

# **Predictive Factors in the Neoadjuvant Chemoradiotherapy of Gastrointestinal Tumors**

**PhD Thesis**

**Róbert Farkas MD**

Program leader: Prof. dr. Örs Péter Horváth MD, PhD, DSc

Consultants: dr. László Mangel MD, PhD

dr. Szabolcs Bellyei MD, PhD

University of Pécs, Medical Faculty

2012

## **1. INTRODUCTION**

Neoadjuvant chemoradiotherapy (CRT) followed by surgery is a widely accepted treatment in gastrointestinal tumors such as loco-regionally advanced esophageal and rectal cancer. From theoretical perspective neoadjuvant CRT offers several advantages compared to postoperative treatment. Better oxygenation of the tumor area leads to increased radiosensitivity enhancing radiation response. Downsizing of the tumor may facilitate optimal surgical removal, which may enable function preservation. The combination of radiation and systemic agents decreases tumor seeding, consequently may improve local and distant control rates. In clinical practice patients can tolerate preoperative treatment better, due to less acute toxicity and lack of postoperative complications. Moreover, radiotherapy target volume for treatment planning is easier to define because of visible tumor mass. One of the main disadvantages of the neoadjuvant treatment strategy is the potential overtreatment of patients with early disease. In addition, not all tumors respond to neoadjuvant CRT, thus non-responding patients may progress during the preoperative therapy and suffer from unnecessary toxicity. The ultimate response to CRT is determined by the quality of treatment, as well as by the genetic make-up of the tumor and the various biochemical pathways implicated in chemoradiosensitivity. Understanding the biology of the disease and pretreatment identification of molecular markers predicting therapeutic response would be invaluable in individualizing patient treatments.

## **2. THESIS**

The aim of this study was to investigate certain molecular-biological markers which characterize the two major cell death pathways as possible clinically useful predictors of response to neoadjuvant CRT for esophageal and rectal cancer. The main objectives of my research were the following:

1. to assess the efficacy and tolerability of the neoadjuvant chemoradiotherapy regimen used in treatment of loco-regionally advanced squamous cell esophageal carcinoma
2. to determine a correlation between the expression of heat shock proteins (HSP90 and HSP16.2) and the clinical or pathological response to neoadjuvant CRT in esophageal cancer
3. to determine a correlation between the Bax/Bcl2 ratio, representing the apoptotic route of cell death, and the clinical or pathological response to neoadjuvant CRT in esophageal cancer
4. to determine a correlation between SOUL implicated in necrotic cell death and the clinical or pathological response to neoadjuvant CRT in esophageal cancer
5. to identify, whether there is any difference in tumor-related protein expression of squamous cell carcinomas arising in the middle or in the upper third of esophagus
6. to evaluate efficacy of neoadjuvant CRT regarding pathological response in loco-regionally advanced rectal cancer and to assess the impact of patient/therapy-related clinical factors on tumor response
7. to identify, whether the expression of heat shock proteins (HSP90 and Hsp16.2) are correlated with histopathological response after neoadjuvant therapy of rectal cancer
8. to identify, whether expression of p-AKt has any influence on histopathological response after neoadjuvant therapy of rectal cancer

9. to evaluate the impact of GHRH-R expression on histopathological response after neoadjuvant therapy of rectal cancer

10. to evaluate the impact of necrosis-inducing heme-binding protein 2 (SOUL) expression on histopathological response after neoadjuvant therapy of rectal cancer to identify one or more tumor-associated proteins as independent predictive markers of the response of individual rectal tumors to neoadjuvant CRT

11. to identify one or more tumor-associated proteins as independent predictive markers of the response of individual rectal tumors to neoadjuvant CRT

### **3. MATERIALS AND METHODS**

#### **3.1. Materials and Methods in Esophageal Study**

##### *Patients and tumor specimens*

Twenty patients with esophageal cancer, candidates for NRCT, were enrolled in the study between 2005 and 2006. All the patients had squamous-cell cancer, with stages cT3-4, cN0-1, cM0, located in the upper two-thirds of the esophagus. The staging procedures included endoscopy with biopsy, endoscopic ultrasound, computed tomography (CT) scan of chest and abdomen and bronchoscopy. From each patient one biopsy was taken from the tumor and one biopsy from the intact part of the esophagus to serve as control. The biopsy from the tumor was divided into two parts. One tumor sample and the normal tissue sample were immediately frozen in liquid nitrogen and the other tumor sample was formalin-fixed for pathological examination. The biochemical examinations were carried out on fresh frozen samples. The patients then received external-beam radiotherapy (total of 36 Gy, fraction dose: 1.8 Gy) and concomitant chemotherapy during the first week of irradiation: cisplatin (100 mg/m<sup>2</sup> intravenously on day 1) and 5-fluorouracil (1000 mg/m<sup>2</sup>/day, continuous intravenous infusion through days 1-5). Four weeks after the completion of RCT, the clinical response to treatment was assessed according to the Response Evaluation Criteria in Solid Tumors (RECIST). Six to nine weeks after the neoadjuvant therapy if there was no evidence of disease progression, the patients underwent definitive surgical resection. Pathological response to treatment was determined by the histological evaluation of the resected specimen. Side-effects were documented in conformity with the Common Terminology Criteria for Adverse Events, Version 3.0.

##### *Immunoblot analysis.*

The tissue specimens were homogenized, then centrifuged for 10 minutes. Isolation of the cytosol and nuclear fractions was carried out by standard laboratory protocols described previously. The samples were equalized to 1 mg/ml total protein concentration using Biuret's method and subjected to SDS-PAGE. The proteins were separated and then transferred to nitrocellulose membranes. The membranes were exposed to the following primary antibodies: anti-Hsp 16.2, anti-SOUL, anti-Hsp 90, anti-Bax and anti-Bcl-2. Appropriate horseradish peroxidase-conjugated secondary antibodies were used and peroxidase labeling was visualized with enhanced chemiluminescence (ECL) using an ECL Western blotting detection system. The developed films were scanned, and the pixel volumes of the bands were determined using NIH Image J software. All the experiments were repeated four times.

##### *Statistical analysis*

Statistical analysis was performed by analysis of variance followed by Student's *t*-test and the Mann-Whitney *U*-test. Statistical significance was set at  $p < 0.05$ . The analyses were performed using the statistical software SPSS for Windows.

### **3.2. Materials and Methods in Rectal Study**

#### ***Patients, Pre-treatment and Posttreatment***

Sixty nine consecutive patients with median age of 59 years (range 34-78), were treated for rectal adenocarcinoma with neoadjuvant CRT between January 2005 and December 2006. All the patients had locally advanced tumors (cT3/T4 and /or cN+ and cM0). Pretreatment workup consisted of digital rectal examination, sigmoidoscopy, biopsy, abdomino-pelvic CT, pelvic MRI, chest x-ray or CT. In all cases 3D planned conformal radiotherapy was carried out with belly board in prone position, with 18 MV photons. Primary tumor as well as lymph nodes at risk were covered with 3 irradiation fields and received 45 Gy in 25 fractions over a period of 5 weeks. As a concomitant chemotherapy, 500 mg/m<sup>2</sup> of 5-Fluorouracil continuous infusion and 30 mg/m<sup>2</sup> Folic acid bolus on days 1-5 of 1<sup>st</sup> and 5<sup>th</sup> weeks of radiotherapy was administered. Four weeks after the completion of CRT, patients were re-staged and definitive surgical resection was performed six to nine weeks after neoadjuvant therapy in 64 cases.

