

УДК 616.33-006.6-085.276.3-036

*E.V. Stepanova¹, H.M. Lud^{1,3}, Y.V. Vishnevskaya¹, A.I. Shmak²,
V.V. Zharkov², A.Yu. Barishnikov¹*

EXPRESSION FOR THYMIDYLATE SYNTHASE AND THYMIDINE PHOSPHORYLASE IN TUMOUR TISSUE FOR GASTRIC CANCER PATIENTS TREATED WITH ADJUVANT 5- FLUOROURACIL/LEUCOVORIN CHEMOTHERAPY

¹*N. N. Blokhin Russian Cancer Research Center RAMS, Moscow, Russia*

²*Research Institute of Oncology and Medical Radiology, Minsk, Belarus*

³*Vitebsk state medical university, Vitebsk, Belarus*

ABSTRACT

Studying the role of thymidilate synthetase (TS) and thymidine phosphorylase (TP) in tumor tissue is important for the effectiveness of adjuvant therapy of gastric cancer patients. We revealed TS and TP expression in tumor cells in 65.4% and 69.2% of gastric cancer patients, respectively. High TS expression in primary tumor had direct correlation with TP in tumor ($p=0.008$) and stromal ($p=0.036$) cells. Expression of TP in tumor ($p=0.001$) and stromal ($p=0.006$) cells is a favorable prognostic factor for gastric cancer patients who received adjuvant chemotherapy including 5-fluorouracil/ leucovorin. Further studies to prove the findings are required.

Key words: gastric cancer, chemotherapy, prognostic factors.

*E.B. Степанова¹, А.Н. Луд^{1,3}, Я.В. Вишневская¹, А.И. Шмак²,
В.В. Жарков², А.Ю. Барышников¹*

ЭКСПРЕССИЯ ТИМИДИЛАТ-СИНТЕТАЗЫ И ТИМИДИН-ФОСФОРИЛАЗЫ В ТКАНИ ОПУХОЛИ У БОЛЬНЫХ РАКОМ ЖЕЛУДКА, ПОЛУЧАВШИХ АДЬЮВАНТНУЮ ХИМИОТЕРАПИЮ С ВКЛЮЧЕНИЕМ 5-ФТОРУРАЦИЛА

¹*ГУ РОНЦ им. Н.Н. Блохина РАМН, Москва*

²*Научно-исследовательский институт онкологии и медицинской радиологии
им. Н.Н. Александрова, Минск, Беларусь*

³*Витебский государственный медицинский университет, Витебск, Беларусь*

РЕЗЮМЕ

Изучение значения экспрессии тимидилат-синтетазы (ТС) и тимидин-фосфорилазы (ТФ) в ткани опухоли для эффективности адьювантного лечения больных раком желудка является актуальным. Экспрессия ТС и ТФ в опухолевых клетках обнаружена нами у 65,4 % и 69,2 % больных раком желудка соответственно. Высокая экспрессия ТС в первичной опухоли прямо коррелировала с экспрессией ТФ в опухолевых ($p=0,008$) и стромальных ($p=0,036$) клетках. Наличие экспрессии ТФ в опухолевых ($p=0,01$) и стромальных клетках ($p=0,006$) является благоприятным фактором прогноза больных раком желудка, получавших хирургическое лечение и адьювантную химиотерапию с включением 5-фторурацила/лейковорина. Требуется дальнейшие подтверждающие исследования.

Ключевые слова: рак желудка, химиотерапия, прогностические факторы.

ВВЕДЕНИЕ

Отдаленные результаты хирургического лечения больных раком желудка, за исключением ранних

стадий, остаются низкими. В течение последних 30 лет проводятся исследования эффективности адьювантной химиотерапии у пациентов с целью улучше-

ния прогноза и общей выживаемости. Показано, что адъювантная химиолучевая терапия позволяет увеличить 5-летнюю выживаемость больных раком желудка до 40 % [8]. Основой большинства режимов химиотерапии, использующихся при раке желудка, до сих пор являются производные фторпиримидинов. Но требуется разработка новых эффективных режимов адъювантной терапии этого заболевания. Так, мета-анализ 21 рандомизированного исследования эффективности традиционных режимов адъювантной химиотерапии показал, что больные, получающие адъювантную терапию, имеют лишь небольшое преимущество в выживаемости по сравнению с хирургическим контролем [9]. До настоящего времени не определены группы больных, которым показано адъювантное лечение.

Одно из возможных решений этой проблемы – использование молекулярно-биологических маркеров для назначения эффективного рационального лечения. Одними из наиболее изучаемых маркеров, используемых для предсказания эффективности лечения фторпиримидинами больных раком толстой кишки и молочной железы, являются тимидилат-синтетаза (ТС) и тимидин-фосфоорилаза (ТФ).

