

© А. И. ДРОНОВ<sup>1</sup>, С. В. ЗЕМСКОВ<sup>1</sup>, Н. Н. МЕЛЬНИК<sup>2</sup>

Национальный медицинский университет имени О. О. Богомольца<sup>1</sup>  
Национальная детская специализированная больница "ОХМАТДЕТ"<sup>2</sup>

## Влияние интратуморальной экспрессии тимидилатсинтазы на выживаемость больных раком поджелудочной железы, получавших гемцитабин и тегафур в адъювантном лечении

A. I. DRONOV<sup>1</sup>, S. V. ZEMSKOV<sup>1</sup>, N. N. MELNYK<sup>2</sup>

O. Bohomolets National Medical University<sup>1</sup>  
National Children's Specialized Hospital "OHMATDET"<sup>2</sup>

### INFLUENCE OF INTRATUMORAL EXPRESSION OF THYMIDYLATE SYNTHASE ON SURVIVAL OF PATIENTS WITH PANCREATIC CANCER ON ADJUVANT GEMCITABINE AND TEGAFUR REGIMEN

Рак поджелудочной железы (РПЖ) входит в первую четверку в структуре онкологической смертности. Комбинации фторпиримидинов и гемцитабина давно и активно используются в паллиативной химиотерапии РПЖ. В адъювантном режиме такие комбинации используются реже, было показано, что они могут влиять на долгосрочную выживаемость, но эффект значительно отличается среди пациентов с различным фенотипом опухоли. Целью нашего исследования было изучение взаимосвязи уровня экспрессии тимидилатсинтазы (TS) у больных РПЖ, получающих адъювантно гемцитабин+тегафур (ГемТег), и их общей выживаемости.

В исследование были вовлечены 62 пациента, которым была выполнена радикальная резекция по поводу РПЖ. Адъювантная химиотерапия по схеме ГемТег начиналась не ранее 2 недель после операции. Во всех случаях протоковая аденокарцинома поджелудочной железы была верифицирована при рутинном гистологическом исследовании, после чего иммуногистохимически определяли экспрессию TS. Данные общей выживаемости были проанализированы путем построения кривых Каплана–Майера. Выживаемость в группах сравнивали с помощью log-rank теста.

Медиана выживаемости больных с высокой экспрессией TS на 14 месяцев больше, чем у больных с низкой экспрессией TS (36 и 12 соотв.). Преимущество в выживаемости больных с высокой экспрессией TS является статистически значимым ( $p=0,005$ ). Высокий уровень иммуногистохимической экспрессии TS в опухолях больных РПЖ может положительно влиять на прогноз больных, получающих полихимиотерапию по схеме ГемТег в адъювантном режиме.

Pancreatic cancer (PC) is one of 4 cancers with the highest mortality. Fluoropyrimidine and gemcitabine combination is well known and effective in palliative chemotherapy in PC. Much less frequent the combination is used in adjuvant setting, though it was shown to influence long term survival. However, the effect varies in patients with different tumor phenotype. The purpose of our study is to investigate the association between intratumoral thymidylate synthase (TS) level and overall survival of patients with PC treated with gemcitabine and tegafur (GemTeg) in adjuvant setting. 62 radically resected patients with PC are involved in the study. Adjuvant GemTeg chemotherapy started not earlier then 2 weeks postoperatively. Ductal adenocarcinoma of the pancreas was verified histologically in all cases. Afterwards TS expression was evaluated immunohistochemically. Kaplan-Meier curves and log-rank test were used to evaluate the survival.

Median survival in patients with high TS expression was 14 months longer than in patients with low TS expression (36 vs 12). The survival benefit in patients with high TS was statistically considerable ( $p=0.005$ ). High intratumoral level of TS in PC may positively influence prognosis of patients treated by GemTeg in adjuvant setting.

**Постановка проблемы и анализ последних исследований и публикаций.** Рак поджелудочной железы (РПЖ) является одним из самых распространенных в структуре онкологической смертности. Радикальная резекция дает шанс на длительное выживание этим больным, но несмотря на это 5-летняя выживаемость не превышает 20 %. Поэтому считается, что только хирургичес-

кого лечения недостаточно для успешного лечения РПЖ, и после операции этим больным всегда назначают адъювантное лечение. В последнее время было проведено несколько рандомизированных исследований и метаанализ, которые подтвердили эффективность адъювантной химиотерапии, в частности монотерапии фторпиримидинами и гемцитабином у больных РПЖ.

