

ZNACZENIE SYNTETAZY TYMIDYLOWEJ W ROKOWANIU U CHORYCH Z RAKIEM JELITA GRUBEGO

Anna Patla

Katedra i Klinika Onkologii, Collegium Medicum Uniwersytetu Jagiellońskiego w Krakowie

1 WSTĘP

Rak jelita grubego (okrężnicy i odbytnicy) jest jednym z najczęstszych nowotworów złośliwych. Szacuje się, że jest trzecim co do częstości nowotworem złośliwym na świecie, stanowiąc około 9% ogółu zachorowań u mężczyzn i 10% u kobiet. W 1999 roku zarejestrowano w Polsce 10 020 nowych zachorowań na raka jelita grubego i 7 124 zgony [9]. Szczególnie niekorzystną cechą polskich chorych na raka jelita grubego jest niski odsetek wyleczeń.

Podstawowym leczeniem tego nowotworu jest zabieg operacyjny, który stwarza możliwość wyleczenia około 50% chorych. U pozostałych wcześniej czy później dochodzi do wznowy i rozsiewu. Zwykle wymagają oni leczenia chemicznego, którego skuteczność jest rzędu 40-50% [1, 6]. U chorych z niekorzystnymi czynnikami rokowniczymi chemioterapia stosowana jest również jako leczenie uzupełniające.

Mimo ogromnych wysiłków badawczych najczęściej stosowanym cytostatykiem w leczeniu raka jelita grubego pozostaje nadal fluorouracyl. Skuteczność działania fluorouracylu i jego pochodnych, jak ralitrekseid (Tomudeks) czy kapecytabina (Xeloda), zależy od aktywności syntetazy tymidylowej (TS).

Syntetaza tymidylowa (TS) jest podstawowym enzymem niezbędnym do syntezy DNA. Katalizuje ona metylację kwasu deoksyurydylowego (dUMP) do kwasu tymidylowego (TMP), niezbędnego składnika kwasu dezoksyrybonukleinowego [1].

Fluorouracyl ulega wewnątrzkomórkowemu przekształceniu do biologicznie czynnych metabolitów: fosfodeoksyrybonukleotydu (F-dUMP)

oraz trójfosforanu fluorouracydylu (FUTP). F-dUMP blokuje syntetazę tymidylową i tym samym prowadzi do zahamowania syntezy DNA i do śmierci komórki (tzw. *tymidineless death*). Równocześnie wbudowanie FUTP do kwasu rybonukleinowego i zablokowanie fosfatazy uracylowej zaburza przekształcenie uracylu i powstaje RNA o nieprawidłowej budowie. Wrażliwość lub oporność na fluorouracyl i jego pochodne zależy w głównej mierze od stopnia związania syntetazy tymidylowej. Przypuszcza się również, że ilość syntetazy tymidylowej może odgrywać rolę w powstawaniu oporności na fluorouracyl [7, 8].

Najistotniejszym czynnikiem rokowniczym w raku jelita grubego jest jego stopień zaawansowania [3]. Wyniki badań nad rolą innych czynników prognostycznych nie są jednoznaczne. W ostatnich latach prowadzonych było szereg badań nad zidentyfikowaniem markerów biochemicznych i molekularnych w celu wyłonienia grupy chorych najbardziej zagrożonych niepowodzeniem po leczeniu operacyjnym [1, 3, 10]. Dodatkowo markery te mogłyby pomóc w identyfikacji chorych, którzy odnieśliby korzyść z uzupełniającej chemioterapii.

Ostatnio coraz większe zainteresowanie budzi hipoteza, że ekspresja syntetazy tymidylowej (TS) może być niezależnym czynnikiem prognostycznym. Chorzy z wysokim poziomem ekspresji TS mają mieć gorsze rokowanie niż chorzy z niskim poziomem ekspresji TS [1, 3, 5].

2 CEL PRACY

Celem pracy jest określenie wartości prognostycznej i predykcyjnej ekspresji syntetazy tymidylowej w raku jelita grubego. Wartość prognostyczna związana jest z dostarczeniem informacji na temat przewidywanego przebiegu choroby. Wartość predykcyjna wiąże się z możliwością przewidywania określonych efektów zastosowanego leczenia.

3 MATERIAŁ

W latach 1992-2001 skierowano do Kliniki Onkologii CM UJ 120 chorych na raka jelita grubego z rozpoznaniem zweryfikowanym badaniem histologicznym. Charakterystykę tych chorych przedstawia tabela 1.

Tabela 1. Charakterystyka chorych na raka jelita grubego skierowanych do Kliniki Onkologii CM UJ (n=120).

