchi H, Ozawa S, Ando N, Kitagawa Y, Ueda M, Kitajima M. Cell-cycle regulators and the Ki-67 labeling index can predict the response to chemoradiotherapy and the survival of patients with locally advanced squamous cell carcinoma of the esophagus. *Ann Surg Oncol* 2003; 10:792-800.

Talaev MI, Starinskij VV, Kovalev BN, et al. Results of combined treatment of cancer of the gastric antrum and gastric body. *Vopr Onkol* 1990;36:1485-1488.

Tan LK, Ogden GR. p53 over-expression in laryngeal carcinoma is not predictive of response to radiotherapy. *Oral Oncol* 1997; 33:177-181.

Tang X, Shigematsu H, Bekele BN, et al. EGFR tyrosine kinase domain mutations are detected in histologically normal respiratory epithelium in lung cancer patients. *Cancer Res* 2005;65:7568-7572.

Taremi M, Rinqash J, Dawson LA. Uper abdominal malignancies: intensity-modulated radiation therapy. *Front Radiat Ther Oncol* 2007;40:272-288.

Thomas SM, Grandis JR. Pharmacokinetic and pharmacodynamic properties of EGFR inhibitors under clinical investigation. *Cancer Treat Rev* 2004;30:255-268.

Tokunaga A, Onda M, Okuda T, et al. Clinical significance of epidermal growth factor (EGF), EGF receptor, and c-erbB-2 in human gastric cancer. *Cancer* 1995;75:1418-25.

Toulany M, Dittmann K, Baumann M, Rodemann HP. Inhibition of AKT/protein kinase b but not mitogen activated protein kinase/ERK modulates radiation response by EGFR antagonist. *Radiother Oncol* 2003;67:S20.

Toulany M, Dittmann K, Kruger M, Baumann M, Rodemann HP. Radioresistance of K-Ras mutated human tumor cells is mediated through EGFR-dependent activation of PI3K-AKT pathway. *Radiother Oncol* 2005;76:143-150.

Toulany M, Kasten-Pisula U, Brammer I, et al. Blockage of epidermal growth factor receptor-phosphatidylinositol 3-kinase-AKT signaling increases radiosensitivity of K-RAS mutated human tumor cells in vitro by affecting DNA repair. *Clin Cancer Res* 2006;12:4119-4126.

Toyoda H, Komurasaki T, Uchida D, Morimoto S. Distribution of mRNA for human epiregulin, a differentially expressed member of the epidermal growth factor family. *Biochem J* 1997;326:69-75.

Turner T, Chen P, Goodly LJ, Wells A. EGF receptor signaling enhances in vivo invasiveness of DU-145 human prostate carcinoma cells. *Clin Exp Metastasis* 1996;14:409-418.

Uegaki K, Nio Y, Inoue Y, et al. Clinicopathological significance of epidermal growth factor and its receptor in human pancreatic cancer. *Anticancer Res* 1997;17:3841-3847.

Ullrich A, Schlessinger J. Signal transduction by receptors with tyrosine kinase activity. *Cell* 1990;61:203-212.

Verbeek BS, Andriaansen-Slot SS, Vroom TM, Beckers T, Rijksen G. Overexpression of EGFR and c-erbB2 causes enhanced cell migration in human breast cancer cells and NIH3T3 fibroblasts. *FEBS Lett* 1998;425:145-150.

Vilorio-Petit A, Rak J, Hung MC, et al. Neutralizing antibodies against epidermal growth factor and ErbB-2/neu receptor tyrosine kinases down-regulate vascular endothelial growth factor production by tumor cells in vitro and in vivo: angiogenic implications for signal transduction therapy of solid tumors. *Am J Pathol* 1997;151:1523-1530.

Vokes EE, Choy H. Targeted therapies for stage III non-small cell lung cancer: integration in the combined modality setting. *Lung Cancer* 2003;41(suppl 1):S115-S121.

Waldman T, Lengauer C, Kinzler KW, Vogelstein B. Uncoupling of S phase and mitosis induced by anticancer agents in cells lacking p21. *Nature* 1996; 381:713-716.

Walker RA, Dearing SJ. Expression of epidermal growth factor receptor mRNA and protein in primary breast carcinomas. *Breast Cancer Res Treat* 1999;53:167-176.

Watanabe M, Isobe K, Takisima H, et al. Intrafractional gastric motion and interfractional stomach deformity during radiation therapy. *Radiother Oncol* 2008;87:425-431.

Watanabe T, Shintani A, Nakata M, et al. Recombinant human betacellulin. Molecular structure, biological activities, and receptor interaction. *J Biol Chem* 1994;269:9966-9973.