Комбинации фторпиримидинов и гемцитабина давно и активно используются в паллиативной химиотерапии РПЖ, эффективность этих комбинаций была доказана многими рандомизированными исследованиями и метаанализами [1]. В адьювантной терапии РПЖ такую комбинацию (S1 + гемцитабин) впервые внедрили в Японии в 2002 году [2].

S1 является комплексным пероральным препаратом, который содержит в себе тегафур (метаболический предшественник 5-фторурацила (5-ФУ)), гимерацил – ингибитор дегидропиридиндегидрогеназы (DPD) (фермент, который инактивирует 5-фторурацил в опухолевых и нормальных клетках) и отерацил – фермент, который не проникает сквозь кишечную стенку, тормозит переход тегафура в 5-ФУ непосредственно в кишечнике и, таким образом, снижает гастроинтестинальную токсичность. Соотношение составляющих составляет 1:0.4:1 соответственно. Препарат пользуется популярностью в азиатском регионе, так как его максимально переносимая доза примерно в 3 раза выше для азиатской популяции, чем для кавказской, что может быть вызвано полиморфизмом гена цитохрома CYP2A6.

Результаты указанного исследования показали, что эта комбинация может влиять на долгосрочную выживаемость, но ее эффект значительно отличается среди пациентов с различным фенотипом опухоли и, как следствие, в целом не улучшает результаты. С тех пор Nakamura et al. провели поиск биомаркеров, которые служили прогностическим критерием эффективности схемы “S1 + гемцитабин” [3]. В качестве биомаркеров были исследованы DPD и hENT1 (human equilibrative nucleotide transporter 1).

Последний является ключевым ферментом, который участвует в транспорте гемцитабина в опухолевую клетку, влияние его экспрессии ответа до гемцитабина широко обсуждалось в литературе. Высокая экспрессия этого фермента коррелирует с ответом опухоли на терапию гемцитабином, при этом не влияет на прогноз больных,

которых лечат без применения гемцитабина [3–5].

В результате этого исследования было установлено, что низкая экспрессия DPD и высокая экспрессия hENT1 в клетках опухоли являются положительными прогностическими факторами, влияющими на долгосрочную выживаемость больных РПЖ при адьювантной терапии по схеме “S1 + гемцитабин”.

В сегодняшнем фармакологическом арсенале в Украине среди фторпиримидинов нет аналогов препарата S1, но есть доступный пероральный тегафур, который широко используется в моно- и комбинированных режимах химиотерапии [6].

С другой стороны, известно, что кроме DPD, на метаболизм фторпиримидинов влияет еще тимидилитсинтаза (TS). Последняя является ферментом, катализирующим редуцированное метилирование 2'-дезоксисуридин-5'-монофосфата 5,10-метилена-5,6,7,8-тетрагидрофолата. В результате получается тимидин-5-монофосфат и 7,8-дигидрофолат. TS – это димер, состоящий из двух идентичных субъединиц с молекулярной массой около 30–35 кДа [7, 8]. Известно два основных пути метаболизма пиримидинов в синтезе ДНК: синтез пиримидина *de novo* и утилизация уже имеющегося пиримидина в клетке. TS – это ключевой фермент в синтезе пиримидинов *de novo*, а также одна из основных мишеней в терапии фторпиримидинами, в частности тегафуром. Влияние экспрессии TS в опухолях разных локализаций на ответ на химиотерапию давно обсуждается в литературе [9, 10]. M. Takamura et al. в своем исследовании показал положительное влияние высокой экспрессии TS на результаты фторпиримидинсодержащей адьювантной химиотерапии у больных РПЖ [11].

**Цель работы:** установление взаимосвязи между интратуморальной экспрессией hENT1 и TS и эффективностью схемы тегафур + гемцитабин в адьювантном режиме больных РПЖ. В данной статье будут представлены только результаты влияния TS на общую выживаемость.