Cecha	Liczba chorych	Odsetek chorych
Płeć		
mężczyźni	74	62%
kobiety	46	38%
Wiek (średni wiek 59,4 lat)		
≤ 60 lat	64	53,3%
> 60 lat	56	46,7%
Lokalizacja guza		
okrężnica	42	35%
odbytnica	78	65%
Postać histologiczna		
gruczolakorak	117	97,5%
inna	3	2,5%
Stopień zróżnicowania histologicznego		
G1	63	52,5%
G2	56	46,7%
G3	1	0,8%
Głębokość nacieku nowotworowego		
pT2	12	10%
pT3	72	60%
pT4	36	30%
Przerzuty do węzłów chłonnych		
pN0	64	53,3%
pN1	39	32,5%
pN2	17	14,2%
Przerzuty odległe		
M0	101	84,2%
M1	19	15,8%
Zaawansowanie wg Dukeasa/TNM		
A / I°	4	3,3%
B / II°	52	43,3%
C / III°	45	37,5%
D / IV°	19	15,8%
Radykalność mikroskopowa zabiegu		
tak	73	60,8%
nie	47	39,2%

Cecha	Liczba chorych	Odsetek chorych
Zatory z komórek nowotworowych w naczyniach		
nie	96	80%
tak	24	20%

Jak wynika z tabeli 1, w analizowanej grupie przeważali chorzy na raka odbytnicy (65% ogółu) oraz mężczyźni (62% ogółu). Średni wiek chorych wynosił 59,4 lat. U 97,5% badanych rozpoznano gruczolakoraka. Najczęściej były to raki o wysokim stopniu zróżnicowania histologicznego (G1=52,5%). Raki o niskim stopniu zróżnicowania G3 stanowiły zaledwie 0,8% ogółu. 60% chorych miało raka naciekającego poza błonę mięśniową, tj. z naciekiem surowicówki i/lub tkanki tłuszczowej okołojelitowej, a u 53,3% chorych brak było przerzutów do okolicznych węzłów chłonnych. Niemal 16% analizowanych chorych miało przerzuty odległe. Ponad 53% chorych miało raka jelita grubego w III i IV stopniu zaawansowania (Dukes C i D). Zabieg operacyjny był mikroskopowo radykalny u niemal 61% chorych. Zatory nowotworowe w naczyniach chłonnych i/lub krwionośnych stwierdzono u 20% badanych.

Stosowanie napromieniania przedoperacyjnego oraz radiochemioterapii możliwe było z chwilą uzyskania w 1999 roku dostępu do akceleratora liniowego w Dziecięcym Szpitalu Uniwersyteckim w Prokocimiu.

10 chorych leczonych w latach 1999-2001, tj. 8,3% ogółu, było napromienianych przedoperacyjnie. Dotyczyło to chorych na raka odbytnicy w stopniu zaawansowania T3 i T4. 98 chorych, tj. 81,7% ogółu, otrzymało chemioterapię z fluorouracylem. W grupie tej znalazło się 45 chorych (45,9% leczonych chemicznie), którzy w latach 1999-2001 mieli chemioradioterapię. 36 chorych, tj. 36,7% leczonych chemicznie, otrzymało 5-FU jako leczenie uzupełniające, zwykle w kombinacji z kwasem folinowym (FA). 17 chorych, tj. 17,3% leczonych chemicznie, otrzymało chemioterapię paliatywną 5-FU + FA. Dotyczyło to chorych z rozsianym procesem nowotworowym. 12 chorych leczonych było wyłącznie operacyjnie.

W całej analizowanej grupie 120 chorych oceniono ekspresję TS metodą immunohistochemiczną.

4 METODYKA

Biorąc pod uwagę sposób postępowania u chorych na raka jelita grubego w Klinice Onkologii CM UJ w latach 1992-2001 i liczebności wynoszące co najmniej 30 pacjentów, analizę przeprowadzono w czterech grupach chorych, tj.:

- cała grupa (n=120),
- wszyscy chorzy leczeni chemicznie fluorouracylem (n=98),
- leczeni chemioradioterapią (n=45),
- leczeni uzupełniająco chemioterapią (n=36).

Informacje dotyczące charakterystyki guza nowotworowego, takie jak: lokalizacja, zaawansowanie, radykalność zabiegu operacyjnego, uzyskano na podstawie wyniku badania histopatologicznego materiału operacyjnego ocenianego pod mikroskopem optycznym. Głębokość nacieku nowotworowego (pT), liczba zajętych węzłów chłonnych (pN), margines operacyjny, obecność zatorów z komórek nowotworowych w świetle naczyń chłonnych i/lub krwionośnych oznaczano rutynowo u wszystkich chorych w preparatach parafinowych barwionych hematoxyliną i eozyną.

Ze względu na zbyt małe liczebności w poszczególnych grupach dla celów analizy statystycznej podzielono chorych na tych ze stopniem różnicowania histologicznego G1 versus G2+G3, głębokością nacieku nowotworowego pT2+pT3 versus pT4, obecnością lub brakiem przerzutów do węzłów chłonnych (pN0 versus pN1+pN2), zaawansowaniem określonym według rozbudowanego podziału Dukesa A+B versus C+D, zaawansowaniem według pTNM I^o + II^o versus III^o + IV^o.