#### ***Histopathological Evaluation***

Pathological response to neoadjuvant treatment was determined by the histological evaluation of the resected specimens using rectal radiotherapy grading system adapted from Mandard et al. This five point tumor regression grading (TRG) is based on the presence of residual tumor cells and the extent of fibrosis and consists of the following: TRG 1 (complete regression) is defined as the absence of residual tumor and fibrosis extending through the different layers of the rectal wall, TRG2 is characterized by the presence of rare residual tumor cells scattered throughout the fibrosis, TRG3 shows an increase in the number of residual tumor cells, but the fibrosis still predominates, TRG4 demonstrates residual tumor outgrowing the fibrosis and TRG5 is characterized by the absence of any tumor regression. In accordance with previous studies in order to simplify the statistical analysis, the TRG was combined into two groups: good responders comprising TRG1-2 and poor responders consisting of TRG 3- 5.

#### ***Immunohistochemistry***

Sections from the pretreatment tumor tissue samples were fixed in formalin and embedded in paraffin. Subsequently, they were incubated with the following primary antibodies: self-developed anti-Hsp 16.2 and anti-SOUL polyclonal primary antibodies, GHRH-R primary antibody, p-AKT and Hsp90 primary antibodies. Immunohistochemical staining was carried out and the staining intensity was recorded semiquantitatively as mild (+), moderate (++) or strong (+++). All slides were assessed by the same experienced pathologist blinded to clinicopathological data.

#### ***Statistical Analysis***

All statistical analyses were carried out using SPSS 16.0 statistical program. Univariate chi-square test was used to compare clinical parameters and biological markers for tumor regression grade. To increase the number of patient per group, the categories of the various variables were combined for these analyses: age over 60 years vs. below 60 years, cT2 vs. cT3 vs. cT4, cN0 vs. cN1-2, distance from the anal verge less than 5 cm vs. between 5 and 10 cm vs more than 10 cm, time to surgery within 7 weeks vs. over 7 weeks. For statistical testing intensity values of immunohistochemistry were dichotomised into low (0, +) and high (++, +++) intensity categories. All parameters were analysed afterwards in a logistic regression multivariate analysis. A *p* value of less than 0.05 was considered statistically significant.

## 4. RESULTS

### 4.1. Results in Esophageal study

#### *Clinical outcome.*

A 65% clinical response rate was found. One patient had complete remission (5%), 12 patients had partial remission (60%), 5 patients had stable disease (25%), 1 patient had progressive disease (5%) and 1 patient died during the treatment (5%). The patients with complete or partial remission underwent definitive surgery. The following histological response was observed: no residual tumor tissue in 2 patients (10%), down-staging of the tumor size (T) or lymph node involvement (N) in 6 (30%) and 5 (25%) cases, respectively. Complete (R0) resection was possible in 9 cases (70%) and no perioperative mortality occurred. Grade 3 or 4 gastrointestinal (30%), hematological (15%) and pulmonary (15%) side-effects occurred, one patient (5%) died due to severe sepsis.

#### *Detection of possible new markers by Western-blot.*

All twenty squamous-cell esophageal cancer and corresponding normal esophageal tissue samples were examined by Western-blot. The tumor samples from the patients with no clinical response contained approximately double the level of Hsp 90 and Hsp 16.2, significantly higher than responding tumors ( $p=0.049$  and  $p=0.019$  respectively). They also expressed SOUL at a higher level and had a lower Bax/Bcl-2 ratio than those with good clinical response, but these results were not significant ( $p=0.247$  and  $p=0.883$ ). The results of the pathological examination were similar to the clinical results. The tumors with no histological response expressed twice as much Hsp90 ( $p=0.0005$ ) and Hsp16.2 ( $p=0.002$ ) and 1.5 times more SOUL ( $p=0.218$ ) than the responders. On the other hand, a lower Bax/Bcl-2 ratio was seen in the non-responders compared to the responders, but as SOUL this result was not significant ( $p=0.499$ ). Particularly interesting results were observed when the samples were analyzed according to the tumor location. The upper tract tumors expressed the Hsp proteins in significantly lower quantities than the tumors located in the lower-third of the esophagus (Hsp90 upper vs. middle-third  $p=0.006$  and Hsp16.2 upper vs. middle-third  $p=0.012$ ). The SOUL protein was also expressed in significantly smaller quantities in the upper-third of the esophagus ( $p=0.047$ ). Although the Bax/Bcl-2 ratio seemed to be lower in the middle-third tumors, the difference was not significant ( $p>0.05$ ).

### 4.2. Results in Rectal Study

#### *Histopathological Response to Neoadjuvant CRT*

Curative resection was performed in 64 (92 %) cases. The surgical intervention was a low anterior resection in 49 cases (70%) or abdomino-perineal resection in 15 cases (21%), with R0 resection rate of 90%. Pathological evaluation of response to preoperative CRT in resected rectum specimens revealed complete response (TRG1) in 11 of 64 cases (17%) and significant response (TRG2) in 20 of 64 cases (31%). Hence good responders encompassing TRG1 and TRG2 categories account for 48% of patients, while poor responders including TRG3 for 19 cases (30%), TRG4 for 12 cases (19%) and TRG5 for 2 cases (3%) represented the remaining 52% of the patients.

#### *Protein Expression in Pre-treatment Biopsy Specimens*

Immunohistochemical evaluation of the pre-treatment biopsy specimens showed high intensity staining (++, +++) for SOUL, Hsp 16.2, Hsp90 and for GHRH-R in 67%, 61%, 58% and 25% of the cases, respectively. High intensity p-Akt staining was found in all the rectum biopsy specimens.

### ***Association Between Pre-treatment Clinical Data and Histopathological Response to CRT***

None of the pre-treatment clinical characteristics except the elapsed time interval between the end of neoadjuvant therapy and surgery was found to be statistically related to histopathological response. The patients who were operated on 7 weeks or more after CRT ended, had a significantly higher chance of showing a good response to neoadjuvant treatment, than those who underwent surgery within 7 weeks (63% versus 37%,  $p=0.041$ ) following CRT. Univariate analysis of the correlation between other clinical parameters including age, sex, distance from anal verge, pre-treatment cT or cN and tumor regression grade revealed no statistically significant association.

### ***Association between Protein Expression and Histopathological Response to CRT***

Among the markers evaluated in pre-treatment biopsy specimens, SOUL, Hsp16.2 and p-Akt staining did not show a significant association with tumor regression grade. However, high levels of Hsp90 and GHRH-R expression in the pre-treatment tumor biopsies were significantly correlated with poor histopathological response ( $p=0.00002$ ,  $p=0.00006$  respectively). Multivariate analyses confirmed that the association of GHRH-R and Hsp90 expression with the therapeutic response was significant (for pGHRH odds ratio, 0.198; 95% confidence interval, 0.042-0.941;  $p<0.05$  and for Hsp90 odds ratio, 0.218; 95% confidence interval, 0.074-0.647;  $p<0.001$ ) after data was adjusted to account for the clinicopathological parameters and expression of the other markers.