Таблица 1. Клинико-морфологические характеристики пациентов

	Высокая экспрессия TS n=36 (100 %)	Низкая экспрессия TS n=26 (100 %)
Первичная опухоль T2	20 (55,6 %)	13 (50 %)
Первичная опухоль T3/T4	16 (44,4 %)	13 (50 %)
Нодальный статус N0	17 (47,2 %)	12 (46,2 %)
Нодальный статус N1	19 (52,8 %)	14 (53,8 %)
Степень дифференцировки GI–GII	12 (33,3 %)	10(38,5 %)
Степень дифференцировки GIII–GIV	24 (66,7 %)	16 (61,5 %)

**Матеріали і методи.** Исследование было проведено на клинической базе кафедры общей хирургии № 1, в Киевском центре хирургии печени, желчных протоков и поджелудочной железы имени В. С. Земскова (КГКБ № 10). В исследование были вовлечены 62 пациента, которым была выполнена радикальная резекция по поводу РПЖ с 2012 по 2016 г. Среди них у 39 панкреатодуоденальная резекция (ПДР), у 18 дистальная резекция и 3 тотальные панкреатэктомии. В таблице 1 приведены клинико-морфологические характеристики пациентов.

Все больные начинали адьювантную химиотерапию по новой схеме гемцитабин + тегафур (ГемТег) не ранее 2 недель после операции, при отсутствии хирургических осложнений, уровне гемоглобина  $>90$  г/л, лейкоцитов  $>3,5 \times 10^9/\text{л}^1$  и тромбоцитов  $>100 \times 10^9/\text{л}^1$ . Применение схемы ГемТег было одобрено локальным этическим комитетом, все пациенты подписали информированное согласие на участие в исследовании. Схема состояла из 6 и 4-недельных циклов. Каждый цикл включал гемцитабин внутривенно в 1, 8 и 15 день из расчета  $1000 \text{ мг}/\text{м}^2$ , тегафур перорально по 400 мг 2 раза в день в течение 21 дня + 7 дней перерыва.

Иммуногистохимическое исследование для маркера TS проводили в отделении патологической анатомии НДСБ «ОХМАТДЕТ» с помощью моноклонального анти-TS антитела TS106 (NeoMarkers Inc., Fremont, CA) в соответствии с протоколом производителя с использованием системы детекции EnVision™ FLEX (Dako, Denmark). Срезы докрасивают гематоксилином Gill. В качестве положительного контроля использованы клетки рака прямой кишки с подтвержденной ранее высокой экспрессией TS. Для отрицательного контроля проводили процедуру без применения первичных антител. Оценку результатов ИГХ-реакции определяли как негативную (0), слабую (1+) – окраска менее интенсивная, чем в положительном контроле, умеренную (2+) – окраска идентичная положительному контролю и высокую (3+) – более интенсивная, чем в положительном контроле. Низкой экспрессию TS считали окраски меньше чем в 50 % опухолевых клеток с интенсивностью  $< 2+$  (рис. 1), а высокой – окраска 2+ и 3+ больше чем в 50 % опухолевых клеток. Протоковая аденокарцинома поджелудочной железы предварительно была диагностирована во всех препаратах при рутинном гистологическом исследовании.

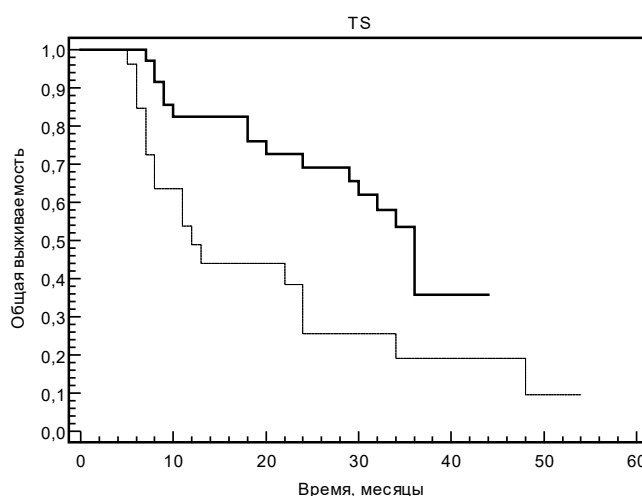
Все больные во время и после адьювантного лечения подлежали диспансерному наблюдению. Данные общей выживаемости были проана-

лизированы путем построения кривых Каплана–Майера. Выживаемость в группах сравнивали с помощью log-rank теста.

**Результаты исследований и их обсуждение.**

В целом, схема ГемТег удовлетворительно переносилась больными в адьювантном режиме. В редукции дозы минимум на 25 % нуждались 29 (46,8 %) пациентов.

Как можно увидеть на рисунке 1, общая выживаемость больных с высоким уровнем TS значительно превышала выживаемость больных с низким уровнем TS,  $p=0,005$ .



**Рис. 1.** Кривые Каплана–Майера. Жирная линия – больные с высокой экспрессией TS, тонкая линия – больные с низкой экспрессией TS,  $p=0,005$ .