4.1 Metodyka oznaczania ekspresji syntetazy tymidylowej

Ekspresję syntetazy tymidylowej oznaczono w Zakładzie Patomorfologii CM UJ metodą immunohistochemiczną przy użyciu przeciwciała monoklonalnego TS 106. W tym celu wybrano po 2 skrawki z różnych części guza od każdego z pacjentów. Błoczki parafinowe krojono na skrawki o grubości 4 µm, odparafinowano i uwodniono w roztworze etanolu. Zablokowano działanie endogennej peroksydazy. Odmaskowanie antygenu dokonano, gotując preparaty w EDTA, pH 8,0, zakrapiając proteinazą K. Skrawki inkubowano z przeciwciałem TS 106

(mysie przeciwciała monoklonalne przeciwko syntetazie tymidylowej, Chemicon International, Temecula, CA 92590) przez 60 minut. Następnie płukano w TBS i inkubowano w DAKO EnVision+TM, Peroxidase, Mouse (DAKO Corporation, USA). Reakcję wykończono substratem – chromogen AEC (DAKO AEC). Przygotowano wodny preparat zamknięty w glicerożelu.

W ocenie immunohistochemicznej preparatów oceniano pod mikroskopem optycznym intensywność wybarwienia komórek (siła ekspresji) oraz liczba komórek wybarwionych (charakter ekspresji) w skali od 0 do 3. Dla celów analizy statystycznej wybrano chorych ze słabą siłą ekspresji TS (wynik wg skali ocen równy 0 i 1) oraz mocną ekspresją (wynik wg skali ocen: 2 i 3). Charakter ekspresji TS podzielono na ogniskowy (wg skali ocen wynik: 0 i 1) oraz rozlany (wg skali ocen wynik: 2 i 3).

4.2 Metodyka analizy statystycznej

Analizy statystycznej dokonano przy użyciu programu *STATISTICA*.

Analizując czynniki rokownicze u chorych na raka jelita grubego, wykorzystano standardową procedurę stosowaną w podobnych badaniach. Czynniki badane pod kątem ich znaczenia prognostycznego miały charakter jakościowy (np. płeć, lokalizacja), bądź też zostały skategoryzowane przez wykorzystanie ogólnie przyjętych punktów odcięcia (np. wiek powyżej i poniżej średniej). Krzywe przeżyć całkowitych oszacowano metodą Kaplana-Meiera, co umożliwiło wykorzystanie również tzw. obserwacji uciętych. Przeżycia porównywano testem log-rank. W tabelach z wynikami przedstawiono przeżycia pięcioletnie (OS) oraz wartość prawdopodobieństwa testowego p. Dla grupy 45 chorych leczonych chemioradioterapią najdłuższy okres obserwacji wynosił 47 miesięcy, toteż w tabelach z wynikami podano dla poszczególnych ocenianych czynników przeżycie 3-letnie zamiast 5-letniego. We wszystkich użytych w pracy testach statystycznych jako różnicę znamionną przyjęto taką, dla której wartość odpowiedniego prawdopodobieństwa testowego (wartość p) była mniejsza od poziomu istotności $\alpha=0,05$. Wyniki testu log-rank w analizie jednocechowej pozwoliły na wyłonienie wstępnej listy istotnych czynników rokowniczych oraz

czynników predykcyjnych co do chemioterapii fluorouracylem.

Pełny obraz ich działania uzyskano, szacując wielowymiarowe modele regresji Coxa. Wstępny zbiór zmiennych objaśniających w tych modelach stanowiły czynniki o istotnej znamienności statystycznej stwierdzonej w analizie jednocechowej (tj. teście log-rank). Następnie zbadano korelacje między poszczególnymi czynnikami, stosując macierz korelacji w celu wyeliminowania parametrów o istotnych współczynnikach korelacji z $p < 0,05$.

Proces eliminacji zmiennych zakończono wyłonieniem czynników, dla których ryzyka względne były istotne statystycznie. Tak otrzymany model pozwala na identyfikację niezależnych czynników rokowniczych, ich wzajemną standaryzację oraz porównanie siły działania.

Prezentując wyniki obliczeń przy użyciu modelu proporcjonalnego hazardu Coxa w tabelach podano ryzyko względne zgonu (RR), 95% przedziały ufności oraz wartość prawdopodobieństwa testowego p.

Ryzyko względne zgonu (RR) związane z analizowaną zmienną obliczono na podstawie wzoru:

$$RR = e^{\beta}$$

gdzie:

e – podstawa logarytmu naturalnego ($e = 2,71828$),

β – współczynnik uzyskany w modelu Coxa [4].

5 WYNIKI BADAŃ

5.1 Wartość ekspresji syntetazy tymidylowej

Wartość ekspresji syntetazy tymidylowej oznaczanej metodą immunohistochemiczną w całej grupie, w grupie chorych leczonych chemicznie 5-FU, w grupie leczonej uzupełniająco chemioterapią oraz chemioradioterapią przedstawia tabela 2.

