

ИММУНОГИСТОХИМИЧЕСКИ ОПРЕДЕЛЯЕМЫЕ ПРЕДИКТИВНЫЕ МАРКЕРЫ ЭФФЕКТИВНОСТИ 5-ФТОРПИРИМИДИНОВ ПРИ АДЕНОКАРЦИНОМЕ ТОЛСТОЙ КИШКИ

УДК 615.03

© Г. А. Раскин^{1,2}, Р. В. Орлова³, А. Э. Протасова³, С. А. Кошкин³, Р. И. Глушаков⁴¹ ФГБУ «Российский научный центр радиологии и хирургических технологий» МЗ РФ, Санкт-Петербург;² ФГБУ «Санкт-Петербургский НИИ фтизиопульмонологии» МЗ РФ;³ Санкт-Петербургский государственный университет;⁴ ФГБВОУ ВПО «Военно-медицинская академия им. С. М. Кирова» МО РФ, Санкт-Петербург

Ключевые слова:

иммуногистохимия; химиотерапия; TP; TS; DPYD.

Резюме

Целью исследования явилось определение уровня экспрессии белков TP, TS, DPYD как предикторов эффективности использования 5-фторпиримидинов при аденокарциноме толстой кишки. Исследуемые белки определялись иммуногистохимическим методом по стандартной методике. При проведении регрессионного анализа влияния экспрессии исследуемых маркеров на время до прогрессирования заболевания оказалось, что экспрессия TP и TS оказывает статистически значимое воздействие ($p=0,006$ и $p=0,0036$ соответственно). Такой закономерности не было выявлено в случае оценки экспрессии DPYD. Таким образом, для оценки эффективности предстоящей химиотерапии 5-фторпиримидинами аденокарциномы толстой кишки может быть использована иммуногистохимическая оценка экспрессии тимидилат синтетазы и тимидин фосфорилазы.

ВВЕДЕНИЕ

В настоящее время химиотерапия при определенной нозологии назначается, как правило, по протоколам, разработанным после многолетних исследований противоопухолевых препаратов. Надо отметить, что при этом не учитываются биологические особенности клеток конкретной опухоли и, как результат, не очень высокая эффективность противоопухолевых препаратов. Сейчас всё большее развитие получает поиск так называемых предикторов эффективности противоопухолевых препаратов.

Тимидилат синтетаза (TS) — мишень для 5-фторпиримидинов. Тимидин фосфорилаза (TP) — превращает капецитабин (Кселода) из неактивной в активную форму, кроме того, TP стимулирует превращение 5-FU (5-фторурацил) в FdUMP (5-фтордезоксифуридин монофосфат), который ингибирует TS. Некоторые исследователи показали, что высокий уровень TS связан с эффективностью 5-фторпиримидинов. Однако в большинстве работ утверждается, что высокий уровень TS указыва-

ет на резистентность к 5-фторпиримидинам [1, 2]. Кроме того, имеются исследования, в которых низкий уровень экспрессии TS был связан с эффектом комбинированной химиотерапии перметрекседом и карбоплатином при злокачественной мезотелиоме плевры [3]. Высокий уровень экспрессии TS является неблагоприятным прогностическим фактором при колоректальном раке, по данным одних авторов [4], хотя другие исследования не выявили корреляционной связи между экспрессией TS и выживаемостью больных с распространенной аденокарциномой толстой кишки [5]. По данным других авторов, экспрессию TS следует оценивать именно в инвазивном фронте опухоли, где низкие уровни экспрессии тимидилат синтетазы положительно коррелирует с риском рецидива аденокарциномы и общей выживаемостью больных [3].

Дигидропиримидин дегидрогеназа (Dihydropyrimidine dehydrogenase [NADP+], DPYD) — это фермент, ответственный за катаболизм 5-фторпиримидинов. Дефицит экспрессии данного гена связан с тимидин-урацилурией и повышенным риском токсичности препаратов ряда 5-фторпиримидинов у онкологических пациентов [6]. По литературным данным, уровни экспрессии DPD не коррелируют с риском рецидива опухоли [3].

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Был исследован материал первичных опухолей от 139 больных раком ободочной кишки, получавших лекарственное или комплексное лечение по поводу основного заболевания в Санкт-Петербургском городском клиническом онкологическом диспансере и 122-й клинической больнице имени Л. Г. Соколова (г. Санкт-Петербург) в период с 2007 по 2011 гг.