Waugh MG, Hsuan JJ. EGF receptors as transcription factors: ridiculous or sublime? *Nat Cell Biol* 2001;3:E209-E211.

Wells A. EGF receptor. *Int J Bioch Cell Biol* 1999;31:637-643.

Wells A. Tumor invasion: role of growth factor-induced cell motility. *Adv Cancer Res* 2000;78:31-101.

Whittington R, Coia LR, Haller DG, Rubenstein JH, Rosato EF. Adenocarcinoma of the esophagus and esophago-gastric junction: The effects of single and combined modalities on the survival and patterns of failure following treatment. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 1990;19:593-603.

Wiley HS. Trafficking of the ErbB receptors and its influence on signaling. *Exp Cell Res* 2003;284:78-88.

Willett CG, Tepper JE, Orlow E, Shipley WU. Renal complications secondary to radiation treatment of upper abdominal malignancies. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 1986;12:1601-1604.

Williams KJ, Telfer BA, Stratford IJ, Wedge SR. ZD1839 ('Iressa'), a specific oral epidermal growth factor receptor-tyrosine kinase inhibitor, potentiates radiotherapy in a human colorectal cancer xenograft model. *Br J Cancer* 2002;86:1157-1161.

Wilson GD, Richman PI, Dische S, et al. p53 status of head and neck cancer: relation to biological characteristics and outcome of radiotherapy. *Br J Cancer* 1995; 71:1248-1252.

Withers HR, Taylor JM, Maciejewski B. The hazard of accelerated tumor clonogen repopulation during radiotherapy. *Acta Oncol* 1988;27:131-146.

Wong AJ, Ruppert JM, Bigner SH, et al. Structural alterations of the epidermal growth factor receptor gene in human gliomas. *Proc Natl Acad Sci USA* 1992;89:2965-2969.

Woodburn JR. The epidermal growth factor receptor and its inhibition in cancer therapy. *Pharmacol Ther* 1999;82:241-250.

Wouters BG, Giaccia AJ, Denko NC, Brown JM. Loss of p21Waf1/Cip1 sensitizes tumors to radiation by an apoptosis-independent mechanism. *Cancer Res* 1997; 57:4703-4706.

Wrann MM, Fox CF. Identification of epidermal growth factor receptors in a hyperproducing human epidermoid carcinoma cell line. *J Biol Chem* 1979;254:8083-8086.

Wydanski J, Suwinski R, Poltorak S, et al. The tolerance and efficacy of preoperative chemoradiotherapy followed by gastrectomy in operable gastric cancer, a phase II study. *Radiother Oncol* 2007;82(2):132-136.

Xie H, Turner T, Wang MH, Singh RK, Siegal GP, Wells A. In vitro invasiveness of DU-145 human prostate carcinoma cells is modulated by EGF receptor-mediated signals. *Clin Exp Metastasis* 1995;13:407-419.

Yang XD, Jia XC, Corvalan JR, Wang P, Davis CG, Jakobovits A. Eradication of established tumors by a fully human monoclonal antibody to the epidermal growth factor receptor without concomitant chemotherapy. *Cancer Res* 1999;59:1236-1243.

Yarden Y. The EGFR family and its ligands in human cancer signalling mechanisms and therapeutic opportunities. *Eur J Can* 2001;37(Suppl 4):S3-S8.

Yoshida K, Hosoya Y, Sumi S, et al. Studies of the expression of epidermal growth factor receptor in human renal cell carcinoma: a comparison of immunohistochemical method versus ligand binding assay. *Oncology* 1997;54:220-225.

Zhang ZX, Gu XZ, Yin WB, Huang GJ, Zhang DW, Zhang RG. Randomized clinical trial on the combination of preoperative irradiation and surgery in the treatment of adenocarcinoma of gastric cardia (AGC) – report on 370 patients. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 1998;42:929-934.

Zhu A, Shaeffer J, Kolm P, El-Mahdi AM. Epidermal growth factor receptor: an independent predictor of survival in astrocytic tumors given definitive irradiation. *Int J Radiat Oncol Phys* 1996;34:809-815.

Zips D, Baumann M. Anti-VEGF strategies in combination with radiotherapy. In: Nieder C, Milas L, Ang K. *Modification of radiation response*, Berlin, Springer; 2003, p.179-188.

Zips D, Krause M, Yaromina A, et al. Epidermal growth factor receptor inhibitors for radiotherapy: biological rationale and preclinical results. *J Pharm Pharmacol* 2008;60:1019-1028.