

Tümidiini fosforülaasi ekspressiooni analüüsi rakendamine metastaatilise neeruvähiga patsientide kasvajakoes

Peeter Padrik¹, Helgi Saar², Krista Leppik¹ – ¹TÜ Kliinikumi hematoloogia-onkoloogia kliinik, ²patoloogiateenistus

neerurakk-kartsinoom, tümidiini fosforülaas, kapetsitabiin, interferoon alfa

Tümidiini fosforülaas on ensüüm, mis muundab kapetsitabiini inaktiivsed metaboliidid aktiivseks ravimiks 5-fluorouratsiiliks. Kuna tümidiini fosforülaasi kontsentratsioonid kasvajakoes on suured, aktiveerub kapetsitabiin eelistatult kasvajakolletes. Käesoleva uuringu eesmärgiks oli hinnata seost tümidiini fosforülaasi ekspressioonitaseme ja raviefekti vahel patsientidel, kellel oli diagnoositud neerurakk-kartsinoom ning kes said kombinatsioonravi kapetsitabiini ja interferoon alfaga. Tümidiini fosforülaasi ekspressioon määrati immuunhistokeemilise analüüsi, kasutades monoklonaalseid tümidiini fosforülaasi vastaseid antikehi.

Metastaseerunud neerurakk-kartsinoomiga patsientide prognoos on halb, sest tegemist on kasvajaga, mis on resistentne enamiku tsütostaatiliste ainete suhtes (1–3). Kõige lubavam süsteemne ravi on immuunravi, enamik patsiente ravitakse väljaspool kliinilisi uuringuid alfainterferooni või interleukiin-2 monoterapia või kombinatsioonidega (4, 5).

Meie korraldatud II faasi kliiniline uuring hindas kapetsitabiini ja interferoon alfa-2A kombinatsioonravi efektiivsust ning toksilisust 25-l kaugelearenenud neeruvähiga patsiendil (6). Üldine ravivastus uuringus oli 24,0% (95% CI, 9,4–45,1%), 6-st ravivastusega patsiendist 5-l oli see osaline ja 1-l täielik. Haiguse stabiliseerumine esines 9-l patsiendil (36,0%, 95% CI 18,0–57,5%). Elulemuse mediaan oli 248 päeva (95% CI, 173 kuni 265 päeva) ja keskmine aeg haiguse progressioonini 126 päeva (95% CI, 49 kuni 165 päeva).

Kapetsitabiin ja tema metaboliidid 5'-deoksü-5-fluorotsütidin ja 5'-deoksü-5-fluorouridiin ei ole tsütotoksilised. Tsütotoksiliseks vormiks on 5-fluorouratsiil, mis tekib metaboliitidest tänu tümidiini fosforülaasile. Tümidiini fosforülaasi kontsentratsiooni hindamine kasvajakoes võib olla kapetsitabiinravi efektiivsuse näitaja. Imazano jt, Mizutani jt ning Morita jt uuringud on näidanud,

et tümidiini fosforülaasi ensümaatiline aktiivsus on suurem neerurakk-kartsinoomi koes kui normaalses neerukoes (7–9). Morita jt *in vitro* uuring on näidanud, et tümidiini fosforülaasil on vahendav roll neerurakk-kartsinoomi tundlikkuses kapetsitabiinravi suhtes (10).

Käesoleval uuringul oli kaks **eesmärki**. Esiimeseks eesmärgiks oli hinnata immuunhistokeemilise meetodi sobivust igapäevaseks diagnostikameetodiks tümidiini fosforülaasi ekspressiooni määramisel parafiini sisestatud neerurakk-kartsinoomis. Teiseks eesmärgiks oli uurida võimalikku seost tümidiini fosforülaasi ekspressioonitaseme ja kapetsitabiini ning interferoon alfa-2A kombinatsioonravi efektiivsuse vahel.

