

# Az 5-fluorouracil (5-FU) hatékonyságának fokozása

## Az 5-FU és 5-etil-2'-dezoxiuridin (EUdR) kombináció hatásában szerepet játszó molekuláris tényezők

Katona Csilla,<sup>1</sup> Timár Ferenc,<sup>2</sup> Oláh Júlia,<sup>2</sup> Bocsi József,<sup>2</sup> Budai Barna,<sup>3</sup>  
Ötvös László,<sup>4</sup> Kralovánszky Judit<sup>3</sup>

<sup>1</sup>Uzsoki utcai Kórház Onkoradiológia, <sup>2</sup>Semmelweis Egyetem I. Patológiai és Kísérletes Rákkutató Intézet,  
<sup>3</sup>Országos Onkológiai Intézet, <sup>4</sup>MTA Központi Kémiai Kutatóintézet, Budapest

Az 5-fluorouracil (5-FU) metabolizmusának farmakológiai módosításával lehetőség nyílik a gyógyszer klinikai hatékonyságának fokozására. Célkitűzés: A jelen vizsgálatok célja tanulmányozni az 5-etil-2'-dezoxiuridin (EUdR), egy potens 5-FU-modulátor hatását az 5-FU által befolyásolt molekuláris mechanizmusokra, és ezáltal újabb adatokat szerezni a gyógyszer-kombináció hatásmechanizmusára vonatkozóan. Anyagok és módszerek: A vizsgálatokat SW620 human colontumor-sejtvonalon végeztük. A citotoxicitást MTT-teszt, a sejtkinetikai változásokat FACStar flow citométer, az apoptózist a sejtuszuspenzió acridinorange- és ethidium-bromid-festése után fluoreszcens mikroszkóp segítségével, a DNS-fragmentációt RNázal és proteináz K-val történő emésztés után agarózgél-elektroforézissel és ethidium-bromid-festés utáni denzitometrállással, a timidinbeépülést <sup>3</sup>H-timidinnel, a p53 és PCNA fehérje expresszióját Western blot segítségével határoztuk meg. Eredmények: Az 5-FU citotoxikus hatását az EUdR dózisfüggően potenciozta, 100 µM-os EUdR az 5-FU IC50 értékét 40%-kal csökkentette. EUdR + 5-FU kombinált kezelés esetén a legkifejezettebb sejtek megnövekedett százalékos aránya a G2/M átmenetben. Az EUdR fokozta a timidin beépülését a DNS-be. A kombinált kezelés az apoptózis kialakulását szignifikánsan fokozta. Az EUdR a p53 fehérje 5-FU által okozott expressziófokozódását tovább növelte. Következtetés: A vizsgálat eredménye egy új lehetőséget jelent az 5-FU hatékonyságának fokozására. Az EUdR hatására az 5-FU által okozott TS-gátlás fokozódik, melynek következménye nem elsősorban a proliferáció gátlása, hanem a p53-expresszió és az apoptózis indukciója. *Magyar Onkológia* 48:243–251, 2004

Pharmacologic modulation of 5-fluorouracil (5-FU) metabolism provides a possibility for the enhancement of its clinical efficacy. Aim: The purpose of the present work was to study the effect of 5-ethyl-2'-deoxyuridine (EUdR), a potent 5-FU modulator, on different molecular mechanisms, influenced by 5-FU itself, and to obtain further data about the mode of action of the combination. Materials and methods: SW620 cell line was used for the experiments. Cytotoxicity was studied by MTT test, cell kinetic changes by FACStar flow cytometer, apoptosis by fluorescent microscope after staining the cells with acridine orange and ethidium bromide, DNA fragmentation by PAGE electrophoresis after RNase and proteinase-K digestion, thymidine incorporation with <sup>3</sup>H-thymidine, p53 and PCNA protein expression by Western blotting. Results: The cytotoxicity of 5-FU was potentiated dose dependently by EUdR. One hundred µM concentration of EUdR resulted in a 40% decrease of the IC50 value of 5-FU. Cell cycle arrest in the G2/M transition phase was most pronounced after combined treatment with 5-FU + EUdR. EUdR potentiated the incorporation of <sup>3</sup>H-thymidine into DNA. In addition to the increase of apoptosis rate, the expression of p53 protein, caused by 5-FU was further potentiated by Udr. Conclusion: This study demonstrated a potential novel approach to increase the efficacy of 5-FU by EUdR, which incorporated two complementary molecular actions, the selective modulation of TS inhibition and potentiation of the p53 protein expression, consequently leading to an increase in the apoptotic rate. *Katona C, Timár F, Oláh J, Bocsi J, Budai B, Ötvös L, Kralovánszky J. Potentiation of 5-fluorouracil efficacy. Molecular mechanisms playing a role in the cytotoxic action of 5-fluorouracil and 5-ethyl-2'-deoxyuridine (EUdR) combination. Hungarian Oncology* 48:243–251, 2004

Közlésre érkezett: 2004. augusztus 2.  
Elfogadva: 2004. augusztus 22.

Levelezési cím: Dr. Kralovánszky Judit, Országos Onkológiai Intézet, 1122 Budapest, Ráth György u. 7-9.  
Tel.: 1-224 8787, Fax: 1-224 8620, e-mail: kralo@oncol.hu

A szerzők a közleményt Dr. Jeney András egyetemi tanár 70. születésnapjára ajánlják.

## Bevezetés

A fluoropirimidinek alkalmazása a szolid tumrok kemoterápiájában egyre szélesebb körű, különösen az új orális készítmények (UFT, capecitabine) bevezetése óta. Azok a klinikai eredmények, amelyek szerint az 5-fluorouracil (5-FU) kezelés alkalmazásával egyes esetekben még az előrehaladott stádiumú daganatos megbetegedések (vastagbél-, fejnyci daganatok, emlőrák) is eredményesen kezelhetők, tartós betegségmentes állapot vagy a betegség stabilizációja érhető el, azonnal nyilvánvalóvá teszik azt a kérdést, hogy vajon más esetekben ugyanilyen lokalizációjú daganatok miért nem, vagy csak időlegesen reagálnak az 5-FU-kezelésre, és milyen módszerek, eljárások segítségével lehet a gyógyszeres kezelés hatékonyságát fokozni.

A klasszikus módszerek – dózisintenzitás fokozása (9), új, hatékonyabb adagolási módok (19), kronomodulált adagolás (8), prodrugok segítségével történő célba juttatás (27), tumork egyéni érzékenységének prediktálása farmakogenetikai módszerekkel (1) – mellett az 5-FU különböző farmakobiokémiai modulátorokkal történő kombinálása a hatékonyság fokozásának egy széles körben alkalmazott módszere (28). A daganatellenes gyógyszerek biokémiai modulációja olyan farmakológiai módosítást jelent a gyógyszer metabolizmusában, transzportjában, targethez való kötődésének intenzitásában, amelynek eredményeképpen fokozódik a gyógyszer hatása és/vagy csökkennek a toxikus mellékhatásai, vagyis javul a gyógyszer terápiás indexe. A biokémiai modulátorok önmagukban daganatellenes hatással nem rendelkező vegyületek vagy daganatellenes hatóanyagok olyan dózisaik, amelyeknek nincs tumorgátló hatása.

