

پژوهنده (مجله پژوهشی دانشگاه علوم پزشکی شهید بهشتی)

تاریخ دریافت مقاله: ۱۳۸۴/۳/۱۰

سال ۱۰، شماره ۴، مهر و آبان ۱۳۸۴، صفحات ۲۴۵ تا ۲۴۹

تاریخ پذیرش مقاله: ۱۳۸۴/۸/۱۸

بررسی رابطه بیان مفرط آنزیم تیمیدیلات سنتاز و جهش P53 با پاسخ درمانی در

مبتلایان به سرطان رکتوم پیشرفته تحت شیمی پرتو درمانی نئوآجوانت

دکتر بابک ربی^{۱*}، دکتر پیاژه آزاده^۲، ناصر ولانی^۳، دکتر عبدالله فضلعلیزاده^۴، دکتر منوچهر دوائی^۵

چکیده

سابقه و هدف: پژوهش حاضر با توجه به شیوع سرطان رکتوم و عوارض شناخته شده آن و اهمیت اثر عوامل زیستی بر پاسخ درمانی و وجود گزارش‌هایی مبنی بر نقش بیان مفرط آنزیم تیمیدیلات سنتاز (TS) با پاسخ درمانی در مبتلایان به سرطان رکتوم با گسترش موضعی، در بیمارستان امام حسین تهران در سال‌های ۸۳-۱۳۸۲ انجام شد.

مواد و روش‌ها: این تحقیق به صورت همگروهی بر روی ۹ بیمار با بیان مفرط آنزیم تیمیدیلات سنتاز (مورد) و ۱۱ بیمار با مقادیر طبیعی این آنزیم (شاهد) انجام گرفت. تشخیص سرطان رکتوم بر پایه گزارش آسیب شناسی مسجل شد و کلیه بیماران از نظر مرحله بندی اولیه و نوع درمان مشابه بودند. بیماران به مدت ۶-۵ هفته تحت درمان نئوآجوانت شیمی پرتو درمانی قرار گرفتند و پس از گذشت ۸-۶ هفته از خاتمه درمان عمل جراحی رادیکال صورت گرفت. بیان مفرط آنزیم تیمیدیلات سنتاز و جهش P53 در نمونه برداری اولیه از طریق آزمون IHC به صورت مثبت یا منفی تعیین شد. سپس ارتباط آن با نتایج پاتولوژیک بعد از عمل و وضعیت اسفنکتر آنال دو گروه بررسی شد و با آزمون دقیق فیشر مورد قضاوت آماری قرار گرفت و RR و AR این روابط تعیین شد.

یافته‌ها: تحقیق بر روی ۹ بیمار گروه مورد و ۱۱ بیمار گروه شاهد انجام گرفت. میزان پاسخ درمانی در افراد دارای آنزیم طبیعی TS ۴۴/۴ درصد و افراد دارای بیان مفرط این آنزیم ۹/۱ درصد بود ($p < 0.09$).

نتیجه گیری: به نظر می‌رسد که بیان مفرط آنزیم تیمیدیلات سنتاز با نتیجه مثبت درمان نئوآجوانت در سرطان رکتوم پیشرفته به صورت کاهش مرحله تومور و حفظ اسفنکتر آنال ارتباط دارد. بهتر است ضمن بررسی عامل بیان مفرط آنزیم TS تحقیق روی تعداد نمونه‌های بیشتر و با طراحی دقیق‌تری انجام گیرد.

واژگان کلیدی: آنزیم تیمیدیلات سنتاز، رکتوم، شیمی پرتو درمانی نئوآجوانت

مقدمه

این عوامل مؤثر بر پاسخ به درمان، تعیین دقیق این روابط را مشخص نکرده‌است و عوامل بیولوژیک همچنان مورد بحث هستند (۲). ادامه این وضعیت و عدم پاسخ به درمان موجب نارضایتی همکاران پزشک از نتیجه درمان و وقوع عوارض نامطلوب مثل عدم حفظ اسفنکتر آنال، ضرورت تعبیه کولوستومی برای بیماران مبتلا می‌شود.