Имуногистохимическое исследование. Материал поступал как в виде парафиновых блоков, так и кусочков опухолей, залитых в 10%-й буферный формалин. В последнем случае производилась вырезка материала, доведение фиксации в формалине до 24 часов. Затем проводили материал в десяти порциях изопропилового спирта и 3 парафинах. Приготавливались блоки, с которых нарезались сре-

■ Таблица 1. Спецификация антител

№	Название антитела	Клон	Характер антител	Разведение	Фирма-производитель
1	DPYD	ab54797	Мышиные, моноклональные	1 : 100	AbCam
2	Thymidine Phosphorylase (TP)	P-GF.44C	Мышиные, моноклональные	1 : 400	LabVision
3	Thymidylate synthase (TS)	Sc-33679	Мышиные, моноклональные	1 : 100	Santa Cruz

зы толщиной 4 микрон, которые помещали на стёкла с поли-L-лизиновым покрытием. Срезы подсушивались, депарафинировались и подвергались демаскировке антигенов при помощи цитратного буфера в условиях водяной бани, $t=95^{\circ}\text{C}$, 30 минут. После чего они остывали при комнатной температуре и промывались трис-буфером с твином. Каждый срез обводился парафиновым карандашом, после чего осуществлялось ингибирование эндогенной пероксидазы 3%-й перекисью водорода в течение 20 минут. Затем на каждый срез наносилось первое антитело (табл. 1), экспозиция длилась 1 час на термостойке в условиях «водяной бани» при температуре 30°C .

Для визуализации реакции антиген-антитело применялась полимерная система детекции EnVision компании DAKO, в качестве хромогена использовался диаминобензидин. Контр-окрашивание ядер осуществлялось при помощи гематоксилина Майера. После каждого из этапов до окрашивания диаминобензидином стекла со срезами промывались в трис-буфере с твином pH 7,1 фирмы BioOptica. Стекла заключались в BioMaunt фирмы BioOptica.

Уровень экспрессии TS, TP, DPYD (рис. 1–3) оценивался при помощи подсчета числа позитивных раковых клеток относительно общего количества раковых клеток.

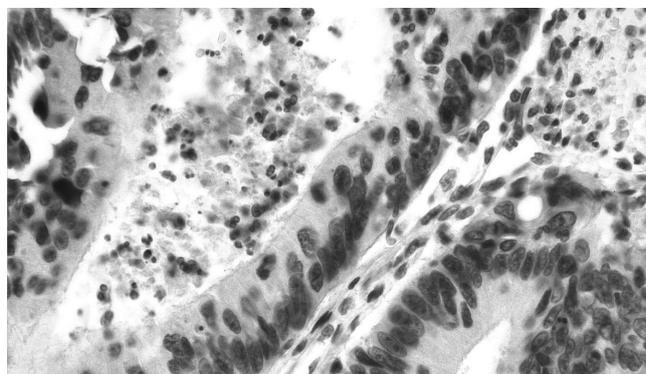
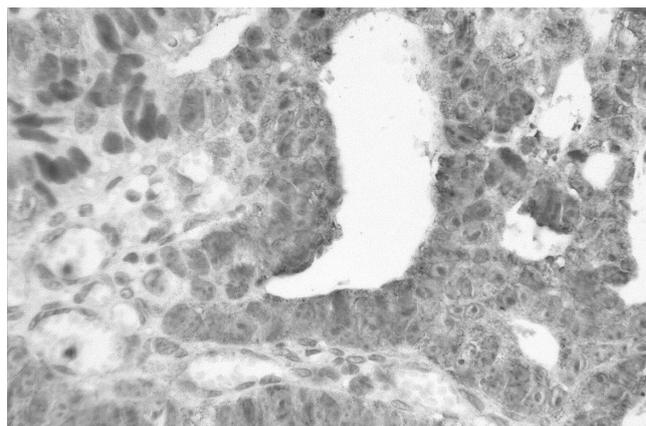
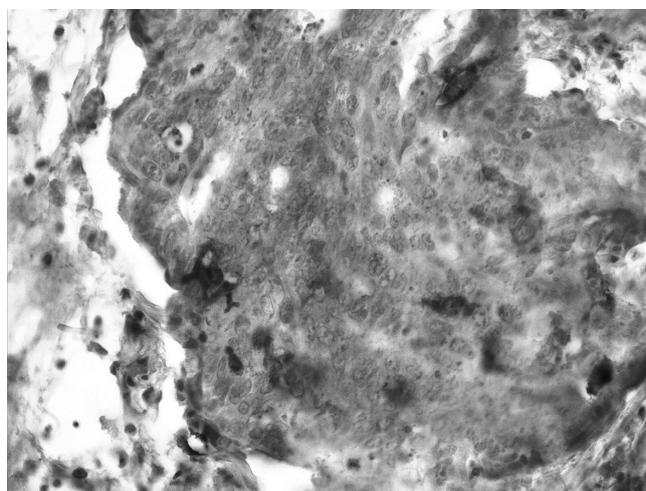
При оценке иммуногистохимического окрашивания использовался внутренний контроль в виде нормальных структур, присутствующих в срезах.