ТС, катализирующая превращение уридина в тимидин, относится к ключевым ферментам, контролирующим репликацию ДНК [4]. ТС – мишень действия фторпиримидинов, в том числе 5-фторурацила (5-ФУ). Высокий уровень активности фермента не позволяет 5-ФУ полностью заблокировать активность ТС. Большинство исследований показывают, что больные раком желудка с высоким уровнем ТС плохо поддаются лечению инфузиями 5-ФУ, опухоли же с низким ее содержанием – хорошо [5]. Частота встречаемости таких высокочувствительных опухолей с низким уровнем ТС составляет от 15 до 20 %. Считается, что эффективность 5-фторурацила у пациентов с низким уровнем ТС в 2–3 раза выше по сравнению с ТС-положительными больными. Замечено, что уровень экспрессии ТС в опухолевых клетках снижается после проведения химиотерапии [1]. Гиперэкспрессия ТС в опухолевых клетках коррелирует с неблагоприятны-

ми клинико-морфологическими характеристиками опухоли (в частности, с поражением регионарных лимфоузлов) и низкой 5-летней выживаемостью больных [11].

ТФ – один из ферментов, участвующих в метаболизме пиримидинов, катализирует обратное фосфорилирование тимидина в тимин и 2-дезоксирибозо-1-фосфат. ТФ участвует в ингибировании синтеза ДНК под действием 5-ФУ [10], а также является непрямым ангиогенным фактором [3]. Высокая экспрессия ТФ в опухолевых клетках коррелирует с высокой степенью инвазии опухоли, частым метастазированием [7], короткой медианой выживаемости и низкой чувствительностью к химиотерапии [6].

Целью исследования является изучение значения экспрессии ТС и ТФ в ткани опухоли для эффективности адъювантного лечения больных раком желудка режимом 5-фторурацил/лейковорин.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

В исследование были включены 26 больных раком желудка I–III стадии (14 мужчин и 12 женщин), получавших лечение в период с 1995 по 1998 гг. в НИИ онкологии и медицинской радиологии им. Н.Н. Александрова. Средний возраст больных составил $59,8 \pm 8,6$ лет (от 45 до 70 лет).

На 1-м этапе всем больным была проведена радикальная операция (9 больным – гастрэктомия, 17 – субтотальная резекция желудка). 9 (30,8 %) больных имели I стадию заболевания, 5 (19,2 %) – II и 12 (46,2 %) – III. Согласно классификации Lauren 16 (61,5 %) больных имели интестинальный тип опухоли, 8 (30,8 %) – диффузный и 2 (7,7 %) – смешанный. У 18 (69 %) больных опухоль локализовалась в нижней трети желудка, у 1 (3,9 %) – в средней, у 2 (7,7 %) – в верхней, у 5 (19,2 %) наблюдалось тотальное или субтотальное поражение желудка. Опухоли имели следующие макроскопические типы по классификации Borrmann: 2 больных – I тип (полиповидные или грибовидные опухоли), 2 – II тип (блюдцеобразные), 18 больных – III тип (инфильтративно-язвенные), 4 – IV тип (диффузно-инфильтративные).

Экспрессия ТС и ТФ и безрецидивная выживаемость больных раком желудка

Маркер	5-летняя безрецидивная выживаемость, %	Медиана времени до прогрессирования, мес	Достоверность, р
ТС – ТС +	66,7 70,6	Не достигнута Не достигнута	0,848
ТФ опухолевые клетки – ТФ опухолевые клетки +	37,5 83,3	8 ± 4 Не достигнута	0,01
ТФ стромальные клетки – ТФ стромальные клетки +	41,7 92,9	12 ± 3 Не достигнута	0,006

Все больные в послеоперационном периоде получили курс адъювантной химиотерапии с включением 5-фторурацила/лейковорина. Всего было проведено 167 курсов химиотерапии (от 1 до 8).

Иммуногистохимическое исследование

Иммуногистохимическое исследование выполняли по стандартной методике. В качестве первичных антител использовали моноклональные антитела к ТС (клон TS104, разведение 1:100, DAKO Corp) и ТФ (клон P-GF.44C, разведение 1:500, Oncogene Research Products). Для выявления антигенных детерминант обрабатывали срезы в Target Retrieval Solution [DAKO Corp] в течение 30 мин при 95 °С. Инкубацию с первичными антителами проводили в течение 12 ч при 4 °С. Для визуализации реакции антиген-антитело использовали стрептавидин-биотиновую тест-систему ENVISION+kit [DAKO Corp]. Хромогеном служил ДАБ+ [DAKO Corp]. Срезы окрашивали гематоксилином и заключали в бальзам.