## **5. CONCLUSIONS**

In conclusion, our results suggest, in line with previous studies, that response to neoadjuvant therapy depends on the treatment protocol including the radiation dose and time between CRT and operation as well as on the biological features of tumor. The identification of biomarkers predicting the responses would allow more effective and individualized treatment.

1. In the present retrospective study of esophageal cancer the rate of complete responses achieved with neoadjuvant chemoradiotherapy was lower than pCR rates reported in the literature, which implies a need for escalation of radiation dose. However, the serious and fatal side effects related to CRT scheme indicate that any intensification of therapy requires thorough selection of patients.
2. In tumor samples from esophageal cancer patients with no clinical or pathological response to neoadjuvant CRT significantly higher levels of HSP90 and HSP16. 2 expression were detectable than in responding tumors, indicating the role of heat shock proteins in resistance against chemo-radiotherapy.
3. Our data demonstrate no significant association between the response of esophageal tumors to CRT and BAX/Bcl2 ratio representing the apoptotic form of cell death.
4. The present study did not find a significant association between the response of esophageal tumors to CRT and the expression of SOUL, a protein implicated in necrotic cell death.
5. Upper tract esophageal tumors expressed HSP proteins and SOUL protein in significantly lower quantities than middle-third tumors, which may contribute to their different sensitivity to CRT.
6. The current investigation indicates that pre-treatment clinical parameters do not influence the chemo-radiosensitivity of rectal cancer, whereas the time interval longer than 7 weeks between neoadjuvant CRT and operation is associated with better tumor response.

7. As regards cytoprotective heat shock proteins, the level of immunohistochemical staining of Hsp 16.2 was not related to tumor regression, whereas the expression of HSP90 was significantly correlated with poor histopathological response to CRT for rectal cancer.

8. The results of our study do not support the view that the expression of anti-apoptotic p-AKT has any influence on histopathological response to CRT for rectal adenocarcinomas.

9. A significant correlation between the expression of GHRH-R and poor histopathological response to neoadjuvant CRT for rectal cancer was demonstrated.

10. In the present study the level of immunohistochemical staining of necrosis-facilitating SOUL was not related to histopathological regression of rectal cancer after neoadjuvant CRT.

11. Our data indicate that GHRH-R and Hsp90 may serve as pretreatment predictors of tumor regression to neoadjuvant CRT in rectal cancer. Moreover GHRH-R and Hsp90 hold promise of providing novel therapeutic options for poor responder patients. Nevertheless, before any clinical implications can be drawn, further studies are warranted to confirm our results.

## 6. PUBLICATIONS

### Publications in the topic:

**Farkas R**, Pozsgai E, Schally AV, Szigeti A, Szigeti E, Laszlo Z, Papp A, Gomori E, Mangel L, Horvath PO, Bellyei S. *Possible predictors of histopathological response to neoadjuvant chemoradiotherapy for rectal cancer*. J Cancer Res Clin Oncol. 2012 Mar;138(3):387-95. PMID: 22160161 **IF: 2,485** (2010)

**Farkas R**, Pozsgai E, Bellyei S, Cseke L, Szigeti A, Vereczkei A, Marton S, Mangel L, Horvath OP, Papp A. *Correlation between tumor-associated proteins and response to neoadjuvant treatment in patients with advanced squamous-cell esophageal cancer*. Anticancer Res. 2011 May;31(5):1769-75. PMID: 21617238 **IF: 1,656** (2010)

Papp A, Cseke L, **Farkas R**, Pavlovics G, Horvath G, Varga G, Szigeti A, Bellyei S, Marton S, Poto L, Kalmar K, Vereczkei A, Pozsgai E, Horvath OP. *Chemo-radiotherapy in Locally Advanced Squamous Cell Oesophageal Cancer-are Upper Third Tumours more Responsive?* Pathol Oncol Res. 2010 Jun;16(2):193-200. Epub 2009 Sep 17. PMID:19760123 **IF:1,152**

Rápoli E, Szigeti A, **Farkas R**, Bellyei S, Boronkai A, Papp A, Gömöri E, Horváth OP, Mangel L. *Neoadjuvant radiochemotherapy in the treatment of locally advanced rectal tumors* Magy Onkol. 2009 Dec;53(4):345-9. [Article in Hungarian] IF:0

Bellyei S, Szigeti A, Pozsgai E, Boronkai A, Gomori E, Hocsak E, **Farkas R**, Sumegi B, Gallyas F Jr. *Preventing apoptotic cell death by a novel small heat shock protein*. Eur J Cell Biol. 2007 Mar;86(3):161-71. Epub 2007 Feb1. PMID: 17275951 **IF: 3,224**

Papp A, Cseke L, Pavlovics G, **Farkas R**, Varga G, Márton S, Pótó L, Esik O, Horváth OP. *The effect of preoperative chemo-radiotherapy in the treatment of locally advanced squamous cell carcinoma in the upper- and middle-thirds of the esophagus*. Magy Seb. 2007 May-Jun;60(3):123-9. [Article in Hungarian] IF:0

**IF in the topic: 8,517**

### Additional publications:

Kovács P, Sebestyén Z, **Farkas R**, Bellyei S, Szigeti A, Liposits G, Hideghéty K, Dérczy K, Mangel L. *A pelvic phantom for modeling internal organ motions*. Med Dosim. 2011 Autumn;36(3):250-4. Epub 2010 Jun 18. PMID: 20561777 **IF: 1,256** (2009)

Sebestyén Z, Kovács P, Gulybán A, **Farkas R**, Bellyei S, Liposits G, Szigeti A, Esik O, Dérczy K, Mangel L. *Conkiss: Conformal Kidneys Sparing 3D noncoplanar Radiotherapy Treatment for Pancreatic Cancer as an Alternative to IMRT*. Med Dosim. 2011 Spring;36(1):35-40. Epub 2010 Jan 22. PMID: 20097060 **IF: 1,256** (2009)

Szigeti A, Minik O, Hocsak E, Pozsgai E, Boronkai A, **Farkas R**, Balint A, Bodis J, Sumegi B, Bellyei S. *Preliminary study of TIP47 as a possible new biomarker of cervical dysplasia and invasive carcinoma*. Anticancer Res. 2009 Feb;29(2):717-24. PMID: 19331227 **IF: 1,428**



Gulybán A, Kovács P, Sebestyén Z, **Farkas R**, Karácsonyi G, Dérczy K, Hideghéty K, Esik O. *Multisegmented tangential breast fields: a rational way to treat breast cancer*. *Strahlenther Onkol.* 2008 May;184(5):262-9. PMID: 18427757 **IF: 3,005**

Kis E, Szatmári T, Keszei M, **Farkas R**, Esik O, Lumniczky K, Falus A, Sáfrány G. *Microarray analysis of radiation response genes in primary human fibroblasts*. *Int J Radiat Oncol Biol Phys.* 2006 Dec 1;66(5):1506-14. PMID:17069989 **IF: 4,463**

Al-Farhat, Liposits G, Boronkai Á, **Farkas R**, Lengyel E, Esik O. *A kemoterápiás dózisintenzitás vizsgálata emlőtumoros betegek ellátása során*, *Current Option in Oncology*, Magyar Kiadás, 2006, 2: 21-24 IF:0