Клиническая характеристика исследуемой группы. В исследование вошли опухоли с различной степенью дифференцировки. Преобладающей формой была умереннодифференцированная аденокарцинома (табл. 2).

Из 139 больных раком толстой кишки 104 случая представляли распространенную форму. В исследование были включены больные именно с диссеминированной стадией опухолевого процесса с преимущественным поражением печени, лёгких, лимфатических узлов, костей. Средний показатель

■ Таблица 2. Распределения случаев в зависимости от гистологической дифференцировки

Локализация	Количество случаев	Степень дифференцировки (гистотип)/ количество случаев	
Аденокарцинома толстой кишки	139	Низкая	12
		Умеренная	110
		Высокая	9
		Муцинозная аденокарцинома	8

■ Рисунок 1. Иммуногистохимическое исследование тимидилатсинтетазы (TS) Позитивная ядерная реакция (коричневое окрашивание) в большинстве раковых клеток, увеличение $\times 400$ ■ Рисунок 2. Иммуногистохимическое исследование DPYD Позитивная цитоплазматическая реакция в большинстве опухолевых клеток, увеличение $\times 400$ ■ Рисунок 3. Иммуногистохимическое исследование тимидинфосфорилазы. Позитивная реакция в части опухолевых клеток, увеличение $\times 400$

■ Таблица 3. Клиническая характеристика пациентов с диссеминированной формой аденокарциномы толстой кишки

Критерий	Значение
Число больных	104
Средний возраст, лет	62,5 (28–78)
Пол:	
Мужчины	46,7 % (28)
Женщины	53,3 % (32)
Общее состояние в момент начала специального лечения — функциональное состояние по шкале ECOG-ВОЗ:	
0–1	31,7 % (33)
2–3	68,3 (71)
Локализация отдаленных метастазов:	
Печень	85 % (88)
Легкие	26 % (27)
Плевра	15 % (16)
Головной мозг	10 % (10)
Мягкие ткани	20 % (21)
Лимфатические узлы	75 % (78)
Кости	15 % (15)
Другие висцеральные органы (сердце, органы малого таза, надпочечник)	26 % (27)

возрастного распределения (медиана возраста) больных составил 62,5, средний возраст $58,6 \pm 5,7$. Клиническая характеристика пациентов представлена в таблице 3. Проводилось сопоставление клинической картины и результатов иммуногистохимического исследования, влияние экспрессии изучаемых маркеров на эффективность лекарственного лечения оценивалось по суррогатным конечным точкам — времени до прогрессирования заболевания.

Все пациенты, включенные в исследование, получали химиотерапию с применением препаратов 5-фторпиримидинового ряда по схемам FOLFOX, De Gramont, FOLFIRI.

Анализ выживаемости. Химиотерапия признавалась эффективной в случаях получения объективного ответа на лечение: стабилизации процесса, полного или частичного регресса опухоли. Лечение признавалось безуспешным в случае прогрессирования основного заболевания. Проводилось не менее 3 курсов химиотерапии, результаты оценивались спустя 2 года после начала противоопухолевого лечения.

Статистический анализ проводили на персональном компьютере с использованием пакета программ Statistica 6.0. Непараметрические данные анализировались с использованием теста χ^2 . Различия считались статистически достоверными при $p < 0,05$.