Większość analizowanych chorych cechowała się mocną i rozlaną ekspresją TS. Warto zauważyć, że w przeciwieństwie do chorych leczonych chemioterapią uzupełniająco w grupie chorych leczonych chemioradioterapią odsetek

pacjentów z ogniskową ekspresją TS był bardzo zbliżony do odsetka z ekspresją rozlaną.

Tabela 2. Wartość ekspresji syntetazy tymidylowej (TS) oznaczanej metodą immunohistochemiczną.

Cecha	Charakter	Wszystcy chorzy n=120 %	Leczeni chemicznie (n=98) %	Leczeni uzupełniająco chemioterapią (n=36) %	Leczeni chemioradioterapią (n=45) %
Siła ekspresji TS	słaba (0,1)	35,8	35,7	36,1	37,8
	mocna (2,3)	64,2	64,3	63,9	62,2
Charakter ekspresji TS	ogniskowa (0,1)	41,6	40,8	38,9	48,9
	rozlana (2,3)	58,4	59,2	61,1	51,1

5.2 Wpływ badanych czynników na przeżycie – analiza jednocechowa

Zależności między badanymi cechami a przeżyciami wszystkich 120 chorych, 98 chorych leczonych chemicznie, 36 chorych leczonych uzupełniająco 5-FU i 45 leczonych chemioradioterapią prezentuje tabela 3.

Jak wynika z tabeli 3 na przeżycie 5-letnie w grupie 120 chorych wpływały istotnie zaawansowanie procesu nowotworowego, radykalność mikroskopowa zabiegu operacyjnego, obecność zatorów z komórek nowotworowych w naczyniach krwionośnych i/lub chłonnych oraz charakter ekspresji TS, co obrazuje rys. 1.

Na przeżycie 5-letnie w grupie 98 chorych leczonych chemicznie wpływały istotnie lokalizacja guza, zaawansowanie procesu nowotworowego, radykalność mikroskopowa zabiegu operacyjnego oraz charakter ekspresji TS, co obrazuje rys. 2.

Na przeżycie 5-letnie w grupie 36 chorych leczonych chemioterapią uzupełniająco z 5-FU wpływały istotnie głębokość nacieku nowotworowego pT oraz charakter ekspresji TS, natomiast na przeżycie 3-letnie w grupie 45 chorych leczonych chemioradioterapią wpływało istotnie jedynie zaawansowanie procesu nowotworowego.

Tabela 3. Ocena zależności między dostępnymi cechami charakteryzującymi chorych na raka jelita grubego a przeżyciami – analiza jednocechowa.

Cecha	Wszyscy chorzy n=120			Leczeni chemicznie n=98			Leczeni chemioterapią uzupełniającą n=36			Leczeni chemioradioterapią n=45		
	n	OS (%)	p	n	OS (%)	p	n	OS (%)	p	n	OS (%) 3-letnie	p
Płeć mężczyźni kobiety	74 46	63 62	0,5160	58 40	64 59	0,9041	19 17	61 65,5	0,8720	28 17	85 87,5	0,5408
Wiek ≤ 60 lat > 60 lat	64 56	64 60	0,2027	56 42	61 62	0,6604	19 17	71 54,5	0,3305	27 18	88,5 83,5	0,8602
Lokalizacja okrężnica odbytnica	42 78	52 69	0,1484	39 59	47,5 72	0,0166*	29 7	65,5 60	0,8265	0 45	---- 85,9	----
Stopień zróżnicowania histolog. G1 G2 + G3	63 57	73 52	0,2357	49 49	73,5 53	0,2277	22 14	75 51,5	0,2796	19 26	93,3 81,6	0,5653
Głębokość nacieku nowotworowego pT pT2 pT3 pT4 pT2+pT3 vs. pT4	12 72 36	75 71 40 71 vs. 40	0,0005*	7 61 30	71,5 70 42 70 vs. 42	0,0029*	3 22 11	67 81,5 36,5 79 vs. 36,5	0,0408*	2 32 11	100 89 77,5 100 vs. 85,2	0,2410
Przerzuty do węzłów chłonnych pN pN0 pN1 + pN2	64 56	77 45	0,0054*	46 52	75 49	0,0338*	13 23	78,5 54	0,1379	24 21	100 74	0,0488*
Przerzuty odległe M0 M1	101 19		0,0000*	81 17	75 0	0,0000*	36 0		----	45 0	85,9 ----	----
Zaawansowanie wg Duke'a /TNM A+B/ I° + II° C+D/ III° +IV°	56 64	85 2	0,0001*	38 60	86,5 45	0,0003*	13 23	78,5 54	0,1379	24 21	100 74	0,0488*
Radykalność mikroskopowa zabiegu operacyjnego tak nie	73 47	75 40	0,0031*	61 37	74 32,5	0,0066*	28 8	65 58	0,8744	31 14	86,5 80	0,8878
Zatory z komórek nowotworowych w naczyniach nie tak	96 24	70 36	0,0018*	78 20		0,0584	34 2	60 100	0,2142	35 10	86,5 85,7	0,6444
Siła ekspresji TS mała (0,1) duża (2,3)	43 77	74 55	0,1896	35 63	75 52	0,0908	13 23	84 50	0,1610	17 28	86 86,1	0,8677
Charakter ekspresji TS ogniskowa (0,1) rozlana (2,3)	50 70	82 48	0,0024*	40 58	85 43,7	0,0013*	14 22	93 40	0,0129*	22 23	88,5 82	0,7722