Erfan J, Olajos J, Bellyei Sz., **Farkas R**, Liposits G, Esik O. The state of Hungarian radiotherapy *Rep.Pract. Oncol.Radiother.*, 2005, 10: 209-216 IF:0

**Additional IF: 11,405**

**Total IF: 19,922**

#### **Abstracts in the topic:**

**Farkas R**, Pozsgai É, Bellyei Sz, László Z, Szigeti A, Sebestyén K, Rápolti E, Gömöri É, Papp A, Mangel L. *Klinikai és molekuláris prediktív markerek vizsgálata rectumtumoros betegeknél* *Magyar Onkológia* 55:129–146, 2011

László Z, **Farkas R**, Kalincsák J, Mangel. *L Neoadjuváns radiokemoterápiás kezelés hatékonyságának vizsgálata és prediktív markerek keresése lokoregionálisan előrehaladott nyelőcsőtumorok esetében* *Magyar Onkológia* 55:129–146, 2011

Rápolti E., **Farkas R.**, Szigeti A., Kovács P. Bellyei Sz., Stefanits K., Esik O., Dérczy K., Mangel L.. *A neoadjuváns radiokemoterápia a lokálisan előrehaladott rektumtumorok ellátásában.* *Magyar Onkológia* 53: 187-228, 215, 2009

Papp A, Cseke L, **Farkas R**, Bellyei Sz, , Varga G, Szigeti A, Boronkai Á, Mislai Zs, Dérczy K, Pozsgai É, Mangel L, Horváth ÖP. *A kemoradioterápia hatékonysága és tumorasszociált fehérjék közötti összefüggés vizsgálata előrehaladott nyelőcsőrákos betegeknél* *Magyar Sebészet* 2008; 61(3): 145–208 , 180

Papp A., Cseke L., Pavlovics G., **Farkas R.**, Márton S., Varga, G., Potó L., Horváth ÖP. *Locally advanced squamous cell cancer of the cervical esophagus: role of multimodal therapy*, *Irish Journal of Medical Science* 2007 Volume 176 Suppl 5 S216

**Farkas R.**, Al-Farhat Y., Gulybán Á, Kovács P., Bellyei S., Stefanits K., Dérczy K., Horváth O. P., Illényi L, Süle N., Szilágyi K., Bogner B., Esik O: *Neoadjuvant Radiochemotherapy of Locally/Regionally Advanced Rectal Cancer is a Standard Treatment Option* *Radiotherapy and Oncology* 2006, Volume 81, Supplement 1 S237

**Farkas R.**, Al-Farhat Y., Gulybán Á., Kovács P. Bellyei Sz., Stefanits K., Dérczy K., Horváth Ö. P., Süle N., Hideghéty K., Esik O.: *A neoadjuváns radiokemoterápiá hatékony eljárás a lokálisan/ regionálisan előrehaladott rektumtumorok ellátására* *Magyar Onkológia* 49. évfolyam, 3. szám 2005; 255-279

## Other Abstracts:

Sebestyén Z., Kovacs P., Sebestyen K., **Farkas R.**, Bellyei S., Szigeti A. Mangel L. *CONRES: Conformalrectum sparing 3D non-coplanar radiotherapy treatment for prostate cancer as an alternative to IMRT*. Radiotherapy and Oncology 2011, Volume 99, Supplement 1 S577

Sebestyén K, Kovács P, Sebestyén Zs, **Farkas R**, Bellyei Sz, Olaszné HJ, Kalincsák J, Percsi P, Hideghéty K, Mangel L *Patkány központi idegrendszer-besugárzás sztereotaktikus módszerrel – BrainLab rendszer komplex értékelése Magyar Onkológia 55:129–146, 2011*

Varga Zs K, Magyary I, **Farkas R**, Hideghéty K *Besugárzás rövidtávú érrendszerei és központi idegrendszeri hatásai fejlődő zebradánió (Danio rerio) halembrión Magyar Onkológia 55:129–146, 2011*

Dérczy K., **Farkas R.**, Kovács P., Sebestyén Zs., Arany M. *CT-alapú besugárzástervezés során észlelt patológiás folyamatok értékelése*. Magyar Onkológia 53: 187-228, 2009

Gallainé Földvári D., Rápolti E., Sebestyén Zs., Gulybán Á., **Farkas R.**, Bellyei Sz., Horváth Zs., Mangel L., Kovács P.. *Sztereotaxiás sugársebészeti kezelés: módszerek és eredmények*. Magyar Onkológia 53: 187-228, 197, 2009

Kovács P., Sebestyén Zs., **Farkas R.**, Bellyei Sz., Dérczy K., Szigeti A., Liposits G., Mangel L. *A belsőszerv-mozgás dózishatásának vizsgálata verifikációs fantomban Magyar Onkológia 53: 187-228, 200, 2009*

Kovács P., Sebestyén Zs., Hideghéty K., Gulybán Á., **Farkas R.**, Bellyei Sz., Szigeti A., Mangel L. *Betegpozíció reproválhatóságának vizsgálata lézeres és infravörös pozicionáló rendszereknél*. Magyar Onkológia 53: 187-228, 201, 2009

Lőcsei Z., **Farkas R.**, Bellyei Sz., Hideghéty K., Sebestyén K., Kovács P., Mangel L. *PET/CT alkalmazása nem-kissejtes tüdődaganatos betegek sugárkezeléséhez*. Magyar Onkológia 53: 187-228, 206, 2009

Olaszné Halász J., Szigeti R. E., Sebestyén Zs., **Farkas R.**, Kovács P., Sebestyén K., Gallainé Földvári D., Szigeti A., Mangel L. *Az alacsony rizikójú prosztatatumoros betegek 3D konformális besugárzástervezési technikáinak kiértékelése*. Magyar Onkológia 53: 187-228, 212, 2009

Sebestyén Zs., Kovács P., Gulybán Á., **Farkas R.**, Bellyei Sz., Szigeti A., Gallainé Földvári D., Mangel L., *Modern 3Dkonformális craniospinalis besugárzási technika*. Magyar Onkológia 53: 187-228, 216, 2009

Sebestyén Zs., Kovács P., Gulybán Á., **Farkas R.**, Bellyei Sz., Szigeti A., Liposits G., Dérczy K., Mangel L. *Pankreásztumorok besugárzástervezése konkiss technikával*. Onkológia 53: 187-228, 217, 2009

Sebestyén Z., Kovács P., **Farkas R.** Bellyei S., Liposits G., Szigeti A., Dérczy K., Gulybán A., Ésik O., Mangel L. *The conformal kidney sparing planning method to treat pancreatic cancer*. Radiotherapy and Oncology 2008, Volume 88, Supplement 2 S388

Kovács P., Sebestyén Z., **Farkas R.** Bellyei S., Dérczy K., Szigeti A., Liposits G., Gulybán A., Ésik O., Mangel L. *Organ motion correction with patient shifting during prostate cancer*

*radiotherapy: effect on delivered dose.* Radiotherapy and Oncology 2008, Volume 88, Supplement 2 S422