Az 5-FU intracelluláris metabolizmusa igen komplex, ezért elvileg sok ponton nyílik lehetőség a beavatkozásra. A módosítás legfontosabb célpontjai az 5-FU aktiválásában és hatásmechanizmusában szerepet játszó reakcióutak, melyek közül a következők emelhetők ki:

- TS-gátlással kapcsolatos mechanizmusok, a ternier komplex stabilitásának növelése folátokkal (26);
- Dihidrolát-reduktáz gátlása methotrexattal, következményes foszforibozil-pirofoszfát-szintemelkedés és az 5-FU nukleotidok fokozott képződése és beépülése az RNS-be (24);
- a nukleozid- és timidinsalvage gátlása dipyridamollal (25);
- katabolizmus gátlása (uracil; klór-2,4-dihidroxipiridin, CDHP; 3-ciano-2,6-dihidroxipiridin, CNDP; etiniluracil) (4, 12, 23).

A számos, eddig megismert modulátor ellenére az 5-FU terápiás hatékonysága közel sem tekinthető optimálisnak, ezért az új típusú módosító vegyületek vizsgálata jelentősnek tartható. A közelmúltban jelent meg például Bellibas és mtsai közleménye, akik az orálisan adagolható 5-FU prodrug, a capecitabine hatékonyságát oly módon kívánják fokozni, hogy a vegyülethez hason-

ló úton aktiválódó DPD-inhibitor prodrugot (Ro 09-4889) terveztek, amelynek metabolikus átalakulása pontosan megegyezik a capecitabine-ével, és az intratumorálisan keletkező viniluracil gátolja a capecitabine-ből intratumorálisan keletkező 5-FU lebontását (3).

Régóta ismert, hogy az 5-ös pozícióban szubsztituált pirimidinek a nukleotidmetabolizmust befolyásolják. Az alkil-dezoxiuridineket mint timidinanalógokat szintetizálták, azonban a timidintől abban különböznek, hogy az 5-ös pozíciójú metilcsoportot alkilcsoport helyettesíti. Az MTA Központi Kémiai Kutatóintézetében egy sorozat 5-alkil-2'-dezoxiuridint szintetizáltak, melynek első tagja az 5-etil-2'-dezoxiuridin (EUdR) (22).

Az 5-FU + EUdR kombináció az 5-FU-nál hatékonyabb tumorgátlást eredményezett in vivo humán colorectalis tumor xenograftokon (15) valamint Colon-26, Colon-38 kísérletes tumorokon (16). Az EUdR növelte az 5-FU citotoxikus hatását in vitro COLO-1 és SW620 humán colontumor-sejtvonalakon (14).

Az EUdR a timidinhez hasonló mértékben transzportálódik a sejtbe és inkorporálódik a DNS-be. A kombináció hatásmechanizmusának tisztázására irányuló korábbi vizsgálatok eredményei szerint az EUdR első lépésben foszforilálódik, a monofoszfát-származék gátolja a timidilát-szintáz (TS), és ezáltal fokozza az 5-FU hatékonyságát. Sejtmentes rendszerben a foszforilált származék a DNS-polimeráz-reakciót is gátolja (11). Az EUdR a pirimidin-nukleozidfoszforiláz által gyorsan metabolizálódik 5-etiluracillá (EUra), mely a katabolikus enzim, a dihidropirimidin-dehidrogenáz (DPD) potens inhibitora, melynek gátlása fokozza az aktiváló enzimek számára rendelkezésre álló 5-FU mennyiségét (14).

Jelenlegi vizsgálataink célkitűzése tanulmányozni az EUdR hatását az 5-FU által befolyásolt molekuláris mechanizmusokra, így a sejtgenetikai változásokra, <sup>3</sup>H-timidin-inkorporációra, a p53 és PCNA protein expressziójára, a DNS-fragmentációra és apoptózis kialakulására SW620 humán colontumor-sejtvonalon, és ezáltal újabb adatokat szerezni hatékony gyógyszer-kombináció molekuláris mechanizmusára vonatkozólag.

## Vizsgálati anyagok és módszerek

### *A vizsgált sejtvonal és fenntartása*

Vizsgálatainkat az ATCC-ből származó SW620 (CCL227) humán colontumor-sejtvonalon végeztük, melyet rutinszerűen monolayerként 5% főtális borjúsavót tartalmazó DMEM mediumban, 37°C-on, 5% CO<sub>2</sub>-vel átáramoltatott termosztátban tartottunk fenn.

### *Módszerek*

*Kemoszenzitivitási teszt.* Az exponenciálisan szaporodó sejt kultúrából 96 lyukú mikrotitrációs plate-re helyeztünk lyukanként 5x10<sup>3</sup> sejtet. Ezután történt az EUdR-kezelés 30 percen át, majd az 5-FU hozzáadása következett. (A hatóanyagok

koncentrációját az ábraalírásban tüntettük fel.) 4 óra eltelte után tápfolyadékcserre történt, majd a sejteket további 116 óráig inkubáltuk. A citotoxicitás mértékének meghatározása MTT kolorimetriás teszt (18) segítségével történt. A sejtpusztulás mértékét a kezeletlen kontroll százalékában adtuk meg.

**Sejtciklus-paraméterek meghatározása.** A 24 lyukú plate-en tenyésztett és kezelt mintákból készült sejtszuszpenziót metanollal fixáltuk. RNázal történő emésztés után a DNS-t propidium-jodiddal megfestettük. A fluoreszcencia mérése FACStar flow citométerrel (Becton Dickinson Immunocytometry Systems, San Jose, CA) történt (17). Mintánként 50 000 sejtet vizsgáltunk 200–500 sejt/s sebességgel. A különböző fázisú sejtek arányát a Rabinovitch Multicycle software alkalmazásával értékeltük.

**Timidinbeépülés vizsgálata.** Az exponenciálisan szaporodó sejtenyészetből származó sejtek kezelése 6 lyukú plate-en történt. A kezelési idő letelte után 1  $\mu\text{Ci/ml}$  5-metil- $^3\text{H}$ -timidint adtunk a mintákhoz, és 3 órán át inkubáltuk. A sejtek összegyűjtése és kétszeri mosása után a sejttüledék többszöri hideg, majd forró perklórsavas extrahálása következett, majd mindkét frakcióhoz hozzáadtuk a szcintillációs koktejt. A radioaktivitás mérése Beckmann folyadékszintillációs spektrométeren, a DNS-koncentráció meghatározása spektrofotométerrel 260 nm-en történt. Az eredményeket dpm/OD<sub>260</sub>-ban adtuk meg.