Результаты окрашивания оценивали с применением светового микроскопа Leica (увеличение $\times 10$, $\times 20$, $\times 40$). Для всех маркеров оценивали локализацию окрашивания в клетке (ядро, цитоплазма, мембрана). Количество положительных клеток определяли в зонах, содержащих их максимальное количество.

При слабом окрашивании опухолевых клеток или при окрашивании средней и сильной интенсивности менее 25 % клеток считали, что опухоль имеет низкую степень экспрессии ТС. При среднем или сильном окрашивании более 25 % опухолевых клеток опухоль рассматривали как имеющую высокую экспрессию ТС.

Опухоль считали положительной по ТФ, если более 5 % опухолевых клеток (цитоплазма) были окрашены со средней или сильной интенсивностью.

Экспрессию ТФ в стромальных клетках оценивали полуколичественно: 0 – отсутствие окрашивания; 1 – окрашено менее 25 % клеток; 2 – окрашено от 25 до 50 % опухолевых клеток; 3 – окрашено более 50 % клеток. При оценке 0 или 1 считали, что опухоль является отрицательной по экспрессии ТФ в стромальных клетках.

Статистический анализ проводили на персональном компьютере с использованием программы “SPSS” (v 13.0. for Windows). Для проверки достоверности различий значений признаков в группах использовали точный критерий Фишера. Различия считались статистически достоверными при $p < 0,05$ (95% точности). Кривые безрецидивной выживаемости строили с использованием метода Каплана-Меера. Выживаемость различных групп сравнивали с помощью однофакторного логранкового метода.

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Экспрессия тимидилат-синтетазы

и тимидин-фосфорилазы в ткани опухоли

Экспрессия ТС обнаружена у 17 (65,4 %) больных раком желудка. Экспрессия ТС в первичной опухоли

не коррелировала с клинико-морфологическими параметрами опухоли.

Экспрессия ТФ в опухолевых клетках обнаружена у 18 (69,2 %) больных раком желудка. Случаи с высокой экспрессией ТФ в опухолевых клетках чаще имели митотическую активность выше 10 (11 из 12, 91,7 %), чем с низкой экспрессией ТФ (7 из 14, 50 %), $p = 0,036$. Других корреляций с клинико-морфологическими параметрами не выявлено.

14 (53,8 %) случаев рака желудка были оценены как положительные по экспрессии ТФ в стромальных клетках. Данный показатель также прямо коррелировал с митотической активностью опухоли ($p = 0,008$). При экспрессии ТФ в стромальных клетках 83,3 % опухолей имели митотическую активность выше 10, а среди опухолей без экспрессии ТФ в стромах таких случаев было 28,6 %. Другие клинико-морфологические характеристики опухоли не коррелировали с экспрессией ТФ в стромальных клетках.

Анализ корреляций между экспрессией маркеров показал, что высокая экспрессия ТС в первичной опухоли прямо коррелирует с экспрессией ТФ в опухолевых ($p = 0,008$) и стромальных ($p = 0,036$) клетках. Также имеется прямая корреляция между экспрессией ТФ в опухолевых и стромальных клетках ($p = 0,009$).

Экспрессия маркеров

и эффективность адъювантного лечения

Среди 26 изученных больных метастазы после проведенного адъювантного лечения появились у 8 (30,8 %). У всех больных метастазы выявлены в течение 1-го года после хирургического удаления первичной опухоли (время появления метастазов составило 2–12 мес, медиана – 7,04 мес).

Традиционные факторы прогноза больных раком желудка, такие, как T-, N- и M-стадии по WHO, Lauren, гистологический тип опухоли, степень злокачественности, количество митозов не коррелировали с безрецидивной выживаемостью.

Был проведен анализ корреляции экспрессии ТС и ТФ в опухолевых клетках рака желудка и временем появления метастазов после адъювантного лечения (см. таблицу).

Экспрессия ТС в первичной опухоли не коррелировала с прогнозом заболевания ($p = 0,848$). 5-летняя безрецидивная выживаемость была одинакова для ТС-положительных и ТС-отрицательных больных (70,6 % и 66,7 % соответственно).

Показано, что выживаемость без прогрессирования больных, имеющих ТФ-положительные опухоли, статистически значимо выше, чем ТФ-отрицательных ($p = 0,01$). 5-летняя выживаемость составила 37,5 % у ТФ-отрицательных больных (медиана времени до прогрессирования (МВП) – 8 мес) и 83,3 % у ТФ-положительных больных (МВП не достигнута) (см. рисунок, А).