Gulybán A, Földvari D., Kovács P, Bellyei Sz., **Farkas R**, Strasz A., Sebestyén Zs Esik O., Dérczy K, Hideghéty K., *Multisegmented tangential breast fields: an effective step towards IMRT without a significantly higher secondary cancer risk.* Radiotherapy and Oncology 2006, Volume 81, Supplement 1 S172

Y. Al-Farhat, P. Kovács, Á. Gulybán, **R. Farkas**, A. Boronkai, D. Kelemen, O. Ésik : *Radiochemotherapy for stage III pancreatic cancer.* Radiotherapy and Oncology 2006, Volume 81, Supplement 1 S303

K. Hideghety, Z. Kahan, L. Thurzó, Á. Gulybán, **R. Farkas**, S. Bellyei, O. Ésik, C. Mitine, K. Slosarek: *Interim report on clinical testing of a comprehensive solution for patient positioning and immobilisation for high tech RT.* Radiotherapy and Oncology 2006, Volume 81, Supplement 1 S434

**Farkas R.**, Bellyei Sz., Gulybán Á., Kovács P., Csere T., Sinkó E., Hideghéty K., Ésik O.: *A beállítási pontosság vizsgálata prostatatumoros betegek sugárkezelése során.* Magyar Onkológia 49. évfolyam, 3. szám 2005 255-279

Bellyei Sz., Kovács P., Gulybán Á., **Farkas R.**, Hideghéty K., Ésik O.: *Összehasonlító elemzés a rizikószervek dózisterhelésének csökkentéséről különböző emlő besugárzási technikák mellett.* Magyar Onkológia 49. évfolyam, 3. szám 2005 255-279

Bellyei Sz., Szigeti A., **Farkas R.** Boronkai Á., Berki T., Bódis J, Ésik O. Sümegi B.: *A méhnyakrák monitorozására alkalmas PP17 fehérjecsald alaputatásai és klinikai vizsgálata.* Magyar Onkológia 49. évfolyam, 3. szám 2005 255-279

Gulybán Á. Bellyei Sz., **Farkas R.** Strasz A. Kovács P., Gallainé Földvári D., Dérczy K., Hideghéty K., Ésik O.: *Az emlőbesugárzásnál alkalmazott tangencionális mezők multisegmentálásával javítható a céltérfogat dózis-homogenitása.* Magyar Onkológia 49. évfolyam, 3. szám 2005 255-279

### **Presentations in the topic:**

**Farkas R**, Sz. Bellyei, A. Szigeti, Á. Boronkai, P. Kovács, Z. Sebestyén, K. Dérczy, É. Pozsgai, A. Papp, L. Cseke, K. Hideghéty, O. Ésik, O.P. Horváth, L. Mangel: *Predictors of response to chemo-radiotherapy for esophageal squamous cell carcinoma: Association of tumor related protein expression with outcome of neoadjuvant treatment.* 11th World Congress of the International Society for the Disease of the Esophagus, Budapest, September 10-13. 2008.

Papp A., Cseke L., Pavlovics G., **Farkas R**, Márton S., Varga G., Potó L, Horváth OP. *Locally advanced squamous cell cancer of the cervical esophagus: role of multimodal therapy.* 11th World Congress of the International Society for the Disease of the Esophagus, Budapest, September 10-13. 2008.

**Farkas Róbert**, Bellyei Szabolcs, Szigeti András, Boronkai Árpád, Gulybán Ákos, Kovács Péter, Sebestyén Zsolt, Miszlai Zsuzsanna, Horváth Örs Péter, Papp András, Hideghéty Katalin, Pozsgai Éva, Ésik Olga, Mangel László. *A neoadjuváns radiokemoterápia*

*hatékonysága és tumor asszociált fehérjék közötti összefüggés vizsgálata nyelőcsőtumoros betegeknél.* Magyar Sugárterápiás Társaság Kongresszusa, Debrecen, 2007

Papp, Cseke, **Farkas R.**, Pavlovics G, Varga G, Márton S, Potó L, Ésik o., Horváth ÖP *A neoadjuváns kemo-radioterápia előnyei nyaki lokalizációjú előrehaladott nyelőcső laphámrákok sebészi kezelésében* MST Kísérletes Sebészi szekció Kongresszusa, Pécs, 2007

Szigeti A, **Farkas R.**, Al-Farhat Y, Gulybán Á, Kovács P, Bellyei Sz, Stefanits K, Dérczy K, Horváth OP, Papp A, Süle N, Hígehéthy K, Ésik O, Mangel L: *A neoadjuváns radiokemoterápia hatékony eljárás a lokoregionálisan előrehaladott rectumtumrok ellátására,* Magyar Sugárterápiás Társaság Kongresszusa, Debrecen, 2007

#### **Other presentations:**

Bellyei Szabolcs, **Farkas Róbert**, Szigeti András, Mislai Zsuzsa, Kovács Péter, Ésik Olga, Bódis József, Mangel László *A neoadjuváns radiokemoterápia és azt követő Wertheim műtét hatékony eljárás lehet a lokálisan/regionálisan előrehaladott cervixdaganatok ellátására.* Magyar Sugárterápiás Társaság Kongresszusa, Debrecen, 2007

Al-Farhat Y, Kovács P, Gulybán Á, **Farkas R.**, Liposits G, Kelemen D, Horváth ÖP, Ésik Mangel L. *III. stádiumú pancreastumrok multimodális kezelése* Magyar Sugárterápiás Társaság Kongresszusa, Debrecen, 2007

**Farkas R.** Bellyei Sz. Gyulybán Á. Kovács P., Strasz A. Ésik O., Hideghéthy K.: *Az elmőbesugárzás minőségellenőrzési lépései a Pécsi Tudományegyetemen* Szegedi Emlőrák Szimpózium, Szeged, 2005. szeptember 16-18.

Bellyei Sz., Kovács P., Gulybán Á. **Farkas R.**, Hideghéthy K. Ésik O.: *Rizikószervek dózisterhelésének csökkentési lehetőségei emlőbesugárzás során* Szegedi Emlőrák Szimpózium, Szeged, 2005. szeptember 16-18.