**Apoptózis kimutatása.** A 24 lyukú plate-en tenyésztett sejteket az inkubálási és kezelési idő eltelte után EDTA-val mobilizáltuk, majd a sejtszuszpenziót acridin-orange és ethidium-bromid keverékével megfestettük. A tárgylemezre felvitt sejteket fluoreszcens mikroszkóp segítségével értékeltük, mintánként legalább 500 sejtet leszámolva állapítottuk meg az apoptotikus sejtek arányát.

**DNS-fragmentáció vizsgálata.** A 24 lyukú plate-en tenyésztett és kezelt sejt mintákat RNázal és proteináz K-val történő, 37°C-on 1 órán át tartó emésztésnek vetettük alá. Az emésztés után a 65°C-ra melegített mintákat 1,5%-os agaróz gélen 2–3 órán át futtattuk. Az ethidium-bromidos festés után a gél értékelése Eagle-Eye II denzitométer (Stratagene) segítségével történt (10).

**p53 és PCNA fehérjék kimutatása.** A 24 lyukú plate-en tenyésztett és kezelt sejt mintákból sejtszámolást, lizálást és centrifugálást (11 000 g, 4°C-on 30 perc) követően a felülúszót elválasztottuk az üledéktől. A felülúszóból BioRad DC protein teszttel fehérjemeghatározást végeztünk, majd a mintákat lizispufferrel 10  $\mu\text{g}/\mu\text{l}$  koncentrációra hígítottuk. A mintákból 100  $\mu\text{g}$  fehérjét vittünk fel a 10%-os poliakrilamid géltre, majd 200 V feszültségen 30 percig futtattunk. A blottolást (100 V/250 mA) 1 órán át tartott. A vizsgált proteinek immunológiai kimutatásához Vectastain ABC kitet (monoklonális ellenanyag: egér anti-humán p53, Dako M7001

és PCNA, Dako M0879 → biotinilált anti-egér IgG → peroxid-konjugált biotin-avidin komplex → peroxidáz-DAB reakció) használtunk. A denzitometriás kiértékelés Eagle-Eye II készülékkel, az adatfeldolgozás a Scan Analytics/One-D program segítségével történt. A kapott értékeket integrált OD/10<sup>6</sup> sejt-ben adtuk meg.

**Statisztikai értékelés.** A csoportok közötti szignifikancia számítását ANOVA és Tukey poszt-teszt segítségével Graph Pad Prism számítógépes programmal végeztük.

## Eredmények

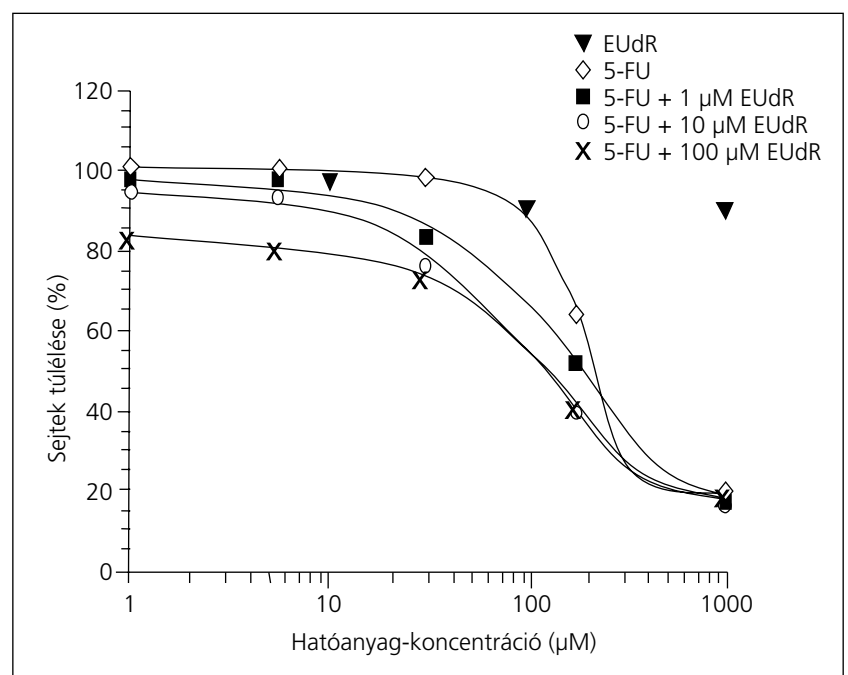
### Az EUdR hatása az 5-FU citotoxicitására

Az EUdR különböző koncentrációinak (1–100  $\mu\text{M}$ ) hatását az 5-FU citotoxicitására az 1. ábra szemlélteti. Az 5-FU citotoxikus hatását az EUdR dózisfüggően potenciózta, a dózis-hatás görbe eltolódott, jelezvén, hogy ugyanolyan mértékű sejtpusztulás kisebb 5-FU-koncentráció hatására jön létre. A modulációs faktor (IC<sub>50</sub> 5-FU/IC<sub>50</sub> EUdR+5-FU) értékei az alkalmazott EUdR-koncentrációk mellett a következők voltak: 1  $\mu\text{M}$  = 1,49; 10  $\mu\text{M}$  = 2,27; 100  $\mu\text{M}$  = 2,50. Vagyis a 100  $\mu\text{M}$ -os EUdR-koncentráció mellett az 5-FU IC<sub>50</sub> értéke 40%-kal csökkent, ami 2,5x-es hatásfokozódást jelent.

### Sejtkinetikai paraméterek változása 5-FU, EUdR és kombinációjuk hatására

Az 5-FU a sejtciklus S fázisában fejt ki hatását. Vizsgáltuk, hogy az 5-FU, az EUdR és kombinációjuk milyen változásokat okoz a sejtciklus fázisaiban. Az 5-FU-kezelés hatására 48 óra múlva az S fázisú sejtek aránya megnőtt a populáción belül, ezzel párhuzamosan a G1 fázisú sejtek aránya csökkent. Az EUdR-kezelés önmagában nem okoz

1. ábra. EUdR, 5-FU és kombinációjuk citotoxicitásának vizsgálata SW620 sejtvonalon a tápfolyadék hatóanyag-koncentrációjának függvényében. A sejtek kontrollhoz viszonyított %-os túlélését MTT-teszttel vizsgáltuk. Az EUdR-kezelés 30 percig, az 5-FU-kezelés 4 órán át tartott. A kombináció esetében az EUdR adása megelőzte az 5-FU kezelést. (Négy ismételt kísérlet átlagértéke.)



zott szembetűnő változást. A sejtek megnövekedett százalékos aránya a G2/M átmenetben az EUdR + 5-FU kombinált kezelés esetén a legkifejezettebb (2. ábra).