آنزیم تیمیدیلات سنتاز از آنزیم‌های اساسی در سنتز DNA است که

یکی از دشواری‌های کار در زمینه جراحی و انکولوژی، پاسخ درمانی شیمی پرتو درمانی نئوآجوانت در سرطان رکتوم با انتشار موضعی است، به نحوی که عدم موفقیت در میزان حفظ اسفنکتر آنال را تا ۷۵ درصد موارد و عدم پاسخ پاتولوژیک به این درمان را تا ۸۰-۷۵ درصد ذکر کرده‌اند (۱). در حال حاضر عوامل پاسخ پاتولوژیک متعدد از قبیل $ki67$ ، $bcl2$ ، جهش P53 و تیمیدیلات سنتاز در تعیین میزان پاسخ مطرح شده‌اند (۲) ولی اطلاعات فعلی در مورد

۱. * نویسنده مسؤل: دستیار رادیوتراپی انکولوژی، بیمارستان امام حسین، دانشگاه علوم پزشکی شهید بهشتی. آدرس برای مکاتبه: تهران - خیابان شهید مدنی - بیمارستان امام حسین،

بخش رادیوتراپی E-mail: brajab2002@yahoo.com

۲. متخصص رادیوتراپی انکولوژی، استادیار دانشگاه علوم پزشکی شهید بهشتی، بیمارستان امام حسین

۳. مشاور آمار، عضو هیأت علمی دانشگاه علوم پزشکی شهید بهشتی

۴. متخصص رادیوتراپی انکولوژی، استادیار دانشگاه علوم پزشکی شهید بهشتی، بیمارستان امام حسین

۵. متخصص جراحی، استاد دانشگاه علوم پزشکی شهید بهشتی، بیمارستان امام حسین

تهران از اسفند ماه ۱۳۸۱ لغایت اردیبهشت ماه ۱۳۸۴ انجام گرفت.

مواد و روش‌ها

تحقیق به روش مطالعه همگروهی آینده‌نگر و بیماران به روش نمونه‌گیری آسان انتخاب شدند. گروه مورد مبتلایان به سرطان رکتوم (LN+)، T₄ و T₃ را شامل می‌شد که آنزیم TS در آنها بیش از حد معمول بیان شده بود (TS مثبت). تشخیص سرطان بر اساس گزارش آسیب شناسی نمونه بیوپسی مسجل می‌شد. وضعیت آنزیم در نمونه با استفاده از روش ایمنوهیستوشیمی (IHC) و با آزمون آویدین - بیوتین و در صورت رنگ‌آمیزی مثبت سیتوپلاسم در بیش از ۱۰ درصد سلول‌ها به عنوان نمونه مثبت از نظر این آنزیم بیان می‌شد.

آزمایش IHC را دو تن از همکاران که اطلاعی از روند درمان بیماران نداشتند، انجام می‌دادند. در تمام نمونه‌ها جهش P₅₃ با روش IHC و نوع درمان (RT+(Δ FU \pm Eloxation) بررسی و ثبت می‌شد. طول مدت درمان ۶-۵ هفته بود. بیماران تحت RT با دوز ۵۰/۴GY در فیله‌های استاندارد لگنی جهت درمان سرطان رکتوم (۴۵GY) قدم و خلف سپس ۵/۴GY دوز یادآور) و همزمان تحت شیمی درمانی مداوم ۲۴ ساعته ۵FU با دوز ۲۲۵mg/m² ظرف ۷ روز هفته یا ۳۰۰mg/m² ظرف ۵ روز هفته با یا بدون الوکساتین هفتگی به صورت بولوس وریدی ۶۰mg/m² قرار می‌گرفتند. ضمناً انتخاب بیماران جهت تجویز الوکساتین کاملاً تصادفی بود. بیماران ۶-۸ هفته پس از پایان درمان به وسیله جراح عمل می‌شدند. جراح و روش درمانی در تمامی موارد یکسان سازی شده است. نتایج درمان بر اساس حفظ اسفنکتر آنال توسط جراح و گزارش پاتولوژیک بعد از عمل جراحی از سوی دو آسیب شناس بیان می‌شد. پاسخ پاتولوژیک به درمان به صورت کاهش T (مرحله تومور) یا تبدیل N+ به N₀ در نمونه پاتولوژی بعد از عمل (بر اساس طبقه‌بندی AJCC) نسبت به T و N تومور در قبل از شیمی - پرتو درمانی نئوآجوانت که به وسیله EUS و معاینه تعیین شده بود، بیان می‌شد (۱۳ و ۹).