Экспрессия ТФ в стромальных клетках также была благоприятным прогностическим фактором ($p=0,006$). 5-летняя безрецидивная выживаемость составила 41,7 % среди больных, у которых экспрессия ТФ в стромальных опухолях была низкой (МВП – 12 мес), и 92,9 % – среди больных с высокой экспрессией ТФ (МВП не достигнута).

Анализ ко-экспрессии ТФ в опухолевых и стромальных клетках позволил выделить 3 основные группы больных различного риска возникновения метастазов ($p=0,005$; см. рисунок, Б):

- 1) группа больных низкого риска (ТФоп+/ТФстр+) – 5-летняя безрецидивная выживаемость – 92,3 %;
- 2) группа больных среднего риска (ТФоп-/ТФстр+ или ТФоп+/ТФстр-) – 66,7 %;
- 3) группа больных высокого риска (ТФоп-/ТФстр-) – 28,5 %.

ОБСУЖДЕНИЕ

В нашем исследовании показано, что экспрессия ТФ в опухолевых и стромальных клетках первичной опухоли может рассматриваться как фактор благоприятного прогноза больных раком желудка, получавших в качестве адъювантного лечения химиотерапию с включением 5-фторурацила/лейковорина. Экспрессия ТС не связана с появлением метастазов после удаления первичной опухоли.

В настоящее время опубликовано небольшое количество исследований о роли ТС и ТФ в предсказании эффективности лечения больных раком желудка. До сих пор не определено их значение для предсказания прогноза течения заболевания и эффективности адъювантной терапии.

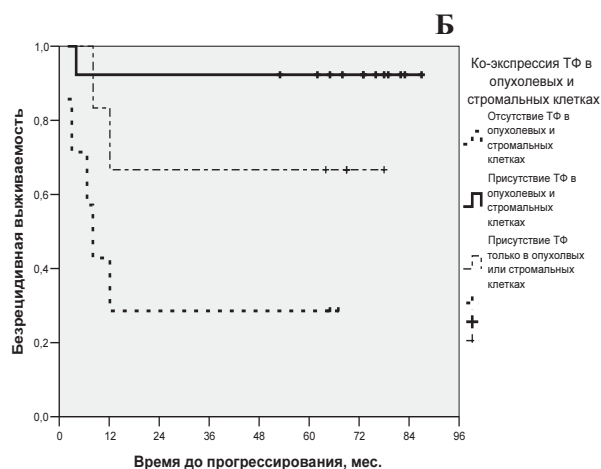
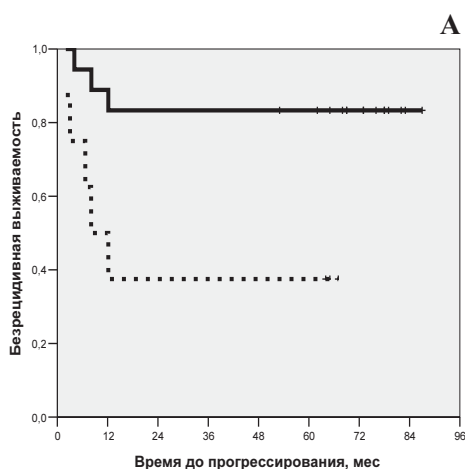
Фермент ТФ – 1-й этап механизма цитотоксичности 5-фторурацила, повреждающего ДНК (за счет образования флуорозидоксимонифосфата). Экспериментальные данные *in vitro* показывают, что высокий

уровень ТФ коррелирует с увеличением эффективности терапии с использованием 5-фторурацила. Связь между экспрессией ТФ и химиочувствительностью до сих пор обсуждается. В ряде исследований указывается, что высокая экспрессия ТФ в опухоли коррелирует с лучшей выживаемостью больных, получавших адъювантно 5-фторурацил. По другим данным, высокая экспрессия ТФ активирует ангиогенез в опухоли и таким образом ассоциирована с низкой эффективностью лечения.

Экспрессия ТС в первичной опухоли рассматривается как неблагоприятный фактор прогноза течения заболевания и резистентности к адъювантной терапии фторпиримидинами при раке толстой кишки. В нашем исследовании больных раком желудка такой связи не обнаружено.