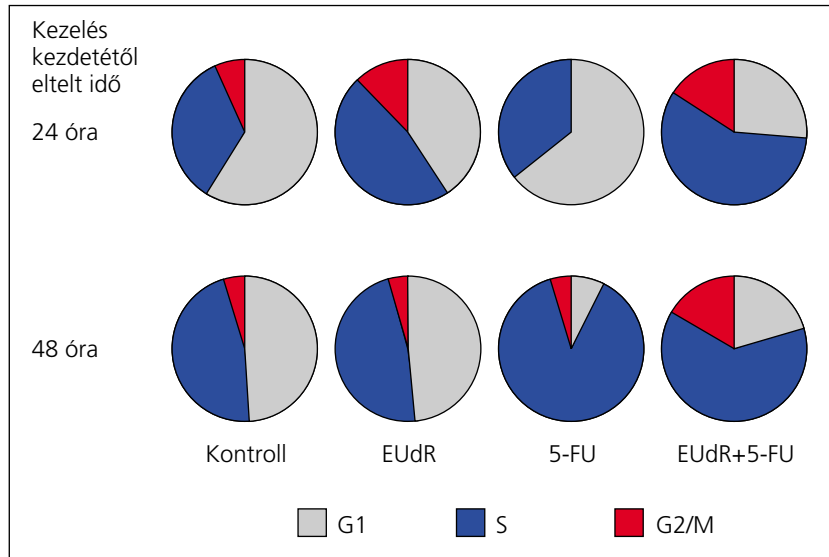
**Timidin-inkorporáció módosulása 5-FU ± EUdR-kezelés hatására**

Az 5-FU + EUdR kombináció hatásmechanizmusának vizsgálata során meghatároztuk a timidin-inkorporáció mértékét. A timidinbeépülés a DNS-be az 5-FU-kezelést követően szignifikánsan megemelkedik, az 5-FU TS-t gátló hatásának következtében. Az EUdR és 5-FU kombináció esetén ez a hatás fokozottan érvényesül, elsősorban a sejtek aktív nukleotidszintézissel járó fázisában, a kezelés után 24 órával (1. táblázat).

**Az 5-FU által indukált sejthalál módosulása EUdR-kezelés hatására**

Az apoptotikus sejteket acridin-orange- és ethidium-bromid-festés után a 3. ábra szemlélteti. Vizsgáltuk, hogy az 5-FU citotoxikus hatása megnyilvánul

2. ábra. Sejtciklusváltozások 5-FU- és EUdR-kezelés után SW620 sejtvonalon. Hatóanyag-koncentráció: 5-FU: 250 µM, EUdR: 100 µM (három ismételt kísérlet átlagértékei)

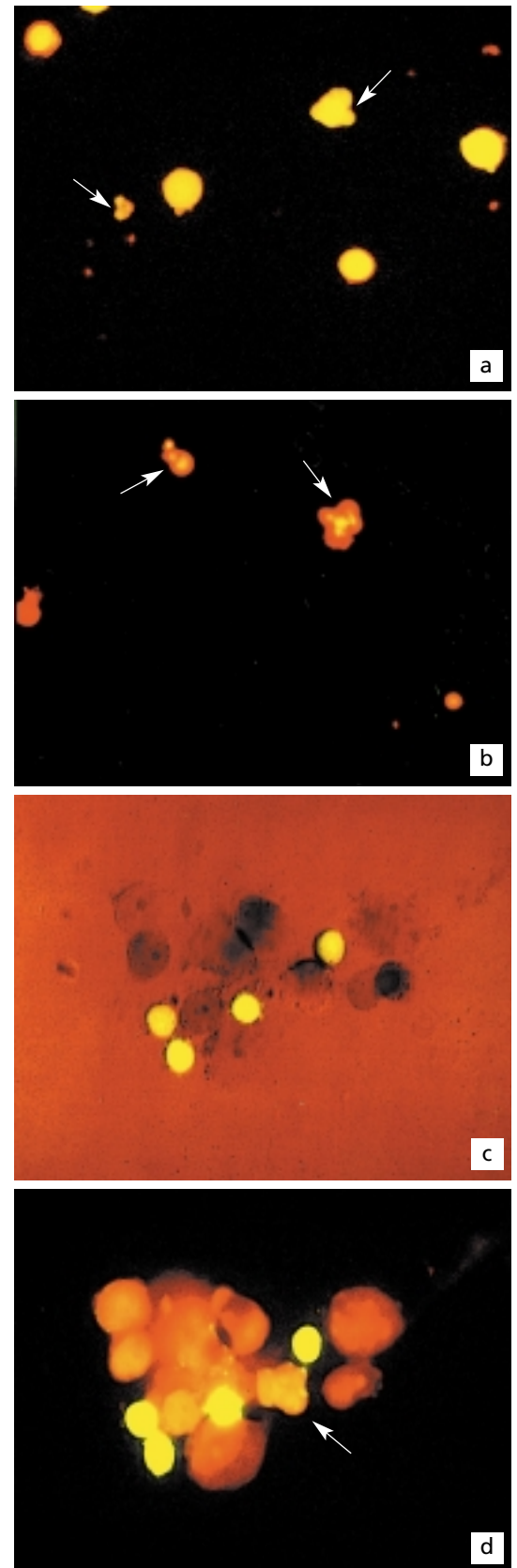


1. táblázat. <sup>3</sup>H-timidin-beépülés vizsgálata SW-620 sejtekbe 5-FU, EUdR és kombinációjukkal történt kezelés után

	Nukleotid-pool cpm/OD <sub>260</sub>	DNS cpm/OD <sub>260</sub>
24h		
Kontroll	154330 ± 110852	33000 ± 4065
EUdR	97154 ± 28610	67619 ± 9628 <sup>a</sup>
5-FU	139942 ± 76633	141093 ± 23284 <sup>b</sup>
EUdR+5-FU	105096 ± 26517	202694 ± 34833 <sup>b,c</sup>
72 h		
Kontroll	46031 ± 4384	38680 ± 7287
EUdR	52592 ± 17983	48726 ± 10016
5-FU	89996 ± 35502	114642 ± 15439 <sup>b</sup>
EUdR+5-FU	79609 ± 23149	140338 ± 40408 <sup>b</sup>

\*Kezelés: 100 µM EUdR (30 percig), majd ezt követően 250 µM 5-FU (4 órán át)  
Három ismételt mérés átlag ± szórás értékei  
<sup>a</sup> p < 0,05 vs. kontroll  
<sup>b</sup> p < 0,01 vs. kontroll  
<sup>c</sup> p < 0,05 vs. FU kezelt

3. ábra. Apoptotikus sejtek acridin-orange- és ethidium-bromid-festéssel (a,b,c,d). Ugyanaz a sejtcsoport az említett festéssel (d) és tripánkék hozzáadásával (c). Az élő sejtek zöldes színben fluoreszkálnak az acridin-orange hatására, míg az elpusztult sejtek narancsszínűek az ethidium-bromid hatására. A nyílak az apoptotikus testeket jelzik.



nul-e az apoptózis létrejöttében, ill. az EUdR által okozott hatásfokozódás esetén az apoptózisarány módosul-e. Az SW620 sejtvonalon a citotoxicitási tesztekben 100  $\mu$ M EUdR okozta az 5-FU-szenzitivitás legnagyobb mértékű növekedését, így jelen kísérleteinkben 100  $\mu$ M EUdR- és az IC<sub>50</sub>-nek megfelelő 250  $\mu$ M-5-FU kezelést alkalmaztuk. Az egyik esetben a sejteket folyamatos EUdR + 5-FU-expozíciónak vetettük alá, a kezelés után tápfolyadékcsere nem történt. Az apoptózisarány meghatározása a kezelés kezdetétől számított 6, 24 és 48 óra elteltével történt (4.A. ábra).