بیمارانی که دچار متاستاز غیر قابل جراحی شده بودند، کسانی که حاضر به انجام جراحی نبودند و افرادی که پیگیری درمان را ادامه ندادند از مطالعه کنار گذاشته شدند. نقش TS مثبت با پاسخ پاتولوژیک درمان و حفظ اسفنکتر با آزمون دقیق فیشر مورد قضاوت آماری قرار گرفت. خطر نسبی و خطر اسنادی در مورد TS مثبت با

مورد هدف داروی ۵FU به شمار می‌رود (۳). این آنزیم در برخی تومورها بیش از حد معمول بیان می‌شود و تأثیر داروها را کاهش می‌دهد (۴). P₅₃ ژن سرکوب کننده تومور است و جهش آن P₅₃ که در ۷۰-۶۰ درصد سرطان‌های کولورکتال دیده می‌شود نیز در بررسی‌های متعدد نقش‌های متفاوتی را در تعیین پاسخ درمانی داشته‌است (۵-۸).

امروزه جهت افزایش احتمال حفظ اسفنکتر آنال در بیماران مبتلا به سرطان رکتوم با گسترش موضعی در یک سوم تحتانی آن (LN+)، T₄ و T₃ پس از مرحله‌بندی اولیه ابتدا شیمی پرتو درمانی نئوآجوانت سپس جراحی رادیکال انجام می‌شود (۹). جهت انتخاب بیماران و مرحله‌بندی آنها از سی‌تی‌اسکن شکم و لگن، عکس سینه، آزمایش‌های شیمیایی، آزمایش‌های عملکرد کلیوی و کبدی و EUS با دقت ۷۰ تا ۹۰ درصد استفاده می‌شود (۲) از آنجا که انتخاب بیماران صرفاً با این آزمایش‌ها میسر نیست، می‌توان از شاخص‌های بیولوژیک نیز بهره جست (۲). درمان نئوآجوانت با شیمی پرتو درمانی همزمان (RT+(Δ FU \pm Eloxatin) انجام می‌شود که در دو تحقیق استفاده از داروی الوکساتین با میزان پاسخ درمانی بالایی همراه بوده است (۱۰ و ۱۱).

تاکنون در دو مطالعه گزارش شده است که بیان مفرط آنزیم تیمیدیلات سنتاز (TS+) به عنوان عامل پیش‌بینی کننده پاسخ به درمان نئوآجوانت مؤثر است (۱۲ و ۱۳). در سال ۲۰۰۰ اوکونکو و همکاران در ایالات متحده این رابطه را مورد بررسی قرار دادند (۱۳). در این تحقیق محدودیت‌های روش شناختی از جمله توأم بودن عوامل بیولوژیک مستقل با بیان مفرط TS و عدم بررسی وضعیت اسفنکتر وجود داشت. خصوصیات فردی بیمار، عوامل محیطی و پروتکل درمانی می‌تواند روی پاسخ به درمان مؤثر باشد. در دو تحقیق دیگر که یاکوب و همکاران انجام داده‌اند، نشان داده شده‌است که بیان مفرط آنزیم TS باعث عدم پاسخ به درمان نئوآجوانت شیمی پرتو درمانی می‌شود (۱۴ و ۱۵). مشخص کردن میزان پاسخ پاتولوژیک و حفظ اسفنکتر آنال در بیماران با TS منفی و مثبت می‌تواند این شاخص بیولوژیک را به عنوان عامل پیش‌بینی کننده معرفی کند و به انتخاب بیماران جهت درمان با نئوآجوانت در کنار سایر عوامل پیش‌بینی کننده کمک کند. بنابراین این تحقیق در مبتلایان به سرطان رکتوم ثلث تحتانی با گسترش موضعی تحت شیمی - پرتو درمانی نئوآجوانت همزمان (RT+(Δ FU \pm Elevatin) مراجعه کننده به بیمارستان امام حسین

قابل قضاوت نبود. همین آزمون نشان داد که TS متغیری مستقل از نوع ترکیب شیمی درمانی در تعیین میزان حفظ اسفنکتر است ($p < 0.04$).