**Prediktív faktorok a gasztrointesztinális daganatok neoadjuváns  
kemoradioterápiájában**

**PhD értekezés tézisei**

**dr. Farkas Róbert**

Programvezető: Prof. dr. Horváth Örs Péter

Témavezetők: dr. Mangel László

dr. Bellyei Szabolcs

Pécsi Tudományegyetem, Általános Orvostudományi Kar

2012

## 1. BEVEZETÉS

A műtétet megelőző neoadjuváns kemoradioterápia (KRT) széles körben elfogadott kezelési módszer loko-regionálisan előrehaladott nyelőcső- és végbéldaganatok ellátásában. A neoadjuváns KRT számos elméleti előnnyel rendelkezik a postoperatív kezeléshez képest. A tumor műtétet megelőző jobb oxigén ellátottsága nagyobb sugárérzékenységet jelent, a daganat megkisebbitése elősegíti annak sebészi eltávolítását és bizonyos esetekben szervkímélő műtétek végrehajtását teszi lehetővé. A szisztémás kemoterápia és sugárkezelés kombinálása nem csak a lokális kontrollt javítja, de a mikrometasztázisok eltávolítása révén a távoli áttétek számát is csökkentheti. A klinikai gyakorlatban a preoperatív kezelés jobban tolerálható, mint a postoperatív, mivel kevesebb akut mellékhatással jár és a beteg még nem szenved a műtéti szövödményektől. További technikai előny, hogy a sugárterápiás céltér fogat meghatározása könnyebb műtét előtt, hiszen a daganat képkotókkal kimutatható. A neoadjuváns kezelés ugyanakkor számos hátránnyal is jár. A korai stádiumban diagnosztizált betegek esetében túlkezelést jelenthet. Nagyobb problémát jelent, hogy nem minden tumor reagál egyformán a kezelésre. A terápiára nem reagáló daganatok progrediálhatnak a kezelés ideje alatt rontva a sebészi eltávolítás esélyeit, ráadásul ezek a betegek feleslegesen szenvednek a KRT okozta mellékhatásoktól. A neoadjuváns kezelésre adott terápiás válasz a kezelés minőségétől és daganat kemoterápia- illetve sugárkezelés iránti érzékenységét meghatározó genetikai és biokémiai tulajdonságoktól is függ. A rosszindulatú daganatok biológiai jellemzőinek jobb megértése és olyan molekuláris markerek azonosítása melyek a kezeléssel szembeni rezisztencia kialakulását befolyásolják, nagyban hozzájárulnának a betegek terápiájának individualizálásához.

## 2. CÉLKITŰZÉSEK

A munkám fő célja a nyelőcső- és végbéldaganatok neoadjuváns KRT-ra adott terápiás választ előrejelző markerek keresése volt. Ennek során a neoadjuváns kezelésekre hatékonyságát befolyásoló faktorok meghatározására, ezen belül a két főbb sejthalál útvonalban szereplő fehérjék prediktív szerepének vizsgálatára törekedtem. A dolgozat célkitűzései az alábbi pontokban foglalhatók össze:

1. Loko-regionálisan előrehaladott nyelőcső laphámrákok kezelésében az intézetünkben alkalmazott neoadjuváns kemoradioterápia hatékonyságának és tolerálhatóságának a vizsgálata.
2. Hő-sokk fehérjék expressziója (HSP90 és HSP16.2) és a neoadjuváns KRT-ra adott klinikai és patológiai válasz közötti összefüggés meghatározása nyelőcsődaganatoknál.
3. Az apoptotikus sejthalál utat jellemző Bax/Bcl2 arány és a neoadjuváns KRT-ra adott klinikai és patológiai válasz közötti összefüggés meghatározása nyelőcsődaganatoknál.
4. A neurotikus sejthalál útban szerepet játszó hem-kötő fehérje (SOUL) expressziója és a neoadjuváns KRT-ra adott klinikai és patológiai válasz közötti összefüggés meghatározása nyelőcsődaganatoknál.
5. Megvizsgálni a középső és felső harmadban diagnosztizált nyelőcső laphámkarzinómák közti különbséget a vizsgált fehérjék expressziója szempontjából.

6. Meghatározni a loko-regionálisan előrehaladott végbéldaganatok kezelésében alkalmazott neoadjuváns KRT-val elérhető patológiai válasz arányát, valamint a kezelés paramétereinek és a betegre jellemző klinikai faktornak a hatását a tumor válaszra.
7. Megvizsgálni a hő-sokk fehérjék expressziója (HSP90 and HSP16.2) és a neoadjuváns KRT-ra adott hisztopatológiai válasz közötti összefüggést végbéldaganatoknál.
8. A p-AKT expressziója és a neoadjuváns KRT-ra adott hisztopatológiai válasz közötti összefüggés meghatározása végbéldaganatoknál.
9. A GHRH-R expressziója és a neoadjuváns KRT-ra adott hisztopathológiai válasz közötti összefüggés meghatározása végbéldaganatoknál.
10. A neurotikus sejthalál útban szerepet játszó hem-kötő fehérje 2 (SOUL) expressziója és a neoadjuváns KRT-ra adott hisztopatológiai válasz közötti összefüggés meghatározása végbéldaganatoknál.
11. A vizsgálat fehérjék neoadjuváns kemoradioterápiára adott válasz előrejelzésében független prediktív markerekként történő alkalmazásának értékelése.

### **3. BETEGANYAG ÉS MÓDSZER**

#### **3.1. Betegek és módszer a nyelöcsődaganatok vizsgálata során**

##### ***Betegek és daganatos minták***

2005 és 2006 között húsz felső és középső harmadra lokalizálódó cT3-T4, cN0-1, cM0 stádiumú nyelöcső lahámrákos beteget vizsgáltunk. A betegek kivizsgálása nyelöcsőtükrozt, biopsziát, endoszkópos ultrahangot, hasi és mellkasi CT-t, légcső-tükrozt foglalt magában. Minden beteg esetében biopsziás mintavétel történt mind a tumoros, mind az ép nyelöcsőszakaszból. A tumorból vett minta kettéosztását követően a normál nyelöcső minták és a tumoros minta fele folyékony nitrogénnel fagyasztásra került biokémiai vizsgálatok céljára. A tumoros minták másik feléből formalinos fixálást követően patológiai vizsgálat történt. A neoadjuváns kezelés részeként a betegek 36 Gy összdózisú sugárkezelésben részesültek napi 1,8 Gy frakciódózissal valamint az első kezelési héten konkurens ciszplatin ( $100 \text{ mg/m}^2$  iv. első kezelési nap) és 5-fluorouracil ( $1000 \text{ mg/m}^2/\text{nap}$ , folyamatos infúzió 1-5 napon keresztül). Négy héttel a KRT-t követően a klinikai válasz értékelése a RECIST (Response Evaluation Criteria In Solid Tumors) kritériumok szerint történt. Hat-kilenc héttel a kezelés után-amennyiben progresszió nem igazolódott- a beteg műtetre került. A kezelésre adott patológiai válasz meghatározása a sebészeti rezekátum szövettani feldolgozása, míg a mellékhatások dokumentálása a CTCAE 3.0 verziója alapján történt.

##### ***Immunoblot vizsgálat***

A biopsziás mintákban homogenizálás, centrifugálást követően a citoszól- és a nukleáris fehérjék szeparálása történt. Valamennyi mintát a Biuret módszerrel egységesen  $1 \text{ mg/ml}$  összfehérje koncentrációra állítottuk be és SDS-poliakrilamid gélelektroforézist végeztünk. A fehérjéket gélen történő szétválasztását követően blotting technikával nitrocellulóz filterre vittük át. A membránokat a következő elsődleges antitestekkel kezeltük: anti-Hsp 16.2, anti-SOUL, anti-Hsp 90, anti-Bax, anti-Bcl-2, majd HRP-vel konjugált második antitesttel reagáltattuk. A peroxidáz reakciókat kemolumineszcens módszerrel tettük láthatóvá, a kapott

bandeket digitalizáltuk és NIH Image J szoftverrel értékeltük. Valamennyi kísérletet négy alkalommal megismételtünk, melyből átlagoltunk.

### ***Statisztikai értékelés***

A statisztikai értékeléshez Student's-t tesztet és Mann-Whitney U tesztet használtunk  $p < 0.05$  statisztikai szignifikancia szint mellett. Az értékelés SPSS 16.0 programmal történt.