Hat, ill. 24 óra elteltével az apoptotikus sejtek aránya 6–8% volt a populáción belül, és nem volt lényeges különbség a csak 5-FU-val, ill. az 5-FU+EUdR kombinációval kezelt minták között. A kezelés kezdetétől számított 48 óra múlva az 5-FU-val kezelt mintában az apoptózis aránya szignifikánsan emelkedett, 20% körül volt ( $p < 0,001$  vs. kontroll), míg az EUdR hozzáadása az arányt 70–80%-ra növelte ( $p < 0,001$  vs. kontroll és  $p < 0,001$  vs. 5-FU-kezelt) (4.A. ábra). A kísérlet során 72, ill. 96 óra múlva is meghatároztuk az apoptózisarányt a sejtpopuláción belül. 72 óra elteltével az arány nem változott lényegesen, azonban 96 óra múlva az apoptózisban lévő sejtek arányának nagymértékű csökkenése mellett a nekrotizis sejtek aránya lényegesen megnőtt.

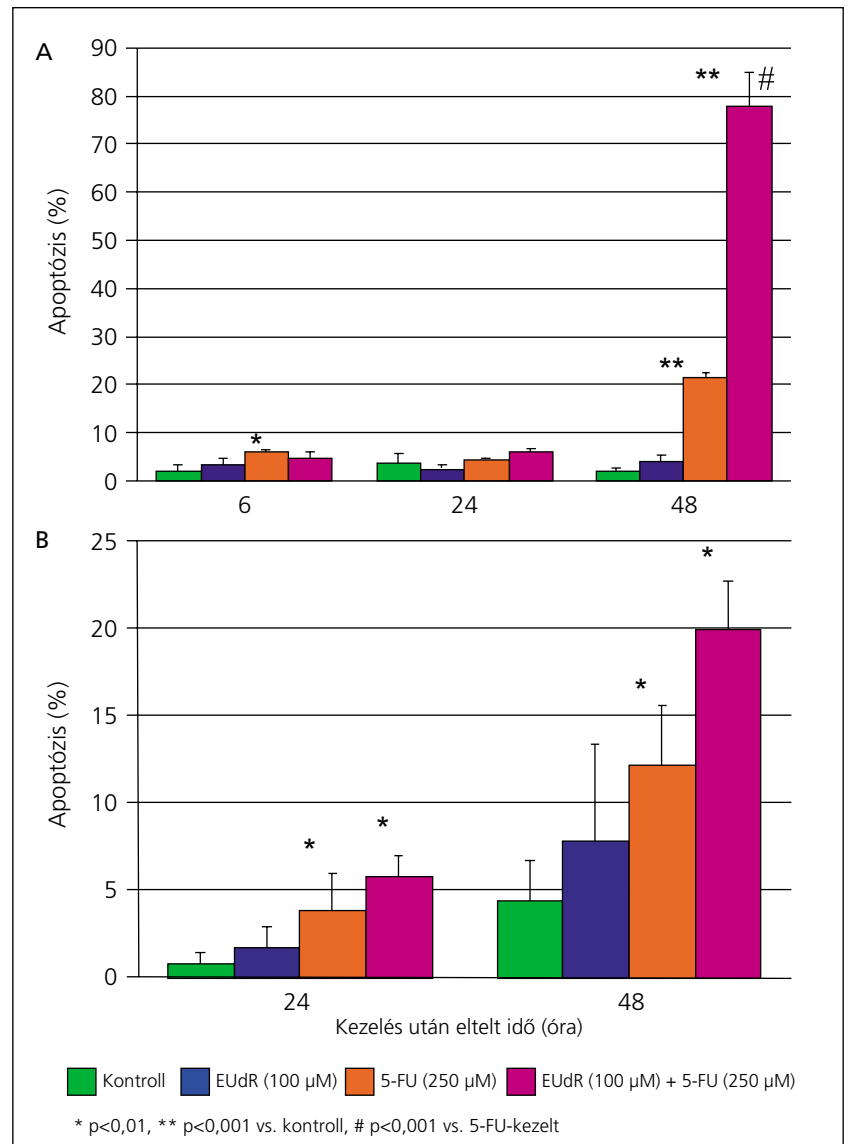
Hasonló feltételek mellett, de a kezelési időt 4 órára módosítva is elvégeztük a kísérletet. Az apoptózisarány meghatározása a kezelés kezdete után 24, ill. 48 órával történt (4.B. ábra). Az 5-FU-, illetve a kombinált kezelés hatására szignifikánsan megnövekedett apoptózisarányt lehetett megfigyelni mind 24, mind 48 óra elteltével. Az 5-FU által indukált apoptózis mértéke ez esetben is növekedett a kombinált kezelés hatására, azonban a növekedés mértéke nem volt szignifikáns. A folyamatos 5-FU- és EUdR-expozíció során jóval nagyobb mértékű volt az EUdR potenciáló hatása (4.A. ábra).

Az apoptózis létrejöttében egyik központi mozzanat a DNS feltöredezése. Vizsgáltuk, hogy az 5-FU- és EUdR-kezelés után kimutatható-e DNS-fragmentáció. A DNS fragmentálódása folyamatos hatóanyag-expozíció esetén a kezelés kezdete után 48 órával jött létre, melyet az EUdR hozzáadása az 5-FU-kezeléshez nem befolyásolt lényegesen (5. ábra).

#### p53 és PCNA fehérje expressziójának változása 5-FU- és EUdR-kezelés hatására SW620 sejtvonalon

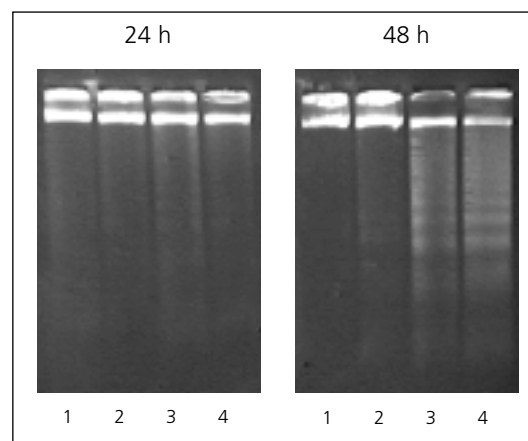
A kombinált kezelés során megfigyelt, emelkedett apoptózisarányval kapcsolatosan vizsgáltuk a p53-expresszió változását. Ezen kívül meghatároztuk a PCNA protein expressziójának mértékét az EUdR- és 5-FU-kezelés után (6. ábra). Az 5-FU-kezelés után mért, kissé emelkedett p53-expresszió az EUdR hatására tovább nőtt, és ez a változás a kezelés után 48 óra elteltével kifejezettebb volt (7.A. ábra). A PCNA-expresszió a kezelést követően 24 órával az 5-FU+EUdR kombináció esetén megnőtt, 48 óra elteltével az

4. ábra. Az apoptózisarány változása 5-FU- és EUdR-kezelést követően SW620 sejtvonalon. A = folyamatos kezelés, B = 4 órás kezelés. Az apoptotikus és nekrotikus sejtek számolása Bürker-kamrában történt. (Három kezelés után számolt átlag + standard deviáció értékei)



5. ábra. DNS-fragmentáció vizsgálata 5-FU- és EUdR-kezelés során SW620 sejtvonalon.