بحث

این تحقیق نشان داد که TS مثبت با نتایج درمان (عدم پاسخ پاتولوژیک و عدم حفظ اسفنکتر) رابطه دارد. نتایج تحقیق حاضر با برخی از پژوهش‌های منتشر شده همخوانی دارد. مثلاً بر اساس تحقیق اوکونکو و همکاران در سال ۲۰۰۰ که بر روی ۲۵ بیمار دچار سرطان رکتوم با گسترش موضعی تحت شیمی - پرتو درمانی نئوآجوانت انجام گرفت نشان داده شد که در صورت مثبت بودن TS ۱۳ درصد بیماران پاسخ مناسب به درمان و در حالت TS منفی ۶۵ درصد پاسخ مناسب به درمان دارند (۱۳). در ۲۰۰۳ ساو و همکاران در استرالیا با تحقیق بر روی ۳۵ بیمار و استفاده از یک نوع دارو مشخص کردند که در ۳۲ درصد افراد در صورت TS مثبت بودن پاسخ مثبت پاتولوژیک به درمان نئوآجوانت و در صورت منفی بودن این شاخص بیولوژیک ۷۰ درصد پاسخ مثبت وجود دارد ($p < 0.048$). این تحقیق دارای کیفیت نمونه بوده و آزمون آماری انجام شده است ولی در پروتکل درمانی به جای شکل انفوزیون مداوم ۵FU از نوع بولوس آن استفاده شده است (۱۲). نتایج تحقیق حاضر از جهت پاسخ پاتولوژیک مشابه تحقیق ساو بود.

در تحقیق دیگری در ۲۰۰۴ مشخص شد که در افراد با بیان مفرط آنزیم تیمیدیلات سنتاز پاسخ پاتولوژیک مثبت به درمان نئوآجوانت بیشتر از عدم پاسخ است ($p < 0.02$). در این تحقیق بررسی TS سلول‌های تومور به وسیله PCR-RT انجام شده است (۱۵). همچنین رابطه بیان مفرط آنزیم تیمیدیلات سنتاز با عدم پاسخ به درمان نئوآجوانت در مقاله دیگری مورد تأیید قرار گرفته است ($p < 0.04$). در این تحقیق از روش رنگ آمیزی IHC با در نظر گرفتن درصد سلول‌های رنگ گرفته و شدت رنگ گرفتن سلول‌ها استفاده شده است (۱۴). نتایج حاصل از تحقیق حاضر مشابه موارد فوق بود اما روش بررسی وضعیت TS در سلول‌های تومور با روش مورد استفاده ما فرق می‌کرد.

از محدودیت‌های این تحقیق می‌توان به کم بودن تعداد نمونه اشاره کرد که طبعاً بر نتیجه کار اثر می‌گذارد. پروتکل درمانی بیماران متفاوت بود و P۵۳ هم در گروه‌های شیمی درمانی مختلف همسان سازی نشده بود، گرچه هنوز در مورد نقش P۵۳ محل بحث وجود

نتایج درمان محاسبه شد. چون پروتکل درمانی یک و دو دارویی (با و بدون الوکسائین) و P۵۳ مشابه‌سازی نشده بودند، با استفاده از آزمون آماری متل هانزل قضاوت شد که در مورد TS مثبت یا P۵۳ مثبت مرتبط با پروتکل درمانی یک یا دو دارویی کدام یک نقش برتر تعیین کننده را با نتیجه درمان داشته‌اند.

یافته‌ها

کلاً ۲۶ بیمار وارد مطالعه شدند که تعداد افراد TS مثبت ۱۴ نفر و تعداد افراد TS منفی ۱۲ نفر بودند. دو نفر به علت عدم پیگیری درمان از مطالعه حذف شدند که هر دو TS مثبت بودند. یک بیمار TS مثبت نیز حاضر به عمل جراحی نشد و یک نفر نیز دچار متاستاز کبدی غیر قابل جراحی شد که این بیمار نیز TS مثبت بود ولی عمل جراحی انجام نگرفت.

دو بیمار نیز TS مثبت بودند که به علت عدم پاسخ به درمان به دلیل غیر قابل جراحی بودن و نامشخص بودن وضعیت اسفنکتر از مطالعه حذف شدند. به این ترتیب تحقیق روی ۱۱ شاهد (TS منفی) و ۹ نمونه گروه مورد (TS مثبت) انجام گرفت. در ۱۵ بیمار (۷۵٪) از نظر پاسخ دهی مثبت گزارش شد و ۵ مورد (۲۵٪) منفی بود. پاسخ پاتولوژیک بیماران TS منفی ۹/۱ درصد بود. در بیماران TS مثبت ۴/۴ درصد پاسخ پاتولوژی منفی وجود داشت که با استفاده از آزمون دقیق فیشر نشان داده شد که عامل بیولوژیک TS در تعیین پاسخ به درمان نقش دارد ($p < 0.09$).