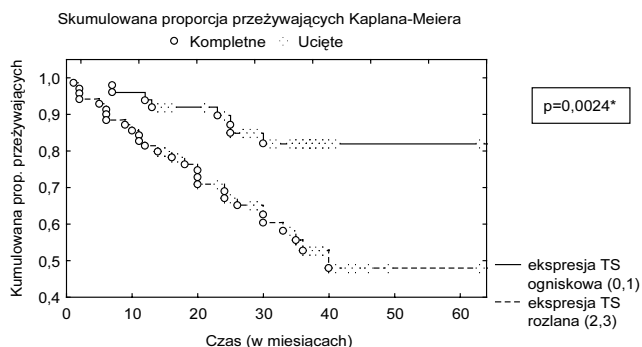
* wartość statystycznie istotna (p<0,05)

5.3 Wpływ badanych czynników na przeżycie – analiza wielocechowa

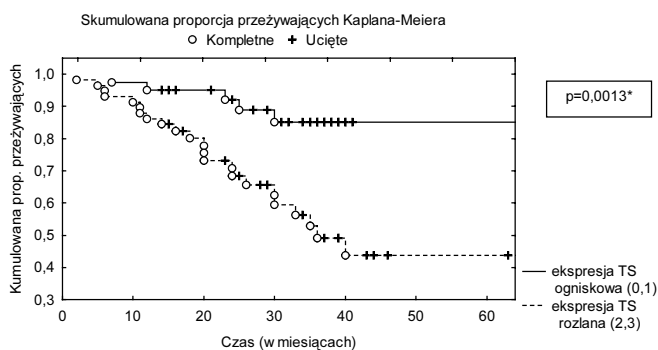
Badając zależności między dostępnymi cechami a przeżyciami 120 chorych na raka jelita

grubego w analizie jednocechowej, stwierdzono, że istotnymi czynnikami prognostycznymi są: głębokość nacieku nowotworowego (pT), obecność przerzutów do węzłów chłonnych (pN), obecność przerzutów odległych (M),

zaawansowanie procesu nowotworowego, radykalność mikroskopowa zabiegu operacyjnego, zatory z komórek nowotworowych w naczyniach oraz charakter ekspresji TS.



Rys. 1. Porównanie krzywych przeżywalności Kaplana-Meiera w grupie 120 chorych w zależności od charakteru ekspresji TS (ogniskowa versus rozlana).



Rys. 2. Porównanie krzywych przeżywalności Kaplana-Meiera w grupie 98 chorych leczonych chemicznie w zależności od charakteru ekspresji TS (ogniskowa versus rozlana).

Warto zauważyć, że wyniki analizy co do zaawansowania określonego według klasyfikacji Astlera-Collera (rozbudowany podział Dukesa) A+B versus C+D są identyczne z zastosowaniem klasyfikacji TNM. W analizie wieloczechowej zdecydowano się na użycie tej ostatniej (zaawansowanie I^o + II^o versus III^o + IV^o).

Tabela 4. Korelacje między zaawansowaniem procesu nowotworowego u 120 chorych na raka jelita grubego a innymi istotnymi czynnikami prognostycznymi.

Cecha	Współczynnik korelacji
pT	0,03
pN	0,88*
M	0,41*
Radykalność mikroskopowa zabiegu	-0,31*
Zatory z komórek nowotworowych	0,26*
Charakter ekspresji TS	0,09

* wartość statystycznie istotna ($p < 0,05$)

Dodatkowo zbadano korelację między zaawansowaniem procesu nowotworowego a cechami pT, pN, M, radykalnością zabiegu operacyjnego i obecnością zatorów z komórek nowotworowych w naczyniach. Obrazuje to tabela 4.

Na podstawie tabeli 4 w analizie wieloczechowej zmienne pN, M, radykalność mikroskopową zabiegu operacyjnego i zatory z komórek nowotworowych zastąpiono jedną cechą, tj. zaawansowaniem procesu nowotworowego. Ostatecznie więc do modelu Coxa użytego do analizy wieloczechowej w grupie 120 chorych weszły następujące zmienne: głębokość nacieku nowotworowego pT (pT2 + pT3 versus pT4), zaawansowanie (I^o + II^o versus III^o + IV^o) oraz charakter ekspresji TS (ogniskowa versus rozlana). Wyniki powyższej analizy obrazuje tabela 5.

Tabela 5. Wpływ czynników rokowniczych na całkowite przeżycie 5-letnie u 120 chorych na raka jelita grubego – analiza wieloczechowa.