Построение моделей вероятности выживания (функций продолжительности жизни) в зависимости от факторов, влияющих на выживание, осуществляли методом регрессионного анализа с предположением об экспоненциальном или нормальном распределении времени выживания. Для построения регрессионной модели избран метод пропорциональных рисков Кокса [Proportional Hazard (Cox) regression] — наиболее общая регрессионная модель, в которой предполагается, что функция интенсивности имеет вид: $h(t) = h_0(t) \cdot (z_1 \dots z_m)$.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

При оценке экспрессии TS (рис. 1) оказалось, что муцинозные аденокарциномы имеют более высокий уровень экспрессии TS, что является неблагоприятным прогностическим фактором, по данным одних авторов [4], хотя другие исследования не выявили корреляции экспрессии TS и выживаемости больных с распространенной аденокарциномой толстой кишки [2]. Анализ экспрессии DPYD (рис. 2) показал, что в среднем негативная реакция наблюдается в 17% аденокарцином толстой кишки, уровень экспрессии практически не изменялся в зависимости от дифференцировки опухоли и от метастатического статуса ($p > 0,05$). Это может быть связано с тем, что уровень экспрессии DPYD в первую очередь связывают с токсичностью препаратов ряда 5-фторпиримидинов [2, 6, 7], а не с их эффективностью.

В нашем исследовании при проведении регрессионного анализа влияния экспрессии исследуемых маркеров на время до прогрессирования заболевания оказалось, что экспрессия TP и TS оказывает статистически значимое воздействие ($p = 0,006$ и $p = 0,0036$ соответственно). Такой закономерности не было выявлено в случае оценки экспрессии DPYD.

При анализе влияния экспрессии маркеров на прогрессирование заболевания во время химиотерапии (полное отсутствие эффекта) статистически достоверное влияние также оказывали экспрессии TS ($p = 0,0036$ и $p = 0,0008$) и TP ($p = 0,006$ и $p = 0,004$).

Таким образом, по данным нашего исследования, уровни экспрессии тимидилат синтетазы и тимидин фосфорилазы в ткани аденокарциномы толстой кишки положительно коррелируют с неблагоприятным предиктивным прогнозом в отношении продолжительности времени до прогресси-

рования у пациентов с диссеминированным раком толстой кишки, получавших в качестве лечения основного заболевания противоопухолевые агенты 5-фторпиримидинового ряда. Иммуногистохимическое исследование ткани опухоли на экспрессию вышеуказанных маркеров может быть использована для оценки эффективности предстоящей химиотерапии 5-фторпиримидинами аденокарциномы толстой кишки с целью индивидуализации лечения данной категории больных.

ЛИТЕРАТУРА

1. Kwon H. C., Roh M. S., Oh S. Y. et al. Prognostic value of expression of ERCC1, thymidylate synthase, and glutathione S-transferase P1 for 5-fluorouracil/oxaliplatin chemotherapy in advanced gastric cancer // *Annals of Oncology*. — 2007. — Vol. 18 (3). — P. 504–509.
2. Uchida P. V., Danenberg K. D., Danenberg J. L. Grem Thymidylate synthase, dihydropyrimidine dehydrogenase, ERCC1, and thymidine phosphorylase gene expression in primary and metastatic gastrointestinal adenocarcinoma tissue in patients treated on a phase I trial of Oxaliplatin and capecitabine // *BMC Cancer*. — 2008. — Vol. 23. — P. 1121–1130.
3. Zucali P. A., Giovannetti E., Destro A. et al. Thymidylate synthase and excision repair cross-complementing group-1 as predictors of responsiveness in mesothelioma patients treated with pemetrexed/carboplatin // *Clin. Cancer Res.* — 2011. — Vol. 17 (8). — P. 2581–2590.
4. Karlberg M., Ohrling K., Edler D. et al. Prognostic and predictive value of thymidylate synthase expression in primary colorectal cancer // *Anticancer Res.* — 2010. — Vol. 30 (2). — P. 645–651.
5. Ishibashi K., Okada N., Ishiguro T. et al. The expression of thymidylate synthase (TS) and excision repair complementing-1 (ERCC-1) protein in patients with unresectable colorectal cancer treated with mFOLFOX6 therapy // *Gan To Kagaku Ryoho*. — 2010. — Vol. 37 (12). — P. 2532–2535.

6. Schneider H. B., Becker H. Impact of dihydropyrimidine dehydrogenase on 5-fluorouracil treatment in cancer patients // *Eur. J. Med. Res.* — 2004. — Vol. 8. — P. 226–228.
7. Honda J., Sasa M., Moriya T. et al. Thymidine phosphorylase and dihydropyrimidine dehydrogenase are predictive factors of therapeutic efficacy of capecitabine monotherapy for breast cancer — preliminary result // *J. Med. Investigations*. — 2008. — Vol. 55. — P. 54–60.