## **3.2. Betegek és módszer végbéldaganatok vizsgálata során**

### ***Betegek***

2005. január és 2006. december között hatvankilenc végbél adenocarcinómában szenvedő beteg (átlag életkor 59 év, 34-78 év) részesült neoadjuváns kemoradioterápiában az intézetünkben. Valamennyi beteg loko-regionálisan előrehaladott betegségben (cT3/T4 és/vagy cN+ és cM0) szenvedett. A kezelés előtti kivizsgálás rectalis digitalis vizsgálatot, colonoscopiát, biopsziás mintavételt, hasi CT-t és kismedencei MR-t és mellkas rgt vizsgálatot jelentett. Minden esetben 3D CT alapú besugárzástervessel konformális külső besugárzás történt hason fekvő helyzetben, „belly-board” vékonybél védelemmel. A primer tumort és a regionális nyirokcsomókat magában foglaló céltérfogatra 3 besugárzási mezőből 25 frakcióban 45 Gy összdózisú 18 MV energiájú foton besugárzás került leadásra. A betegek a sugárkezelés első és ötödik hetében konkurens kemoterápiát kaptak 5 napon keresztül 500 mg/m<sup>2</sup>/nap 5-fluorouracil folyamatos infúzió és 30 mg/m<sup>2</sup>/nap leukovorin bolus formájában. Négy héttel a KRT befejezése után re-staging vizsgálatok történtek, majd a kezelést követő hatodik és kilencedik hét között 64 esetben került sor a műtéti megoldásra.

### ***Hisztopatológiai válasz értékelése***

A neoadjuváns kezelésre adott patológiai válasz értékelése a módosított Mandard-féle grádusok szerint történt. Ez a tumor regressziós grádus rendszer a maradék daganat sejtek és a fibrotikus kötőszövet aránya alapján öt fokozatra osztható: TRG 1 (teljes regresszió) a daganat sejtek teljes hiányát jelenti, TRG2 a fibrotikus szöveten belül elszór maradó daganat sejteket jelent, TRG3 nagyobb mennyiségű maradó daganatsejtre utal, de a fibrózis dominál a metszetekben, TRG4 esetén a daganatsejtek aránya meghaladja fibrózis mértékét, TRG5 esetén regresszió nem észlelhető. Számos korábbi vizsgálathoz hasonlóan a betegeket a kezelésre jól reagáló (TRG1-2) és rosszul reagáló (TRG 3- 5) csoportokra osztottam.

### ***Immunohisztokémiai vizsgálatok***

Kezelés előtti biopsziás minták formalinos fixálást és paraffinos beágyazását követően az alábbi primer antitestekkel végeztünk immunhisztokémiai vizsgálatot: Hsp 16.2, SOUL, GHRH-R, p-AKT és Hsp90. A reakció mértékét semi-kvantitatív módon értékeltük gyenge (+), közepes (++) és erős (+++) festődés szerint. Valamennyi metszetet ugyanaz a tapasztalt, a klinikai adatokat nem ismerő patológus értékelte.

### ***Statisztikai értékelés***

Valamennyi statisztikai értékelés SPSS 16.0 statisztikai programmal történt. Univariáns khi-négyzet próbát alkalmaztunk a klinikai-, biológiai paraméterek és a tumor regressziós grádus közötti összefüggés vizsgálatára. A klinikai faktorok vizsgálatakor az alábbi alcsoportokra osztottuk a betegeket: 60 év alatti vagy 60 év feletti, cT2 vagy cT3 vagy cT4, cN0 vagy cN1-2, 5 cm-nél kisebb vagy 5-10 cm közötti vagy 10 cm feletti távolság az anusgyűrűtől, 7 hétnél rövidebb vagy hosszabb idő a kezelés és a műtét között. Az immunhisztokémiai vizsgálat eredményei a festődés mértéke alapján alacsony és magas intenzitású csoportokra oszlottak. Valamennyi paramétert vizsgáltat multi-variáns analízissel is elvégeztük. Az értékelések  $p < 0,05$  statisztikai szignifikancia szint mellett történtek.



## 4. EREDMÉNYEK

### 4.1. A nyelőcső daganatok vizsgálata során kapott eredmények

#### *Klinikai válasz*

65%-os klinikai válaszarányt észleltünk a re-staging vizsgálatok során. Egy beteg (5%) teljes regressziót, 12 beteg (60%) részleges regressziót mutatott. 5 betegnél (25%) változatlan státusz maradt, 1 betegnél (5%) találtunk progresszív betegséget a kezelés után, egy beteg (5%) pedig elhunyt a kezelés során. A részleges vagy teljes regressziót mutató betegek műtétben részesültek. A sebészi rezekátumok feldolgozás alapján teljes regresszió (pCR) 2 esetben (10%), stádiumcsökkenést jelentő regresszió a T kategória vonatkozásában 6 esetben (30%), míg az N kategória vonatkozásában 5 esetben (25%) fordult elő. Komplet sebészi eltávolítás (R0) 9 betegnél (70%) volt lehetséges. A vizsgált betegek között peri-operatív elhalálozás nem történt. A kezelés alatt súlyos grade 3-4-es gastrointesztinális (30%), hematológiai (15%) és pulmonológiai (15%) mellékhatásokat észleltünk, egy esetben (5%) a beteg halálához vezető szepszis következett be.

#### *Western blot vizsgálat eredményei*

Immunoblot vizsgálat mind a 20 beteg esetében történt a tumoros és normál nyelőcsőszakaszból származó mintákból. A kezelésre klinikai válasz nem mutató betegek tumoros mintáiban közel kétszer olyan mennyiségű, szignifikánsan több Hsp 90 ( $p=0.049$ ) és Hsp 16.2 ( $p=0.019$ ) volt kimutatható, mint a kezelésre reagálók mintáiban. A SOUL fehérje emelkedett expressziója és alacsonyabb Bax/Bcl-2 arány volt kimutatható a klinikailag jól reagálók mintáiban, mint a rosszul reagálókéban, bár ezek a különbségek nem voltak szignifikánsak ( $p=0.247$  és  $p=0.883$ ). A patológiai válasz vonatkozásában hasonló különbségek voltak észlelhetők. A kezelésre reagálókhoz képest a hisztopatológiai regressziót nem mutató daganatok közel kétszer olyan mennyiségben expresszálták a Hsp90-t ( $p=0.0005$ ) és a Hsp16.2-t ( $p=0.002$ ), valamint másfélszer nagyobb mennyiségben a SOUL ( $p=0.218$ ) fehérjét. A kezelésre nem reagálók esetében a Bax/Bcl-2 is kisebbnek bizonyult, igaz a különbség a SOUL-hoz hasonlóan nem volt szignifikáns a reagálókhoz képest ( $p=0.499$ ). Érdekes különbségeket sikerült azonosítani a felső és középső harmadi nyelőcső tumorok fehérje expressziója között. A hő-sokk fehérjék szignifikánsan alacsonyabb arányban mutathatók ki a felsőharmati tumorokban mint a középső harmadra lokalizálódó daganatokból (Hsp90 esetében  $p=0.006$ , Hsp16.2 esetében  $p=0.012$ ). A SOUL fehérje szintén szignifikánsan alacsonyabb arányban volt kimutatható a felső harmadi mintákban, mint a középső harmadi daganatokban ( $p=0.047$ ). Ugyanakkor a Bax/Bcl-2 arány alacsonyabbnak tűnik az középső harmadi daganatokban, bár ez a különbség nem szignifikáns ( $p>0.05$ ).

