

A metiléntetrahydrofolát-reduktáz (MTHFR) C677T polimorfizmus klinikai jelentősége a metasztatikus colorectalis daganatok 5-fluoropirimidin-alapú kezelésében

Budai Barna, Hitre Erika, Adleff Vilmos, Czeglédi Ferenc, Gyergyay Fruzsina, Láng István, Kralovánszky Judit

Országos Onkológiai Intézet, Budapest

A szerzők vizsgálták 5-fluoropirimidin-alapú kezelésben részesülő 101 metasztatikus colorectalis tumoros betegben és 196 egészséges egyénben a metiléntetrahydrofolát-reduktáz (MTHFR) C677T polimorfizmust PCR-RFLP módszerrel. Nem volt szignifikáns eltérés az egészségesek és a betegek MTHFR genotípus szerinti megoszlásában, valamint a betegek klinikai paramétereit alapján (kor, nem, tumorlokalizáció, differenciáltsági fok, kezelési típusok) vizsgált csoportok között sem. A 3-30 (medián 18,5) hónapos követési idő alatt a T allélt hordozó betegek túlélése azonban szignifikánsan jobbnak bizonyult, mint a vad (CC) genotípus esetében ($p=0,036$). A CT és TT genotípus esetében a csak első vonalbeli kezelésben részesült betegek túlélése szignifikánsan rövidebb, mint a több vonalbeli kezelést kapott betegeké ($p=0,015$). Az MTHFR C677T polimorfizmus meghatározása az 5-fluoropirimidin kezeléssel metasztatikus colorectalis tumoros betegek esetében prognosztikai értékkel bír, és ezen felül segítséget nyújthat a személyre (csoportra) szabott terápia megtervezésében. *Magyar Onkológia, 48:253–257, 2004*

The authors investigated the methylenetetrahydrofolate reductase (MTHFR) C677T polymorphism in 101 metastatic colorectal cancer patients treated with 5-fluoropyrimidine-based therapy and in 196 healthy individuals by PCR-RFLP method. There was no significant difference in genotype distribution of patients and healthy controls, and between subgroups investigated according to clinical parameters (age, gender, tumor location, grade and treatment type). However, after a 3-30 (median 18.5) months follow-up the survival of patients with T allele proved to be better than that of patients with wild type (CC) genotype ($p=0.036$). In case of CT and TT genotypes the survival of patients receiving only first line therapy was significantly shorter than that of patients receiving more lines of treatment ($p=0.015$). Determination of MTHFR C677T polymorphism has prognostic value in case of patients with metastatic colorectal cancer receiving 5-fluoropyrimidine-based therapy, and may help in designing the individual (group) tailored therapy. *Budai B, Hitre E, Adleff V, Czeglédi F, Gyergyay F, Láng I, Kralovánszky J. The clinical importance of methylenetetrahydrofolate reductase (MTHFR) C677T polymorphism in the 5-fluoropyrimidine-based therapy of metastatic colorectal tumours. Hungarian Oncology 48:253–257, 2004*



Bevezetés

A farmakogenetika a rákellenes kemoterápiában egyre nagyobb szerepet játszik. A betegek genetikai háttere befolyásolja a kezelések hatásosságát

és a betegek túlélési esélyeit. Szükség van tehát olyan molekuláris diagnosztikai módszerek kidolgozására, melyek lehetővé teszik a kezelések kimenetelének pontosabb előrejelzését és az egyénre szabott kemoterápia kidolgozását.

Közlésre érkezett: 2004. augusztus 4.
Elfogadva: 2004. augusztus 31.

Levelezési cím: Dr. Budai Barna,
Országos Onkológiai Intézet, 1122 Budapest, Ráth Gy. u. 7-9.,
Tel.: 1-224-8600, Fax: 1-224-8620, e-mail: budai@oncol.hu

A jelen munka az NKFP 1/48/2001, ETT 575/2003 és Terry Fox alapítvány támogatásával készült.

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

A metiléntetrahydrofolát-reduktáz (MTHFR) a folátanyagcsere kritikus enzime, mely irreverzibilisen katalizálja az 5,10-metiléntetrahydrofolát (MTHF) \rightarrow 5-metiltetrahydrofolát átalakulást és elősegíti a homocisztein remetilációját, ezáltal metildonort szolgáltatva a DNS-metilációhoz (7, 8).

Az eddig leírt MTHFR génpolimorfizmusok közül a C677T (Ala \rightarrow Val) SNP fordul elő leggyakrabban (18). A homoizógóta mutáns (TT) esetekben az enzimaktivitás 30%-ra csökken. Emiatt felhalmozódik az MTHF, mely a timidilát de novo

bioszintézis kofaktora, és ezáltal a DNS-szintézis előnybe kerül a DNS-metilációval szemben (7).