Zmienna	Ryzyko względne zgonu (RR**)	95% przedziały ufności	Wartość p
Głębokość nacieku nowotworowego pT2 + pT3 pT4	1,0 1,82	1,43-2,22	0,0028*
Zaawansowanie I ^o + II ^o III ^o + IV ^o	1,0 1,97	1,59-2,35	0,0004*
Charakter ekspresji TS			
0,1 (ogniskowa)	1,0		
2,3 (rozlana)	2,36	1,56-3,16	0,0355*

* wartość statystycznie istotna ($p < 0,05$).

** RR = e^{β} , gdzie $e=2,71828$ jest podstawą logarytmu naturalnego.

Jak wynika z tabeli 5, głębokość nacieku raka określona badaniem mikroskopowym, stopień zaawansowania nowotworu (pTNM) oraz charakter ekspresji TS są istotnymi niezależnymi czynnikami rokowniczymi w raku jelita grubego.

W grupie 98 chorych na raka jelita grubego leczonych chemicznie fluorouracylem istotnymi zmiennymi wpływającymi na przeżycie w analizie jednocechowej były lokalizacja nowotworu (okreźnica v. odbytnica), głębokość nacieku nowotworowego (pT), obecność przerzutów do węzłów chłonnych (pN), obecność przerzutów odległych, zaawansowanie procesu nowotworowego, radykalność mikroskopowa zabiegu operacyjnego i charakter ekspresji TS (ogniskowa

v. rozlana). Podobnie jak przy analizie grupy 120 chorych, badanie grupy 98 chorych leczonych chemicznie rozpoczęto od określenia korelacji między zaawansowaniem procesu nowotworowego a pozostałymi istotnymi zmiennymi. Charakter tych korelacji obrazuje tabela 6.

Tabela 6. Korelacje między zaawansowaniem procesu nowotworowego u 98 chorych leczonych chemicznie a pozostałymi zmiennymi istotnie wpływającymi na przeżycie.

Cecha	Współczynnik korelacji
Lokalizacja	-0,18
pT	-0,02
pN	0,85*
M	0,36*
Radykalność mikroskopowa zabiegu	-0,32*
Charakter ekspresji TS	0,11

* wartość statystycznie istotna.

Jak wynika z powyższej tabeli, w wyniku istotnych korelacji w analizie wieloczechowej zaawansowanie procesu nowotworowego może zastąpić takie cechy, jak: przerzuty do węzłów chłonnych (pN), przerzuty odległe (M) i radykalność mikroskopową zabiegu operacyjnego. Ostatecznie więc dla analizy wieloczechowej w grupie 98 chorych leczonych chemicznie fluorouracyłem wykorzystano następujące zmienne: lokalizacja nowotworu, głębokość nacieku nowotworowego, zaawansowanie i charakter ekspresji TS. Wyniki tej analizy przedstawia tabela 7.

Tabela 7. Wpływ analizowanych zmiennych na całkowite przeżycie 5-letnie 98 chorych leczonych chemicznie fluorouracyłem – analiza wieloczechowa.

Zmienna	Ryzyko względne zgonu (RR ^{**})	95% przedziały ufności	Wartość p
Lokalizacja okrężnica odbytnica	1,0 1,91	1,12-2,70	0,0452*
Głębokość nacieku nowotworowego pT2 + pT3 pT4	1,0 1,80	1,41-2,20	0,0034*
Zaawansowanie II ^o III ^o + IV ^o	1,0 6,52	5,30-7,74	0,0026*
Charakter ekspresji TS			
0,1 (ogniskowa)	1,0		
2,3 (rozlana)	2,44	1,42-3,46	0,0853

* wartość statystycznie istotna (p<0,05).

** RR = e^β, gdzie e=2,71828 jest podstawą logarytmu naturalnego.

Jak wynika z tabeli 7, lokalizacja nowotworu (okrężnica versus odbytnica), głębokość nacieku nowotworowego (pT2,3 versus pT4) i zaawansowanie procesu nowotworowego są niezależnymi istotnymi czynnikami rokowniczymi u chorych na raka jelita grubego leczonych chemicznie. Natomiast nie udało się wykazać znamiennej i niezależnej od wymienionych powyżej czynników roli predykcyjnej ekspresji syntetazy tymidylowej u chorych na raka jelita grubego pobierających chemioterapię z fluorouracyłem.

W grupie 36 chorych leczonych chemioterapią uzupełniającą istotnymi zmiennymi wpływającymi na przeżycie w analizie jednocechowej były: głębokość nacieku nowotworowego (pT) oraz charakter ekspresji TS (ogniskowa v. rozlana). Na wstępie zbadano korelację między wyżej wymienionymi zmiennymi, nie wykazując istotności statystycznej (współczynnik korelacji wynosił -0,28). Dla analizy wieloczechowej w grupie 36 chorych leczonych chemioterapią uzupełniającą z fluorouracyłem wykorzystano więc zmienne takie jak: głębokość nacieku nowotworowego i charakter ekspresji TS. Wyniki tej analizy przedstawia tabela 8.