Uuringumaterjal ja -meetodid

II faasi kliinilise uuringu patsientide kaasamiskriteeriumid olid järgmised: vanus 18–75 eluaastat, teadev nõusolek, histoloogiliselt kinnitatud lokaalselt kaugelearenenud või metastaatiline neeruvähk, eelnev puuduv süsteemne ravi või mõõdetava haiguskolde kiiritusravi, üldstaatus 0–2 ECOG (*Eastern Cooperative Oncology Group*) skaala järgi, adekvaatsed hematoloogilised, neeru- ja maksaanalüüsid (neutrofiidid $\geq 2,0 \times 10^9/l$,

Tabel 1. Tümidüini fosforülaasi poolkvantitatiivse analüüsi skoorisüsteem

Tümidüini fosforülaasi värvumus kasvajarakkudes	Skoor
Värvumust kasvajarakkudes ei esine	0
Värvumus esineb 0–10%-l kasvajarakkudest	1+
Värvumus esineb 10–25%-l kasvajarakkudest	2+
Värvumus esineb 25–50%-l kasvajarakkudest	3+
Värvumus esineb 50–100%-l kasvajarakkudest	4+

Tümidüini fosforülaasi värvumuse intensiivsus kasvajarakkudes	Skoor
Värvumust kasvajarakkudes ei esine	0
Nõrk värvumuse intensiivsus	1+
Tugev värvumuse intensiivsus	2+
Väga tugev värvumuse intensiivsus	3+

trombotsüüdid $\geq 100 \times 10^9/l$, hemoglobiin ≥ 10 g/dl, bilirubiin ≤ 1 ülemise normipiiri, ASAT ja ALAT $\leq 2,5$ ülemise normipiiri, alkaalne fosfataas ≤ 5 ülemise normipiiri, kreatiniin ≤ 175 $\mu\text{mol/l}$). Uuringusse ei võetud järgmiste kriteeriumidega isikuid: kesknärvisüsteemi metastaaside olemasolu, kaasnev rasedus või laktatsiooniperiood, soovimatus kasutada kontratseptiivseid vahendeid fertiilse ea korral, eelnev või kaasnev maligne kasvaja, välja arvatud ravitud basaliom või *in situ* emakakaela kartsinoom, kaasnev kardialne puudulikkus või tõsine kardialne patoloogia, kaasnev infektsioonhaigus. Uuringu oli heaks kiitnud inimuuringute eetikakomitee. Kõik patsiendid andsid enne uuringusse kaasamist teadva nõusoleku ja täiendava teadva nõusoleku kasvajakoe analüüsiks.

Ühe ravikuuri pikkus oli kolm nädalat, kapetsitabiini (Xeloda; Hoffmann-La Roche Ltd., Basel, Šveits) manustati suu kaudu 1250 mg/m^2 kaks korda päevas 14 päeva, millele järgnes 7päevane paus, interferoon alfa-2A (Roferon A; Hoffmann-La Roche Ltd., Basel, Šveits) manustati nahaalusi 6 miljonit ühikut kolm korda nädalas. Ravi kestus oli 12 kuuri või kuni haiguse progressiooni, mitteaktsepteeritava toksilisuse tekkeni või kuni patsient soovis ravi katkestada. Enne ravi tehti füüsikaline uuring, täielik kliiniline vereanalüüs, biokeemia analüüsid, EKG ja kasvaja levikuulatuse hindamine. Patsiente jälgiti enne iga 3nädalase ravikuuri alustamist füüsikalise läbivaatuse, kliiniliste ja biokeemiliste vereanalüüside abil. Kasvajad hinnati iga 6 nädala järel kompuutertomograafia, rindkere röntgenuuringu või füüsikalise uuringu abil

kuni haiguse progressiooni. Kasvaja ravivastus klassifitseeriti soliidtuumorite ravivastuse hindamise kriteeriumite RECIST (*Response Evaluation Criteria in Solid Tumours*) alusel.

Tümidüini fosforülaasi ekspressiooni kasvajakoes hinnati parafiini sisestatud kasvajakoe immuunhistokeemilise analüüsi abil, kasutades monoklonaalseid tümidüini fosforülaasi vastaseid antikehi (Roche Diagnostics GmbH). Kasutati poolkvantitatiivset skoorisüsteemi rakkude värvumuse osakaalu ja intensiivsuse alusel (vt tabel 1). Lõplik skoor arvutati värvumuse osakaalu protsendi ja värvumuse intensiivsuse summana 0-st kuni 7-ni. Võrdluseks jagati patsiendid tümidüini fosforülaasi ekspressiooni järgi kahte rühma: skoor 0 kuni 3 ja skoor 4 kuni 7.