گروه P۵۳ منفی ۱۴/۳ درصد پاسخ منفی و گروه P۵۳ مثبت ۳۰/۷ درصد پاسخ منفی داشته‌اند که از نظر آماری با توجه به اثر مخدوش کننده نوع رژیم شیمی درمانی قابل قضاوت آماری نبود ($p < 0.07$) اما همین آزمون در مورد TS انجام شد و با توجه به $p < 0.03$ عامل TS نقش مستقلی داشت.

از نظر میزان حفظ اسفنکتر آنال نیز اسفنکتر ۱۳ بیمار حفظ شد (۶۵٪) و در ۷ بیمار (۳۵٪) عمل APR انجام گرفت. در بیمارانی که TS منفی بودند ۱۸/۲ درصد و در افراد TS مثبت ۵۵/۶ درصد عدم حفظ اسفنکتر مشاهده شد که با استفاده از آزمون دقیق فیشر این اختلاف از نظر آماری معنی‌دار بود ($p < 0.09$) و $RR = 3/1$.

از نظر رابطه P۵۳ و حفظ اسفنکتر نیز با توجه به میزان $p < 0.09$ در آزمون آماری متل هانزل مشخص شد که نتیجه P۵۳ نمی‌تواند مستقل از نوع شیمی درمانی به کار رفته عمل کند، از لحاظ آماری

نئوآجوانت مؤثر است. متأسفانه تاکنون عامل مؤثر در پاسخ درمانی به تنهایی مشخص نشده است (۹) و کماکان عوامل بیولوژیک مثل P53، bcl2 و نظایر اینها مورد بحث هستند. اما با توجه به محدودیت این تحقیق و به ویژه کم بودن تعداد نمونه قادر به تعیین نقش دقیق TS مثبت با نتیجه درمان نخواهیم بود. بنابراین پیشنهاد می‌شود که تحقیق دیگری با طراحی دقیق‌تر و به صورت مطالعه همگروهی با رعایت یکسان سازی متغیرها و بررسی عوامل بیولوژیک دیگر تحت پروتکل درمانی واحدی انجام گیرد تا نقش TS در پاسخ درمانی مشخص‌تر شود. بدیهی است اگر این تحقیق در چند مرکز مختلف انجام می‌گرفت، نتایج چشمگیری به دست می‌آمد.

دارد. به علاوه، در این تحقیق با آزمون متل هانزل نشان دادیم که در نبود جهش P53، TS به تنهایی می‌تواند مؤثر باشد. در مورد نوع درمان نیز پروتکل درمانی واحدی نداشتیم اما با آزمون متل هانزل نشان دادیم که پروتکل‌های شیمی درمانی تک و دو دارویی روی رابطه TS با پاسخ پاتولوژیک و حفظ اسفنکتر بی تأثیر بوده است. اگر یک مورد متاستیک که TS مثبت بود و دو موردی که با وضعیت TS مثبت قابل عمل نبودند و پاسخ مناسب به درمان ندادند و یک مورد TS مثبتی که حاضر به عمل جراحی نشد و دو مورد دیگری که پیگیری و درمان را ادامه ندادند (TS+) را وارد مطالعه می‌کردیم، میزان پاسخ درمانی در گروه TS مثبت به مراتب عدد کمتری به دست می‌آمد. به نظر می‌رسد که TS روی نتایج درمان مبتلایان به سرطان رکتوم با گسترش موضعی تحت درمان شیمی - پرتو درمانی