Медианы общей выживаемости на момент статистической обработки данных составляли 36 и 12 месяцев для больных с высоким и низким уровнем TS соответственно. Стоит отметить, что на момент статистической обработки еще не было больных, которые достигли 5-летней выживаемости. Что касается 3-летней выживаемости, то среди больных с высокой экспрессией TS она составляет 34 %, а среди больных с низкой экспрессией TS на данный момент – 18 %.

**Выводы.** Таким образом, высокий уровень иммуногистохимической экспрессии TS в опухолях больных РПЖ можно использовать для прогнозирования ответа на полихимиотерапию по схеме ГемТег в адьювантном режиме. Медиана выживаемости больных с высокой экспрессией TS на 24 месяца больше, чем у больных с низкой экспрессией TS. Преимущество в выживаемости больных с высокой экспрессией TS является статистически значимым ( $p=0,005$ ).

#### СПИСОК ЛІТЕРАТУРИ

1. Role of gemcitabine-based combination therapy in the management of advanced pancreatic cancer: a meta-analysis of randomised trials / D. Ciliberto, C. Botta, P. Correale [et al.] // *Eur. J. Cancer.* – 2013. – Vol. 49. – P. 593–603.
2. Adjuvant gemcitabine plus S-1 chemotherapy after surgical resection for pancreatic adenocarcinoma / Y. Murakami, K. Uemura, T. Sudo [et al.] // *Am. J. Surg.* – 2008. – Vol. 195. – P. 757–762.
3. Combined Analysis of Dihydropyrimidine Dehydrogenase and Human Equilibrative Nucleoside Transporter 1 Expression Predicts Survival of Pancreatic Carcinoma Patients Treated with Adjuvant Gemcitabine Plus S-1 Chemotherapy after Surgical Resection / N. Kondo, Y. Murakami, K. Uemura [et al.] // *Ann. Surg. Oncol.* – 2012. – Vol. 19. – P. 646–655.
4. Human equilibrative nucleoside transporter 1 predicts survival in patients with pancreatic cancer treated with gemcitabine: a meta-analysis / Y. Zhu, M. Qi, L. Lao [et al.] // *Genet. Test. Mol. Biomarkers.* – 2014. – Vol. 18(5). – P. 306–312.
5. Human equilibrative nucleoside transporter 1 is not predictive for gemcitabine efficacy in advanced pancreatic cancer: Translational results from the AIO-PK0104 phase III study with the clone SP120 rabbit antibody / S. Ormanns, V. Heinemann, M. Raponi [et al.] // *European Journal of Cancer.* – Vol. 50, Issue 11. – P. 1891–1899.
6. Г. Пуркалне. Терапія тегафуром в комбінації з оксалиплатином (ТегОХ) для пацієнтів з метастатичним колоректальним раком / Г. Пуркалне, В. Козировскис, А. Гериня-Берзиня // *Latvijas rsts.* – 2016. – 1. – P. 46–47.
7. Ivanetich K. M. Bifunctional thymidylate synthase-dihydrofolate reductase in protozoa / K. M. Ivanetich, D. V. Santi // *FASEB J.* – 1990. – Vol. 4. – P. 1591–1597.
8. Crystallization of human thymidylate synthase / C. A. Schiffer, V. J. Davisson, D. V. Santi, R. M. Stroud // *J. Mol. Biol.* – 1991. – Vol. 219. – P. 161–163.
9. Thymidylate synthase inhibition in malignant tumors and normal liver of patients given intravenous 5-fluorouracil / S. P. Spears, B. G. Gustavsson, M. S. Mitchell [et al.] // *Cancer Res.* – 1984. – Vol. 44. – P. 4144–4150.
10. Thymidylate synthase inhibition after administration of fluorouracil with or without leucovorin in colon cancer patients: implications for treatment with fluorouracil / G. J. Peters, C. L. van der Wilt, C. J. van Groeningen // *J. Clin. Oncol.* – 1994. – Vol. 12. – P. 2035–2042.
11. Implication of thymidylate synthase in the outcome of patients with invasive ductal carcinoma of the pancreas and efficacy of adjuvant chemotherapy using 5-fluorouracil or its derivatives / M. Takamura, Y. Nio, K. Yamasawa [et al.] // *Anti-Cancer Drugs.* – 2002. – Vol. 13. – P. 75–85.

Получено 07.10.16