Tulemused

II faasi kliinilise uuringusse kaasati ajavahemikul oktoobrist 2001 kuni veebruarini 2003 kokku 25 patsienti metastaatilise neeruvähiga, neist 16 andsid täiendava teadva nõusoleku tümidüini fosforülaasi ekspressiooni analüüsiks. Nende patsientide keskmine vanus oli 56 aastat (41 kuni 67 aastat), 12 olid mehed ja 4 naised. Keskmine ravitsükli arv oli 4,75 (2 kuni 12). Üldine ravivastus oli selles haigete rühmas 31% (ravivastus 5 haigel 16-st), kõik ravivastused olid osalised. Stabiilne seisund vähemalt 6 nädalat esines täiendavalt 33%-l patsientidest.

Tümidüini fosforülaasi ekspressioon oli leitav kõikide patsientide kasvajakoes, enamikul oli see oluline: kahel patsiendil skoor 2+, kahel 3+, kolmel 4+, kolmel 5+ ja kuuel 6+.

Tabel 2. Tümidiiini fosforülaasi poolkvantitatiivsed skoorid ja nende seos ravivastusega

Skoor	Patsientide arv	Ravivastus					
		Osaline ravivastus		Stabiilne seisund		Haiguse progressioon	
		arv	%	arv	%	arv	%
0 kuni 3+	4	2	50	–	0	2	50
4+ kuni 7+	12	3	25	4	33,3	5	41,7
Kõik kokku	16	5	31,3	4	25	7	43,7

Poolkvantitatiivsete skooride rühmad ja nende suhe raviefekti on esitatud tabelis 2. Nii ravivastused kui ka haiguse progressioon esinesid nii madala kui ka kõrge tümidiiini fosforülaasi ekspresioonitaseme korral.

Arutelu

Töö eesmärgiks oli hinnata võimalikku seost tümidiiini fosforülaasi ekspresioonitaseme ja kapetsitabiini ning interferoon alfa-2A kombinatsioonravi efektiivsuse vahel. Tümidiiini fosforülaasi ekspresiooni määrati parafiini sisestatud kasvajakoes poolkvantitatiivse immuunhistokeemilise analüüsiga, kasutades monoklonaalseid tümidiiini fosforülaasi vastaseid antikehi.

Metastaatilise neeruvähiga patsientide prognoos on halb, see kasvajatüüp on keemiaravi suhtes enamasti resistentne (1–3). Praegu kliinilises praktikas olev valikravi metastaatilise neeruvähi korral on immuunravi alfainterferooni või interleukiin-2 monoteeraapia või kombinatsioonide näol, paremate ravitulemuste saamiseks on aga vajalik uute ravimite ja ravikombinatsioonide uurimine.

Kapetsitabiin on fluoropürimidiini eelühend, mis aktiveeritakse konversioonina 5-fluorouratsiiliks tümidiiini fosforülaasi toimel. Kuna tümidiiini fosforülaasi kontsentratsioonid kasvajakoes on suuremad, aktiveerub kapetsitabiin eelistatult kasvajakolletes.

Mitmed uuringud on näidanud, et tümidiiini fosforülaasi ensümaatiline aktiivsus on suurem neerurakk-kartsinoomi koes kui normaalses neerukoos (7–9). Morita jt *in vitro* uuring näitas, et tümidiiini fosforülaas moduleerib neerurakk-kartsinoomi

noomi sensittiivsust kapetsitabiini suhtes (10). Need andmed viitavad sellele, et tümidiiini fosforülaasi ekspresiooni määramine metastaatilise neerurakk-kartsinoomi korral võiks hõlbustada nende patsientide kindlakstegemist, kes alluvad paremini alfainterferooni ja kapetsitabiini kombinatsioonravile.

Käesolevas uuringus määrati tümidiiini fosforülaasi ekspresioon parafiini sisestatud neerurakk-kartsinoomi koes immuunhistokeemiliselt, kasutades tümidiiini fosforülaasi vastaseid antikehi. Rakendati poolkvantitatiivset analüüsisüsteemi rakkude värvumuse osakaalu ja värvumuse intensiivsuse skooridega. Tümidiiini fosforülaasi ekspresioon oli leitav enamiku patsientide kasvajakoes. Ravivastused esinesid nii madala kui ka kõrge tümidiiini fosforülaasi ekspresiooni korral. Uuringusse kaasatud patsientide rühma põhjal ei esinenud otsest seost tümidiiini fosforülaasi ekspresioonitaseme ning kapetsitabiini ja interferoon alfa-2A ravivastuse vahel. Osaline ravivastus madala tümidiiini fosforülaasi taseme korral võib samas olla tingitud interferoon alfa-2A iseseisvast efektist.