Tabela 8. Wpływ analizowanych zmiennych na całkowite przeżycie 5-letnie 36 chorych leczonych uzupełniająco fluorouracyłem – analiza wieloczechowa.

Zmienna	Ryzyko względne zgonu (RR ^{**})	95% przedziały ufności	Wartość p
Głębokość nacieku nowotworowego pT2 + pT3 pT4	1,0 1,39	0,73-2,05	0,3308
Charakter ekspresji TS			
0,1 (ogniskowa)	1,0		
2,3 (rozlana)	6,50	4,34-8,66	0,0895

** RR = e^β, gdzie e=2,71828 jest podstawą logarytmu naturalnego.

Jak wynika z tabeli 8, w grupie 36 chorych leczonych chemioterapią uzupełniającą z fluorouracyłem nie udało się wyodrębnić niezależnych istotnych czynników rokowniczych.

6 DYSKUSJA I OMÓWIENIE

Zagrożenie Polski rakiem jelita grubego istotnie wzrasta. Jednocześnie przeżycia 5-letnie przeciętnego Polaka chorującego na raka jelita

grubego są dwukrotnie niższe niż w krajach Unii Europejskiej [9]. Podkreśla to wagę problemu tej choroby w Polsce i konieczność podjęcia działań mających na celu poprawę istniejącej sytuacji. Późne rozpoznawanie raka jelita grubego w Polsce wiąże się również z dużym zapotrzebowaniem na leczenie chemiczne. Chemioterapia XX wieku opierała się przede wszystkim na wykrywanych przypadkowo lekach przeciwnowotworowych, będących nieswoistymi inhibitorami proliferacji komórek, tj. niedziałającymi wybiórczo na komórki nowotworowe i uszkadzającymi tkanki zdrowe.

Postępy w biologii molekularnej przyczyniły się do tego, że w XXI wieku pojawiła się tzw. celowana chemioterapia, której celem jest kontrola rozwoju nowotworu na poziomie molekularnym. Markery molekularne i biochemiczne mogą również ułatwić identyfikację chorych o zwiększonym ryzyku wznowy i rozsiewu nowotworowego. Niektóre z tych czynników prognostycznych mogą mieć również charakter predykcyjny w sensie identyfikacji grupy chorych odnoszących największe korzyści z odpowiedniej chemioterapii.

W 1994 roku Johnston i wsp. jako pierwsi opisali zależność między ekspresją syntetazy tymidylowej a rokowaniem w raku jelita grubego [7]. Od tego czasu ukazało się szereg publikacji poświęconych temu zagadnieniu [1-8, 10]. W większości badań wykazano istotne znaczenie rokownicze syntetazy tymidylowej [1, 3, 4, 5, 7, 8], a jedynie w nielicznych nie stwierdzono istotnego wpływu ekspresji TS na przeżycia chorych na raka jelita grubego [6, 10]. Oceniając wartość predykcyjną syntetazy tymidylowej jako markera odpowiedzi na leczenie fluorouracyłem otrzymano niejednoznaczne, często sprzeczne wyniki [2, 3, 10].

Na dzień dzisiejszy ekspresja syntetazy tymidylowej pozostaje najbardziej wiarygodnym markerem molekularnym co do rokowania w raku jelita grubego. Bardziej kontrowersyjna jest jej wartość predykcyjna co do wyników leczenia 5-FU [3-10].

Badania własne wykazały, że istotnym z punktu widzenia rokowniczego jest charakter, a nie siła ekspresji TS. Jest to zgodne z obserwacjami Gonena i wsp. (2003) i Allegry i wsp. (2003) [1, 5].

Być może, że 3-letni okres obserwacji jest za krótki na udowodnienie roli charakteru ekspresji TS pośród chorych na raka jelita grubego

leczonych chemioradioterapią. Niemniej jednak zaznaczył się pewien nieistotny trend niższych przeżyć 3-letnich wśród chorych z rozlaną ekspresją TS.

W analizie wielocechowej w grupie chorych leczonych 5-FU zaznacza się malejący trend przeżyć w miarę częstości rozlanej ekspresji TS. Być może, że osiągnąłby on istotność statystyczną i niezależność od lokalizacji, głębokości nacieku i zaawansowania z chwilą zbadania większej grupy chorych.

Podobna sytuacja dotyczy chorych leczonych uzupełniająco 5-FU.

Wyniki niektórych badań wskazują na to, że ekspresja TS w guzie pierwotnym nie musi odpowiadać tej stwierdzonej w ognisku przerzutowym raka jelita grubego u tego samego pacjenta [2, 6]. Tym samym ocena ekspresji TS w guzie pierwotnym nie będzie pełnić roli predykcyjnej co do wrażliwości mikroprzerzutów na chemioterapię uzupełniającą.

Podsumowując wyniki badań własnych można stwierdzić, że rozlany charakter ekspresji syntetazy tymidylowej jest obok nacieku nowotworowego innych narządów lub struktur i/lub przekraczającego otrzewną oraz zaawansowania w stopniu III i IV według pTNM najistotniejszym niezależnym niekorzystnym czynnikiem rokowniczym w raku jelita grubego.