PREDICTIVE MARKERS OF THE EFFICACY OF COLON ADENOCARCINOMA TREATMENT BY 5-FLUOROPYRIMIDINES DETERMINED BY MEANS OF IMMUNOHISTOCHEMISTRY METHOD

G. A. Raskin, R. V. Orlova, A. E. Protasova, S. A. Koshkin, R. I. Glushakov

◆ **Summary:** 5-fluorouracil (5-FU) has remained the treatment of choice in the adjuvant and palliative setting of colon cancer (CC). The purpose of this study was to evaluate the expression of the thymidine phosphorylase (TP), thymidylate synthase (TS) and dihydropyrimidine dehydrogenase (DPYD) in CC patients treated with 5-fluorouracil (5-FU) to determine their predictive and prognostic significance. Immunohistochemistry (IHC) analysis of the expression of proteins was performed on tumour tissue of 104 patients with stage IV colon cancer. All patient was treated with fluoropyrimidine/antifolate-based therapy (FOLFOX, De Gramont, FOLFIRI). Used multivariate logistic regression analyses we found the level of expression of proteins thymidine phosphorylase (TP), thymidylate synthase (TS) as predictors efficiency 5 — fluoropyrimidine with adenocarcinoma of the colon. The value of expression of TP and TS has a statistically significant effect ($p=0,006$ and $p=0.0036$) on time to disease progression, respectively. Our data demonstrated the efficacy of the 5-fluoropyrimidine chemotherapy colon adenocarcinoma may be utilized evaluation of expression of TS and TP.

◆ **Key words:** immunohistochemistry; fluoropyrimidines; TP; TS; colon cancer.

◆ Информация об авторах

Раскин Григорий Александрович — к. м. н., ведущий научный сотрудник. Российский научный центр радиологии и хирургических технологий; старший научный сотрудник НИИ Фтизиопульмонологии. 197758, Санкт-Петербург, п. Песочный, ул. Ленинградская, д. 70. E-mail: rasking@list.ru.

Орлова Рашида Вахидовна — д. м. н., профессор, заведующая кафедрой онкологии медицинского факультета. Санкт-Петербургский государственный университет. 199034, Санкт-Петербург, Университетская наб., 7-9.

Протасова Анна Эдуардовна — д. м. н., профессор кафедры онкологии медицинского факультета. Санкт-Петербургский государственный университет. 199034, Санкт-Петербург, Университетская наб., 7-9. E

Кошкин Сергей Александрович — ординатор кафедры онкологии медицинского факультета. Санкт-Петербургский государственный университет. 199034, Санкт-Петербург, Университетская наб., 7-9.

Глушаков Руслан Иванович — старший помощник начальника отдела подготовки научно-педагогических кадров и организации научно-исследовательских работ. Военно-медицинская академия им. С. М. Кирова. 194044, Санкт-Петербург, ул. акад. Лебедева, д. 6. E-mail: glushakovruslan@gmail.com.

Raskin Grigoriy Aleksandrovich — MD, PhD, chief researcher. Russian Research Centre for Radiology and Surgical Technologies; Scientific Research Phthysiopulmonology Institute. 197758, St. Petersburg, posyolok Pesochnyy, Leningradskaya St., 70, Russia. E-mail: rasking@list.ru.

Orlova Rashida Vakhidovna — M.D., PhD, Dsc, professor, Head of Oncology department, Medical Faculty. Saint Petersburg State University. 199034, St. Petersburg, Universitetskaya nab., 7-9, Russia.

Protasova Anna Eduardovna — M.D., PhD, Dsc, professor of Oncology department, Medical Faculty. Saint Petersburg State University. 199034, St. Petersburg, Universitetskaya nab., 7-9, Russia.

Koshkin Sergey Aleksandrovich — resident of Oncology, Medical Faculty. Saint Petersburg State University. 199034, St. Petersburg, Universitetskaya nab., 7-9, Russia.

Glushakov Ruslan Ivanovich — Ph.D., senior assistant chief of the division of scientific investigation. Kirov Military Medical Academy. 194044, St. Petersburg, Acad. Lebedev St., 6, Russia. E-mail: glushakovruslan@gmail.com.