Kokkuvõte

Uuringu kokkuvõtteks võib öelda, et tümidiiini fosforülaasi ekspresioonitaseme immuunhistokeemiline hindamine on igapäevases kliinilises praktikas rakendatav diagnostikameetod. Oluline tümidiiini fosforülaasi ekspresioon esineb enamikul neerurakk-kartsinoomi juhtudel. Tümidiiini fosforülaasi prognostilise ja prediktivse rolli määramiseks neerurakk-kartsinoomi korral on vajalik edasine suurema mahuga uuring.

Kirjandus

1. Hartmann JT, Bokemeyer C. Chemotherapy for renal cell carcinoma. *Anticancer Res* 1999;19(2C):1541–3.
2. Moizer RJ. Renal cell carcinoma: progress against an elusive tumor. *Semin Oncol* 2000;27(2):113–4.
3. Amato RJ. Chemotherapy for renal cell carcinoma. *Semin Oncol* 2000;27(2):177–86.
4. Bukowski RM. Cytokine therapy for metastatic renal cell carcinoma. *Semin Urol Oncol* 2001;19(2):148–54.
5. Heinzer H, Huland E, Huland H. Systemic chemotherapy and chemoimmunotherapy for metastatic renal cell cancer. *World J Urol* 2001;19(2):111–9.
6. Padrik P, Leppik K, Arak A. Combination therapy with capecitabine and interferon alfa-2A in patients with advanced renal cell carcinoma: a phase II study. *Urol Oncol* 2004;22(5):387–92.
7. Imazano Y, Takebayashi Y, Nishiyama K, Akiba S, Miyadera K, Yamada Y, et al. Correlation between thymidine phosphorylase expression and prognosis in human renal cell carcinoma. *J Clin Oncol* 1997;15(7):2570–8.
8. Mizutani Y, Wada H, Yoshida O, Fukushima M, Kawauchi A, Nakao M, et al. The significance of thymidine phosphorylase/platelet-derived endothelial cell growth factor activity in renal cell carcinoma. *Cancer* 2003;98(4):730–6.
9. Morita T, Matsuzaki A, Tokue A. Quantitative analysis of thymidine phosphorylase and dihydropyrimidine dehydrogenase in renal cell carcinoma. *Oncology* 2003;65(2):125–31.
10. Morita T, Matsuzaki A, Tokue A. Enhancement of sensitivity to capecitabine in human renal carcinoma cells transfected with thymidine phosphorylase cDNA. *Int J Cancer* 2001;92(3):451–6.

Summary

Application of analysis of thymidine phosphorylase expression in metastatic renal carcinoma tissue

Thymidine phosphorylase is the enzyme that metabolizes 5'-deoxy-5-fluorouridine, an intermediate metabolite of capecitabine, to the active drug 5-fluorouracil. Capecitabine is a fluoropyrimidine carbamate capable of exploiting high concentrations of thymidine phosphorylase in the tumour tissue to achieve activation preferentially at the tumour site.

Purpose of the study was to implement analysis of thymidine phosphorylase expression in the renal cell carcinoma tissue using immunohistochemistry assays with the monoclonal anti-thymidine phosphorylase antibody, for evaluating the level of thymidine phosphorylase expression and possible correlation between thymidine expression values and treatment efficacy of a combination of capecitabine and interferon alfa-2a.

Methods. Thymidine phosphorylase expression was evaluated in the tumour tissue of 16 patients. Semi-quantitative analysis using a scoring system for tumour cells was performed, where scores were calculated as the sum of the staining percentage and the staining intensity scores, ranging from 0 to 7. Capecitabine was

administered orally at a dose 1,250 mg/m² twice daily for 14 days followed by 7 days of rest, interferon alfa-2a was administered subcutaneously 6 million units three times weekly.

Results. Overall partial response rate in this group of patients was 31%, stable disease status was additionally achieved in 33% of the patients. Substantial thymidine phosphorylase expression in the tumour tissue was detected in majority of patients, 4 patients had the semi-quantitative score 2 or 3 and in 12 patients it was 4 to 6. No correlation was observed between thymidine phosphorylase expression and response to treatment with capecitabine and interferon alfa-2a in the analysed group of patients.

Conclusion. Evaluation of thymidine phosphorylase in the renal cell carcinoma tissue with immunohistochemistry assays is an applicable method in everyday clinical practice. Further larger study is necessary to define the exact prognostic and predictive value of thymidine phosphorylase in the renal cell carcinoma tissue.

peeter.padrik@kliinikum.ee