Obserwacje własne wskazują, że w grupie chorych otrzymujących chemioterapię opartą na fluorouracylu największą korzyść z takiego leczenia odnieśli pacjenci z lokalizacją guza pierwotnego w odbytnicy, nowotworem nienaciekającym okolicznych narządów i struktur, bez przerzutów do regionalnych węzłów chłonnych. Zasadniczo byłoby to chorzy na raka odbytnicy o zaawansowaniu T3N0M0, u których wskazania do uzupełniającej chemioterapii są niejednoznaczne. Tak więc kwestia optymalnego doboru chorych do uzupełniającego leczenia chemicznego pozostaje nierozstrzygnięta. Pomimo, że pacjenci otrzymujący chemioterapię adiuwantową z 5-FU z ogniskową ekspresją TS mieli lepsze przeżycia całkowite, to jednak brak znamienności statystycznej nadal nie pozwala na wyodrębnienie grupy chorych odnoszących większą lub mniejszą korzyść z uzupełniającej chemioterapii.

Wyniki moich badań sugerują, że rozlany charakter ekspresji TS może pomóc w identyfikacji grupy chorych o zwiększonym ryzyku zgonu z powodu raka jelita grubego, którzy

powinni otrzymać bardziej agresywne leczenie. Tacy chorzy wydają się być dobrymi kandydatami do podania schematów chemioterapii z nowymi lekami, jak irinotekan czy oksaliplatyna.

7 WNIOSKI

- ◆ Charakter ekspresji syntetazy tymidylowej (ogniskowa versus rozlana) jest istotnym, niezależnym czynnikiem rokowniczym w raku jelita grubego.
- ◆ W grupie chorych leczonych chemioterapią z fluorouracylem istotnymi niezależnymi czynnikami rokowniczymi są: lokalizacja guza (odbytnica versus okrężnica), głębokość nacieku nowotworowego (pT2, pT3 versus pT4) i stopień zaawansowania klinicznego (II⁰, III⁰ versus IV⁰).
- ◆ Określenie roli predykcyjnej ekspresji syntetazy tymidylowej odnośnie skuteczności leczenia chemicznego raka jelita grubego wydaje się być wysoce celowe poprzez badania na dużych grupach pacjentów.

- 7) Johnston PG., Fisher ER., Rockette HE., et al. 1994. The role of thymidylate synthase expression in prognosis and outcome of adjuvant chemotherapy in patients with rectal cancer. *J Clin Oncol* 12, 2640-2647.
- 8) Leichman GC., Lenz HJ., Leichman L., et al. 1997. Quantitation of intratumoral thymidylate synthase expression predicts for disseminated colorectal cancer response and resistance to protracted infusion fluorouracil and weekly leucovorin. *J Clin Oncol* 15, 3223-3229.
- 9) Pawłęga J. 2002. *Zarys onkologii*. Kraków: Wydawnictwo Uniwersytetu Jagiellońskiego, 15, 107.
- 10) Tomiak A., Vincent M., Earle CC., et al. 2001. Thymidylate synthase expression in stage II and III colon cancer: a retrospective review. *Am J Clin Oncol* 24, 597-602.

BIBLIOGRAFIA

- 1) Allegra C.J., Paik S., Colangelo L.H., Parr A.L. 2003. Prognostic value of thymidylate synthase, Ki-67, and p53 in patients with Dukes' B and C colon cancer: A National Cancer Institute – National Surgical Adjuvant Breast and Bowel Project Collaborative Study. *J Clin Oncol* 21, 241-250.
- 2) Aschele C., Debernardis D., Tunesi G., et al. 2000. Thymidylase synthase protein expression in primary colorectal cancer compared with the corresponding distant metastases and relationship with the clinical response to 5-fluorouracil. *Clin Cancer Res* 6, 4797-4802.
- 3) Edler D., Glimelius B., Hallström M., Jacobsen A., et al. 2002. Thymidylate synthase expression in colorectal cancer: a prognostic and predictive marker of benefit from adjuvant Fluorouracil-based chemotherapy. *J Clin Oncol* 20, 1721-1728.
- 4) Etienne M-C., Chazal M., Laurent-Puig P., Magne N., et al. 2002. Prognostic value of tumoral thymidylate synthase and p53 in metastatic colorectal cancer patients receiving Fluorouracil-based chemotherapy: phenotypic and genotypic analyses. *J Clin Oncol* 20, 2832-2843.
- 5) Gonen M., Hummer A., Zervoudakis A., et al. 2003. Thymidylate synthase expression in hepatic tumors is a predictor of survival and progression in patients with resectable metastatic colorectal cancer. *J Clin Oncol* 21, 406-412.
- 6) Johnston PG., Benson AB. III, Catalano P., et al. 2003. Thymidylate synthase protein expression in primary colorectal cancer: lack of correlation with outcome and response to fluorouracil in metastatic disease sites. *J Clin Oncol* 21, 815-819.