1: Kontroll, 2: 100  $\mu$ M EUdR, 3: 250  $\mu$ M 5-FU, 4: 100  $\mu$ M EUdR + 250  $\mu$ M 5-FU folyamatos kezelés



expresszió mértéke nem különbözött az 5-FU-val, ill. az 5-FU + EUdR kombinációval kezelt mintákban (7.B. ábra).

## Megbeszélés

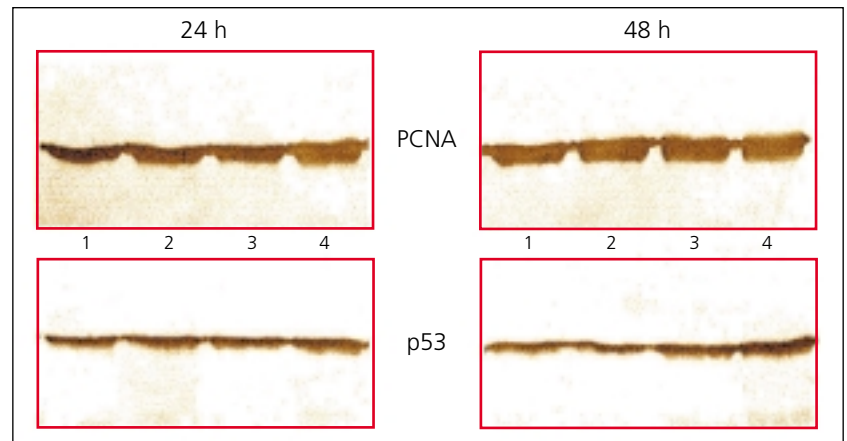
Az 5-FU bonyolult metabolizmusa számos ponton nyújt lehetőséget a beavatkozásra, melyek közül a katabolizmusért felelős DPD gátlása az egyik leggyakrabban alkalmazott módszer. Az elmúlt években a DPD, mint az 5-FU-katabolizmus kulcsenzime, az érdeklődés előterébe került. Számos adat szól a súlyos 5-FU-toxicitást szenvedett betegek átlagosnál jóval alacsonyabb DPD-aktivitásáról, valamint a DPD-aktivitás és az 5-FU-clearance közötti kapcsolatról (7, 13). Egyes szerzők sejtvonalakon ill. fej-nyaki tumoros betegeken az 5-FU-szenzitivitás és a DPD-aktivitás között figyeltek meg korrelációt (2, 6). Számos, az 5-FU hatását moduláló DPD-inhibitor áll kifejlesztés alatt – melyek között az etiniluracil tűnt a legígéretesebbnek –, azonban a fázis I és korai fázis II tanulmányok szerint, mint a DPD irreverzibilis inhibitora, a toxicitást jelentősen megemeli, ezért alkalmazásával szignifikáns terápiásindex-növekedés nem érhető el (20). A közelmúltban egy DPD-inhibitor prodrugot (Ro 09-4889) terveztek, amelynek segítségével gátolni kívánják az orálisan adagolható 5-FU-származékból, a capecitabine-ből intratumorálisan keletkező 5-FU katabolizmusát (3).

Korábbi in vivo tanulmányok szerint az EUdR-kezelés megnövelte az 5-FU citotoxikus hatását (15, 16), majd ezt a jelenséget in vitro alacsony és magas DPD-aktivitású sejtvonalakon is igazoltuk (14). Az EUdR-ből keletkező metabolit, az etiluracil számottevő csökkenést okozott a két magas DPD-aktivitású sejtvonal (CAL33 és CAL51) DPD-aktivitásában, azonban az 5-FU hatásának módosítása közülük csak az egyik sejtvonalon (CAL51) volt megfigyelhető, vagyis az 5-FU-szenzitivitásban nem, vagy nem kizárólag a DPD-aktivitás játszik szerepet. Ezt támasztja alá, hogy az EUdR egy alacsony DPD-aktivitású sejtvonalon is (SW620) igen hatékonyan fokozta az 5-FU citotoxikus hatását. Ebből következően, a DPD gátlásán kívül az 5-FU-citotoxicitás modulációját a pirimidinmetabolizmus egyéb jellemzői és más faktorok is befolyásolják. Célunk volt tehát adatokat gyűjteni azzal kapcsolatban, hogy a DPD-gátláson kívül milyen molekuláris mechanizmusok játszanak szerepet az 5-FU citotoxikus hatásának potenciálásában.