Не решен вопрос о выборе режимов химиотерапии для больных, имеющих высокий риск не ответить на химиотерапию 5-фторурацил/лейковорин. Химиотерапия с использованием оксалиплатина и цисплатина, возможно, в таких случаях позволит увеличить эффективность лечения. Использование оксалиплатина в комбинации с 5-ФУ позволяет преодолеть химиорезистентность, вызванную ТС. Показано, что оксалиплатин может снижать экспрессию ТС, чем объясняется эффективность режима оксалиплатин+5-ФУ+лейковорин в случаях, прежде неэффективно леченных 5-ФУ+лейковорином [2].

Другим перспективным препаратом для лечения рака желудка является капецитабин (кселода). Под действием ТФ в ткани опухоли из промежуточного метаболита капецитабина 5-дезоксид-5-фторуридина происходит образование 5-ФУ. Селективное накопление 5-ФУ в опухолевой ткани обеспечивается высокой активностью ТФ в опухолевых клетках по сравнению с клетками нормальных тканей. Эффективность капецитабина в комбинации с препаратами платины составляет 50 % [12].



Время до прогрессирования больных раком желудка, получавших адъювантную химиотерапию с включением 5-фторурацила/лейковорина, и экспрессия тимидин фосфорилазы в опухолевых клетках (А) и ко-экспрессия тимидин фосфорилазы в опухолевых и стромальных клетках (Б)

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Таким образом, наличие экспрессии ТФ в опухолевых и стромальных клетках является благоприятным фактором прогноза больных раком желудка, получавших хирургическое лечение и адъювантную химиотерапию с включением 5-фторурацила/лейковорина. Дальнейшие исследования по оценке эффективности определения экспрессии маркеров тимидилат-синтетазы и тимидин-фосфоорилазы у больных раком желудка перспективны для оптимизации тактики лечения пациентов.

ЛИТЕРАТУРА

1. Arima S., Tachikawa D., Kawahara K., Futami K. Thymidylate synthase activity after preoperative administration of 5-FU in patients with gastric or colorectal cancer // Gan To Kagaku Ryoho. – 2000. – 5. – P. 703-10.
2. Brienza S., Bensmaine M.A., Soulie P. et al. Oxaliplatin added to 5-fluorouracil-based therapy (5-FU +/- FA) in the treatment of 5-FU-pretreated patients with advanced colorectal carcinoma (ACRC): results from the European compassionate-use program // Ann Oncol. – 1999. – 10(11). – P. 1311-16.
3. Haraguchi M., Miyadera K., Uemura K., Sumizawa T. Angiogenic activity of enzyme // Nature. – 1994. – 368. – P. 198.
4. Heidelberger C. Fluorinated pyrimidines and their nucleosides. In: Sartorelli AC, Johns DG, editors. Handbook of experimental pharmacology // New York: Springer-Verlag. – 1975. №38. – P. 193–231.
5. Hua D., Huang Z., Mao Y., Deng J. Thymidylate synthase and thymidine phosphorylase gene expression as predictive parameters for the efficacy of 5-fluorouracil-based adjuvant chemotherapy for gastric cancer // World J Gastroenterol. – 2007. – 13. – P. 5030-4.
6. Ichikawa W., Takahashi T., Suto K., Hirayama R. Gene expressions for thymidylate synthase (TS), orotate phosphoribosyltransferase (OPRT), and thymidine phosphorylase (TP), not dihydropyrimidine dehydrogenase (DPD), influence outcome of patients (pts) treated with S-1 for gastric cancer (GC) // Journal of Clinical Oncology. – 2004. – ASCO Annual Meeting Proceedings. – 22(14S). – Abstract 4050.
7. Konno S., Takebayashi Y., Higashimoto M., Katsube T. Thymidine phosphorylase expression in gastric carcinoma as a marker for metastasis // Anticancer Res. – 2003. – 23. – P. 5011-4.
8. Macdonald J. Treatment of localized gastric cancer // Semin Oncol. – 2004. – 31. – P. 566-73.
9. Mari E., Floriani I., Tinazzi A. 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. – P. 837-43.
10. Morita T., Matsuzaki A., Suzuki K., Tokue A. Role of Thymidine Phosphorylase in Biomodulation of Fluoropyrimidines // Current Pharmaceutical Biotechnology. – 2001. – 2. – P. 257-67.
11. Tsujitani S., Konishi I., Suzuki K. Expression of thymidylate synthase in relation to survival and chemosensitivity in gastric cancer patients // J Exp Clin Cancer Res. – 2000. – 19. – P. 189-95.
12. Xu R., Han B., Shi Y. et al. Phase II clinical trial of XELOX as first line treatment for patients with unresectable or metastatic gastric cancer // Journal of Clinical Oncology. – 2007. – ASCO Annual Meeting Proceedings. – 25(18S). – Abstract 15062.

Поступила 11.10.2007.