REFERENCES

1. UP TO Date. Neoadjuvant chemoradiotherapy for rectal cancer. Rectal cancer (serial online) 2004 sep. cited 2005 June]. Available from: URL: <http://www.Utdol.com/app:ocation/topic/marketing>.
2. John M. Skibber, Paulo M. Hoff, Bruce D. Minsky. Cancer of Rectum, In: Vircent T. Devita, Samuel Itllmav, Steven A. Rosonbery. Cancer, principles of practice of oncology. 6th ed. Philadelphia: Lippincott Williams and Wikins press; 2001. p: 1295-6.
3. Sunil sharma, Leonard B. Saltz, David M. Ota. Colon cancer: mangment of Locoregional disease. In: David P: kelse, John M. Daly, Scott E. Kern, Bernard levin, Joel E. Tepper. Gastriontestinal Oncology, Principles of practice. 1st ed. Philadelphia: Lippincott Williams and Wilkins press ; 2002. p: 775-6.
4. Van triest B, pinedo HM, vanltensbergen Y, Smid K, Telleman F, Schoemakers PS, et al. Thymidylate Synthase level as the main predictive parameter for sensivity to 5- fluorouracil, but not for folate – based thymidylate synthase inhibitors, in 13 nonselected colon cancer cell lines. clinical cancer Res. 1999 Mar ; 5(3): 643-54.
5. Spitz FR, Giacco GG, HessK, Larryl., Rich TA, JanJan N, et al. P53 immunohistochemical Staining predicts residual disease after chemoradiation in patients with high-risk reetal cancer. Clinical cancer Res. 1997 Oct; 3 (10): 1685-90.
6. Elsaleh H, Robbins P, Joseph D, Powell B, Grieu F, Meanso L, et al. can p53 alterations be used to predict tumour response to preoperative chemoradiotherapy in locally advanced rectal cancer. Radiather Oncol . 2000 Aug; 56(2): 239-44.
7. Jeffery W. Clark , Christopher G. Willett. Chemotherapy and radiation therapy of colorectal cancer. In: Anil K Rustgi, James M crawford Gastrointestinal Cancer. 1 st ed philadelphia: Saunders Press; 2003. p: 464-7.
8. Berglund A, Edler D, Molin D, Nordlinder H, Graf W, Glimelius B. Thymidylate Synthase of P53 Expression in Primery tumor does not predict Chemotherapy outcome in metastatic colorectal carcinoma. Anticancer Res. 2002 Nov-Desc; 22(6B): 365-9.
9. Robert J, Myerson. Colon of Rectum. In: Carlos A. Perez, Luther W. Brady, Edward C. Halperin, Rupert K. Schmidt – Ullrich. Principles and Practice of Radiation Oncology. 4th ed. Philadelphia; Lippincott William and Wilkins Pres; 2004. P: 1624-5.
10. Gerard JP, Chapet O, Nemoz C, Romestaing P, Mornex F, Coquai R, et al. preoperative concurrent chemoradiotherapy in locally advanced rectal cancer with high-dose radiation and oxaliplatin-cotaining regimen; the lyon Ro-04 Phase II tr. J Clin Oncol. 2003 Mar 15; 21(6): 1119-24.
11. Loi S, Ngan SY, Hicks RJ, Mukesh B, Mitchell P, Michael M, et al. Oxaliplatin Combined with infusional 5 fluorouracil and concomitent radiotherapy in inoperable and merastatic rectal cancer: a phase I trial. Br J Cancer. 2005 Feb 28; 92 (4): 655-61.

12. Saw RP, Morgam M, Koorey D, Painter D, Findlay M, Stevens G, et al. P53 deleted in colorectal cancer gene , and thymidylate synthase as predictors of histopathologic response and survival in low, locally advanced rectal cancer treated with preoperative adjuvant therapy. *Dis colon Rectum*, 2003 Feb; 46(2): 192-202.
13. Okonkwo A, Musunuri S, Talamonti M, Benson A , Small W Jr, Stryker SJ, et al. Molecular markers and prediction of response to chemoradiation in rectal cancer. *Oncol Rep*. 2001 May-Jun; 8(3): 497-500.
14. Jakob C, Liersch T, Meyer W, Baretton GB, Itausler P, Schwabe W, et al. Immunohistochemical analysis of thymidylate synthase, thymidine phosphorylase, and dihydropyrimidine dehydrogenase in rectal cancer (cUICC II/III) : correlation with histopathologic tumor regression after 5-fluorouracil- based long-term neoadjuvant chemoradiotherapy. *Am J Surg Pathol*. 2005 Oct; 29 (10): 1304-9.
15. Jakob c, Aust DE, Meyer W, Baretton GB, Schwabe W, Hausler P, et al. Thymidylate synthase, thymidine phosphorylase, dihydropyrimidine dehydrogenase expression, and histological tumour regression after 5 FU- based neo-adjuvant chemoradiotheapy in rectal cancer. *J pathol*. 2004 Dec; 204(5): 562-8.