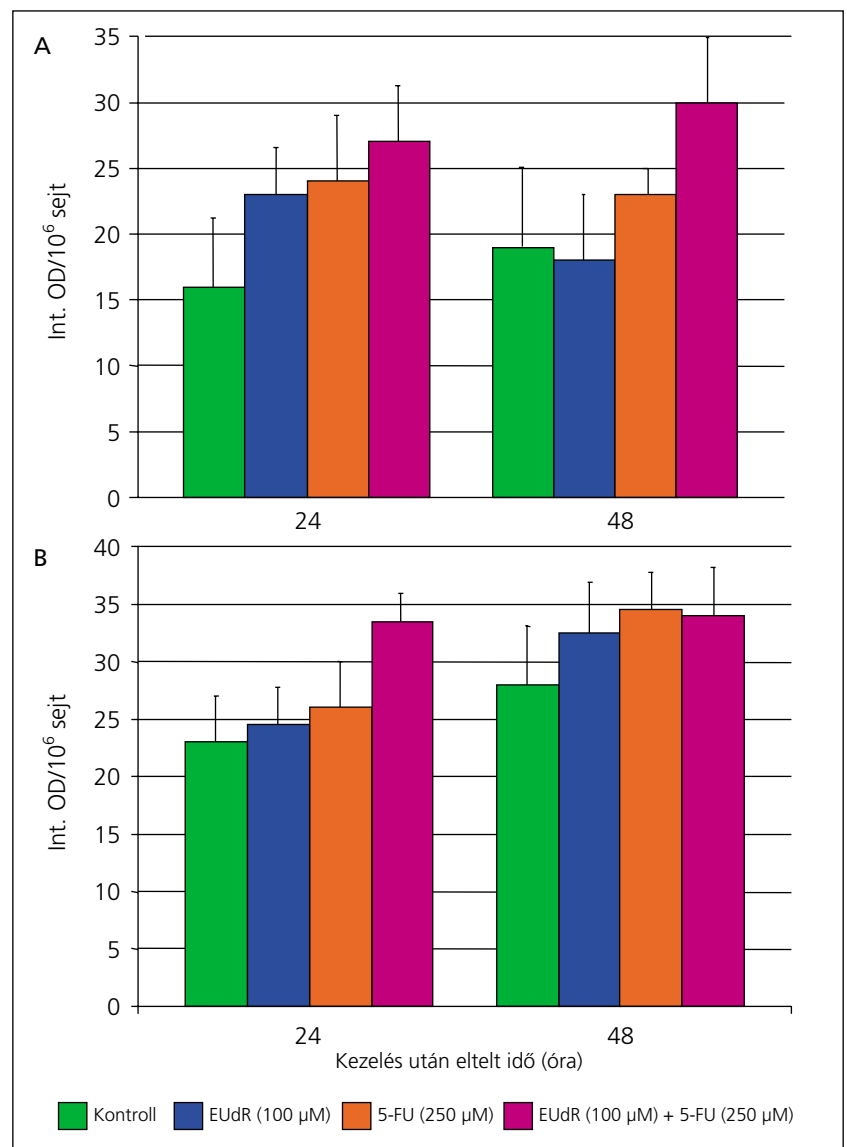
Meghatároztuk a sejtkinetikai paraméterek változásait a kombináció hatására. A sejtek megnövekedett százalékos aránya a G2/M ellenőrző ponton az EUdR + 5-FU kombinált kezelés után volt a legkifejezettebb, ami a kombinált kezelés intenzívebb DNS-károsító hatására utal. A DNS-károsodás olyan sejtválaszt indukál, amelynek következménye a károsodás kijavítása, vagy a programozott sejthalál folyamatának beindítása. Utóbbi esetben DNS-károsodást felismerő proteinek (ATM, ATR, Rad17-RFC komplex, stb.) a jelátviteli utak közvetítésével (Chk1, Chk2, Ser/Thr

6. ábra. 5-FU- és EUdR-kezelés PCNA- és p53-expresszióra gyakorolt hatása SW620 sejtvonalon.

1: Kontroll, 2: 100  $\mu$ M EUdR, 3: 250  $\mu$ M 5-FU, 4: 100  $\mu$ M EUdR + 250  $\mu$ M 5-FU. Western technika, mintánként 100  $\mu$ g fehérje



7. ábra. (A) p53 és (B) PCNA expressziójának változása 5-FU-, EUdR- és kombinációjukkal történt kezelést követően SW620 sejtvonalon. (Kezelési menetrend leírása: lásd 1. ábra. Három kezelést követő Western blot vizsgálat denzitometriás kiértékelésének átlag és standard deviáció értékei.)





kinázok, Cdc25 foszfatázok) aktiválják a p53-at, inaktiválják a ciklindependens kinázokat és ezáltal gátolják a sejtciklust (21).

Az 5-FU- ill. EUdR-kezelés p53-expresszióra kifejtett hatását vizsgálva, a kombinált kezelés esetén fokozott expressziót észleltünk, mely a kezelés kezdete után 48 órával kifejezettebb volt, amikor is az apoptózisrátaiban is emelkedést tapasztaltunk, amely szintén a kombináció esetében volt a legmagasabb. A kemoszenzitivitási tesztek során 4 óra volt a hatóanyag-expozíció időtartama. Az apoptózisarányt mind 4 órás, mind folyamatos kezelés során meghatároztuk. Az utóbbi esetben az EUdR-kezelés az 5-FU által okozott apoptózis arányát sokszorosára növelte, mely 48–72 óra elteltével volt a legnagyobb mértékű, 96 ill. 120 óra múlva helyét átvette a valószínűleg tápanyag-elégtelenségből adódó nekrozis. Az apoptózisarány a folyamatos kezelés után, szemben a 4 órás kezeléssel, szignifikánsan magasabb volt, amely összhangban van egy közölt metaanalízis eredményével, amely szerint szignifikánsan magasabb válaszadási arányt és teljes túlélést írtak le az 5-FU folyamatos infúziós adagolása esetén a bolus kezeléshez viszonyítva (19). Az apoptotikus folyamat során első lépésben a DNS feltöredezik, fragmentálódik. Az előző eredményekkel összhangban, a kezelés kezdete után 48 óra elteltével az 5-FU-kezelés hatására létrejött a DNS fragmentációja, melyet az EUdR hozzáadása nem befolyásolt lényegesen.

A <sup>3</sup>H-timidin-inkorporáció a kezelés kezdete után 24 órával az EUdR-rel kezelt mintákban kismértékben, az 5-FU és különösen az EUdR + 5-FU kombináció hatására jelentősen megnövekedett. A timidinkináz a keringő timidin-poolt hasznosítja a salvage anyagcsere során, így a <sup>3</sup>H-timidin-beépülés a timidinkináz aktivitásától függ. Az EUdR-ből és 5-FU-ból az anabolizmus során nukleotidok (EdUMP és FdUMP) keletkeznek, melyeknek egyik fő hatása a TS gátlása, így a <sup>3</sup>H-timidin-beépülés fokozódása a TS-gátlás növekedésére utal. Az EUdR-kezelés után kismértékben, az 5-FU, és különösen az EUdR + 5-FU kombináció hatására jelentősen megnövekedett <sup>3</sup>H-timidin-inkorporáció fokozott TS-gátlást jelez.

A sejtek az 5-FU-bázisú terápiára TS-túltermeléssel (overexpresszió) válaszolhatnak, mely a rezisztencia egyik fontos mechanizmusa, azonban a TS, a de novo timidinszintézisen kívül, mint mRNS-kötő fehérje, fontos regulációs szerepet is betölt a proliferációban. Kötődve a saját mRNS-éhez szabályozza önmaga bioszintézisét, ezenkívül kötődik a c-myc és a p53 mRNS-hez, és ezek transzlációját negatív feedback mechanizmus révén gátolja (5). A TS sejtregulációs szerepének tisztázása új lehetőségeket nyújt a TS-re ható citosztatikumok alkalmazása terén, valamint a poszttranszlációs reguláció részletes megismerése új molekuláris targetet jelenthet.

Összefoglalva megállapíthatjuk, hogy az alacsony DPD-aktivitású sejtvonalon megfigyelt 5-FU-hatás modulációja arra utal, hogy a DPD-gátlástól eltérő tényezők is szerepet játszanak az EUdR hatásmechanizmusában. Az 5-FU hatására

létrejövő, fokozott timidin-inkorporáció által jelzett TS-gátlás EUdR jelenlétében nagyobb mértékű, így a p53-mRNS TS által okozott transzlációs gátlása nem megy végbe, és a fokozott p53-expresszió apoptózist indukál. Az EUdR hatására az 5-FU által okozott TS-gátlás – mind direkt (radioaktív enzim meghatározás), mind indirekt (timidin-inkorporáció) módszerrel kimutatva – fokozódik, melynek következménye nem elsősorban a proliferáció gátlása, hanem az apoptózis indukciója.