### 4.2. Végbél daganatok vizsgálata során észlelt eredmények

#### *Neoadjuváns KRT-ra adott hisztopatológiai válasz*

Műtéti beavatkozás 64 (92 %) esetben történt, 49 beteg (70%) anterior rezekcióban, míg 15 beteg (21%) abdominoperinealis rectumextirpációban részesült. Az R0 rezekciók aránya 90% volt. A sebészi rezekátumok patológiai értékelése alapján a neoadjuváns kemoradioterápia hatására komplett remisszió (TRG1) 11 esetben (17%) alakult ki, jelentős remisszió (TRG2) 20 esetben (31%) fordult elő. Összességében a jól reagálókat jelentő TRG1 és TRG2 kategória a betegek 48%-át tette ki, míg a rosszul reagálók alkották a betegek

maradék 52%-kát, beleértve 19 esetben TRG3-t (30%), 12 esetben TRG4-t (19%) és 2 esetben TRG5-t (3%) mutató tumorokat.

### ***Protein expresszió a kezelés előtti biopsziás mintákban***

Immunohisztokémiai értékelés a kezelés előtti biopsziás minták 67%-ban a SOUL, 61%-ban a Hsp 16.2, 58%-ban a Hsp90 és 25%-ban GHRH-R kifejezett expresszójára utalófestődést (++, +++) talált. A p-Akt valamennyi biopsziás mintában erős festődést mutatott.

### ***Kezelés előtti klinikai adatok és hisztopatológiai válasz közötti összefüggés***

A kezelés előtti klinikai jellemzők (az életkor, a nem, az anusgyűrűtől mért távolság, a kezelés előtti cT és cN) nem befolyásolták szignifikánsan a kezelésre adott hisztopatológiai választ. Ugyanakkor a kezelési paraméterek közül a KRT és a műtét között eltelt idő szignifikánsan hatott a regresszió mértékére. Azon betegek, akik a neoadjuváns kezelést követő hetedik héten vagy azt követően kerültek műtetre szignifikánsan jobb patológiai regressziót mutattak, mint a korábban operáltak (63% vs. 37%,  $p=0.041$ ).

### ***Protein expresszió és a KRT-ra adott hisztopatológiai válasz közötti összefüggés***

A vizsgált biológiai markerek közül a SOUL, Hsp16.2 és a p-Akt expresszióra utaló festődés nem mutatott szignifikáns összefüggést a tumor regressziós grádussal. Ugyanakkor a Hsp90-t és GHRH-R-t erősen expresszáló daganatok szignifikánsan nagyobb arányban mutattak gyenge hisztopatológiai választ a neoadjuváns KRT-ra ( $p=0.00002$ ,  $p=0.00006$ ). Multivariáns analízis megerősítette, hogy a GHRH-R és Hsp90 expresszió mértéke szignifikánsan befolyásolta a terápiás választ (pGHRH odds ratio, 0.198; 95% confidence interval, 0.042-0.941;  $p<0.05$ , valamint Hsp90 odds ratio, 0.218; 95% confidence interval, 0.074-0.647;  $p<0.001$ ).

## **5. KÖVETKEZTETÉSEK**

Összefoglalásként megállapítható, hogy a neoadjuváns KRT-ra adott válasz egyrészt a kezelési protokoll jellemzőitől függ (a sugárterápia dózisa, a terápia valamint műtét között eltelt idő), másrészt a daganat biológiai tulajdonságai befolyásolják.

1. Jelen vizsgálatban a nyelöcsőtumoros betegek neoadjuváns kemoradioterápiájával elért pCR arány alacsonyabb az irodalomban közölt eredményekhez képest, ami a dózis emelésének szükségességét veti fel. Ugyanakkor a kezelés kapcsán észlelt súlyos, esetenként fatális mellékhatások miatt a dózismelést mindenképpen alapos betegszelekciót kell, hogy megelőzze.
2. A HSP90 and HSP16. 2 szignifikánsan nagyobb mértékben expresszálódott a neoadjuváns kezelésre klinikailag és patológiailag rosszul reagáló tumorok biopsziás mintáiban, mint a kezelésre jól reagáló daganatokban. Ez a hő-sokk fehérjék kemoradioterápiával szembeni rezisztenciában játszott szerepére utal.
3. A vizsgálatban nem sikerült szignifikáns összefüggést találni az apoptotikus sejthalál úthoz kapcsolódó Bax/Bcl-2 arány és nyelöcsőtumorok neoadjuváns kezelésre adott terápiás válasza között.
4. A vizsgálatban nem sikerült szignifikáns összefüggést kimutatni az nekrotikus sejthalál úthoz kapcsolódó SOUL fehérje expressziója és a nyelöcsőtumorok neoadjuváns kezelésre adott terápiás válasza között.

5. Felső harmadi nyelőcsődaganatok a hő-sokk fehérjéket és a SOUL fehérjét szignifikánsan kisebb mértékben expresszálják, mint a középső harmadi tumorok, ami szerepet játszhat a KRT-val szemben mutatott eltérő érzékenységükben.
6. Vizsgálatunkban a végbéldaganatok kezelés előtti klinikai paramétereit nem befolyásolták a neoadjuváns KRT-ra adott terápiás választ. Ugyanakkor a kezelési paraméterek közül a kemoradioterápia és műtét közötti 7 hét vagy ennél hosszabb idő jobb tumorválaszt eredményezett a korábban történt műtétéhez képest.
7. Neoadjuváns KRT-val kezelt végbéltumorok immunhisztokémiai vizsgálata során a sejtvédő hatással rendelkező hő-sokk fehérjék közül a Hsp 16.2 expresszió nem befolyásolt a histopatológiai választ, míg a HSP90-t kifejezetten expresszáló daganatok szignifikánsan rosszabbul reagáltak a terápiára.
8. Neoadjuváns KRT-val kezelt végbél adenocarcinomák esetében nem sikerült összefüggést találni az apoptózis ellen ható p-AKT expressziója és a kezelés hatására bekövetkező hisztopatológiai regresszió között.
9. Neoadjuváns KRT-val kezelt rectumtumorkok esetében szignifikáns összefüggés igazolódott a GHRH-R expresszió és a kezelésre adott rossz hisztopatológiai válasz között.
10. Neoadjuváns KRT-val kezelt végbél adenocarcinomák esetében nem sikerült összefüggést találni a nekrotikus sejthalál útban résztvevő SOUL fehérje expressziója és a kezelés hatására bekövetkező hisztopatológiai regresszió között.
11. Vizsgálat eredményei alapján rectumtumorkok esetében kezelés előtti biopsziás mintákból kimutatott GHRH-R és Hsp90 használható lehet a neoadjuváns KRT-ra adott válasz prediktív faktoraként. Továbbá mindkét molekula alapja lehet a célzott biológiai terápiának, ami javíthatná a hagyományos kezelésre rosszul reagáló betegek gyógyulási esélyeit. Természetesen a valamennyi vizsgált marker esetében a klinikai gyakorlatot befolyásoló következtetések levonása előtt további megerősítés szükséges.