### Köszönetnyilvánítás

A szerzők köszönetüket fejezik ki Dr. Jeney András egyetemi tanárnak a vizsgálatok során tett kritikus észrevételeiért és értékes szakmai tanácsaiért.

A munkát és a közlemény összeállítását az OM NKFP 1/48/2001 pályázat és a Terry Fox alapítvány támogatta.

### Irodalom

1. Adlard JW, Richman SD, Seymour M, et al. Prediction of response of colorectal cancer to systemic chemotherapy. *The Lancet* 3:75-82, 2002
2. Beck A, Etienne M, Chéradame S, et al. The role for dihydropyrimidine dehydrogenase and thymidylate synthase in tumour sensitivity to fluorouracil. *Eur J Cancer* 30A:1517-1522, 1994
3. Bellibas SE, Patel I, Chamorey E, et al. Single ascending dose, tolerability, pharmacokinetic-pharmacodynamic study of dihydropyrimidine dehydrogenase inhibitor Ro 09-4889. *Clin Cancer Res* 10:2327-2335, 2004
4. Cao S, Lu K, Tóth K, et al. Persistent induction of apoptosis and suppression of mitosis as a basis for curative therapy with S-1, an oral 5-fluorouracil prodrug in a colorectal tumor model. *Clin Cancer Res* 5:267-274, 1999
5. Chu E, Copur SM, Ju J, et al. Thymidylate synthase protein and p53 mRNA form an in vivo ribonucleoprotein complex. *Mol Cell Biol* 19:1582-1594, 1999
6. Etienne MC, Chéradame S, Fishel JL, et al. Response to fluorouracil therapy in cancer patients: The role of tumoral dihydropyrimidine dehydrogenase activity. *J Clin Oncol* 13:1663-1670, 1995
7. Fleming A, Milano GA, Thyss A, et al. Correlation between dihydropyrimidine dehydrogenase activity in peripheral mononuclear cells and systemic clearance of fluorouracil in cancer patients. *Cancer Res* 52:2899-2902, 1992
8. Focan C, Levi F, Kreutz F, et al. Continuous delivery of venous 5-fluorouracil and arterial 5-fluorodeoxyuridine for hepatic metastases from colorectal cancer: feasibility and tolerance in a randomized phase II trial comparing flat versus chromomodulated infusion. *Anticancer Drugs* 10:385-392, 1999
9. Jakobsen A, Berglund A, Glimelius B, et al. Dose-effect relationship of bolus 5-fluorouracil in the treatment of advanced colorectal cancer. *Acta Oncol* 41:525-531, 2002
10. Jarvis WD, Turner AJ, Povirk LF, et al. Induction of apoptotic DNA fragmentation and cell death in HL-60 human promyelocytic leukemia cells by pharmacological inhibitors of protein kinase C. *Cancer Res* 59:1707-1712, 1994
11. Jeney A, Barrie E, Taylor G, et al. 5-ethyl-2'-deoxyuridine: an explanation for its lack of cytotoxic action in vivo. *Eur J Cancer Clin Oncol* 12:557-562, 1986
12. Yip D, Karapetis D, Strickland AH, et al. A dose escalating study of oral eniluracil/5-fluorouracil plus oxaliplatin in patients with advanced gastrointestinal malignancies. *Ann Oncol* 14:864-866, 2003
13. Katona C, Kralovánszky J, Rosta A, et al. Putative role of dihydropyrimidine dehydrogenase in the toxic side

- effects of 5-fluorouracil in colorectal cancer patients. *Oncology* 55:468-475, 1998
14. Katona C, Timár F, Jeney A, et al. Modulation of 5-fluorouracil by 5-ethyl-2'-deoxyuridine on cell lines expressing different dihydropyrimidine dehydrogenase activities. *Anti-Cancer Drugs* 10:561-567, 1999
  15. Kopper L, Magyarosy E, Jeney A, et al. Potentiation of the antitumor action of 5-fluorouracil with 5-ethyl-2'-deoxyuridine in human colorectal tumor xenografts. *Oncology* 41:155-158, 1984
  16. Kralovánszky J, Katona C, Jeney A, et al. 5-ethyl-2'-deoxyuridine, a modulator of both antitumor action and pharmacokinetics of 5-fluorouracil. *J Cancer Res Clin Oncol* 125:675-684, 1999
  17. Lapis K, Bocsi J, Lapis P, et al. Flow cytometric DNA ploidy and proliferative activity of diethylnitrosamine-induced hepatocellular carcinoma and pulmonary metastases in monkeys. *Hepatology* 22:952-961, 1995
  18. Martin A, Clynes M. Comparison of 5 microplate colorimetric assays for in vitro cytotoxicity testing and cell proliferation assays. *Cytotechnology* 11:49-58, 1993
  19. Meta-Analysis Group in Cancer. Efficacy of intravenous continuous infusion of fluorouracil compared with bolus administration. *J Clin Oncol* 16:301-308, 1998
  20. Rothenberg ML, Benedetti JK, Macdonald JS, et al. Phase II trial of 5-fluorouracil plus eniluracil in patients with advanced pancreatic cancer: a Southwest Oncology Group study. *Ann Oncol* 13:1576-1582, 2002
  21. Sancar A, Lindsey-Boltz LA, Unsal Kacmaz K, et al. Molecular mechanisms of mammalian DNA repair and the DNA damage checkpoints. *Ann Rev Biochem* 73:39-85, 2004
  22. Szabolcs A, Sági I, Ötvös L. Synthesis of 5-alkyl-2'-deoxyuridines. *J Carbohydr Nucleos Nucleot* 2:197-211, 1975
  23. Tatsumi K, Yamauchi K, Kiyono K, et al. 3-cyano-2,6-dihydroxypyridine (CNDP), a new potent inhibitor of uracil dehydrogenase. *J Biochem* 114:912-918, 1993
  24. The Advanced Colorectal Cancer Meta-Analysis Project. Meta-analysis of randomized trials testing the biochemical modulation of fluorouracil by methotrexate in metastatic colorectal cancer. *J Clin Oncol* 12:960-969, 1994
  25. Tsavaris N, Kosmas C, Polyzos A, et al. Leucovorin + 5-fluorouracil plus dipyrindamole in leucovorin 5-fluorouracil-pretreated patients with advanced colorectal cancer: a pilot study of three different dipyrindamole regimens. *Tumori* 87:303-307, 2001
  26. van der Wilt CL, Pinedo HM, Smid K, et al. Elevation of thymidylate synthase following 5-fluorouracil treatment is prevented by the addition of leucovorin in murine colon tumors. *Cancer Res* 52:4922-4928, 1992
  27. Venturini M. Rational development of capecitabine. *Eur J Cancer* 38:S3-S9, 2002
  28. Weckbecker G. Biochemical pharmacology and analysis of fluoropyrimidines alone and in combination with modulators. *Pharmacol Ther* 50:367-424, 1991