A metasztatikus colorectalis daganatok kezelésében legtöbbször az 5-fluorouracil (5-FU) alapú kemoterápia kerül alkalmazásra. Az MTHF felhalmozódásnak szerepe lehet a colorectalis tumoros betegek 5-fluorouracil-alapú kezelésre adott válaszában, mivel az 5-FU metabolitja, az 5-fluoro-2'-dezoxiuridin-5'-monofoszfát (FdUMP), a timidilát-szintáz (TS) és az MTHF egy stabil ternier komplexet képez. A komplexképzés nyomán a TS-aktivitás gátlódik, ez intracelluláris timidinhiányhoz vezet, és végül a DNS-szintézis leáll. A megemelt intracelluláris MTHF-szint elősegíti a ter-

nier komplex képződését és stabilitását, és ezáltal megnövelheti az 5-FU citotoxikus hatását. Az 5-FU-kezeléssel párhuzamosan adott leucovorin (LV), mely az MTHF egyik prekursora, szintén potenciózza az 5-FU sejtkárosító hatását, azáltal, hogy a TS-MTHF-FdUMP ternier komplex stabilitását megnöveli (11).

Vizsgálatunk célja összefüggés keresése a metasztatikus colorectalis daganatos betegek MTHFR C677T genotípusa és az 5-FU-alapú kezelésre adott válasza, ill. túlélése között.

Betegek és módszerek

Betegek

A vizsgálatba 101 metasztatikus colorectalis tumoros beteget random választottunk be, akik palliatív 5-FU-alapú kezelést kaptak az Országos Onkológiai Intézet (OOI) belgyógyászati osztályain. A medián követési idő 18,5 (3-30) hónap volt. Minden beteg beleegyező nyilatkozatot írt alá, és a vizsgálat az OOI Etikai Bizottságának előírásai alapján történt. A palliatív pre- vagy posztoperatív radio- és/vagy 5-FU-alapú kemoterápiát a nemzetközi protokolloknak megfelelően alkalmazták (6). A 196 kontroll minta egészséges véradóktól származott. A betegek klinikai jellemzőit az 1. táblázat tartalmazza.

Módszerek

A betegek és 196 egészséges egyén MTHFR genotípusának kimutatásához a vérből magvas fehérvérésejteket szeparáltunk (Ficoll, Pharmacia) (10), majd ebből DNS-t preparáltunk (MasterPure™ Genomic DNA Purification Kit, Epicentre). A DNS-ből PCR-RFLP módszerrel határoztuk meg az MTHFR genotípust. A PCR amplifikáció az SNP-t közrefogó specifikus primerpárral történt. A 198 bp hosszúságú amplitont *Hinf* I (Fermentas) restrikciós endonukleázzal emésztettük. A vad típus nem, míg a mutáns ampliton 23 bp és 175 bp hosszúságú egységekre emésztődik. A hasítási termékeket PAGE segítségével választottuk el és SybrGreen I (Sigma) festék segítségével UV-fényben azonosítottuk BioRad 2000 géldokumentációs rendszeren.

Statisztika

A túlélés kiértékelése a Kaplan-Meier-módszer szerint történt, és a különbségek szignifikanciáját log rank-tesztel vizsgáltuk. A relatív rizikó értékeit többváltozós Cox-regressziós analízissel számoltuk ki. Az eseti megoszlásokat χ^2 -tesztel értékeltük.

Eredmények

A genotípusok klinikai paraméterek szerinti megoszlását a 2. táblázat tartalmazza. A T mutáns allélt tartalmazó genotípusokat (CT és TT) egy csoportba összesítettük. A betegek genotípus szerinti megoszlása a kontroll csoporttal megegye-

1. táblázat.
A betegek megoszlása
klinikai paraméterek
szerint

			%
Összes beteg		101	(100)
Kor (év)	Átlag (tartomány)	57,8	(23-82)
Nem	Férfi	56	(55)
	Nő	45	(45)
Tumorlokalizáció	Rectum	48	(48)
	Colon + sigma	53	(52)
Tumor differenciáltsági foka	Jó	2	(2)
	Közepes	82	(81)
	Rossz	17	(17)
Metasztázis	Máj	41	(41)
	Máj + egyéb	24	(24)
	Tüdő	8	(8)
	Tüdő + egyéb	0	(0)
	Nyirokcsomó	2	(2)
	Nyirokcsomó + egyéb Egyéb	1 7	(1) (7)
Lokális recidíva		18	(18)
Meghaltak száma		50	(50)

2. táblázat. A MTHFR genotípusok megoszlása a kliniko-patológiai jellemzők alapján

Paraméterek		CC	CT+TT	ρ
Kontroll		84	97+15	
Összes beteg		46	48+7	Ns* ^o
Nem	Férfi	28	28	
	Nő	18	27	Ns*
Tumorlokalizáció	Rectum	25	23	
	Colon + sigma	21	32	Ns*
Tumor differenciáltsági foka	Jó	0	2	
	Közepes	37	45	
	Rossz	9	8	Ns*
Kezelési típus	Kemoterápia	35	41	
	Kemo-radioterápia	11	14	Ns*
Kezelési protokoll	CIFUFA	15	19	
	CIFUFA + irinotecan/ oxaliplatin	31	36	Ns*
Meghaltak száma		24	26	Ns*
Túlélési átlag (hónap)		20,7	27,7	0,036**

* χ^2 -teszt, **Log rank-teszt, ^ovs. kontroll, Ns: nem szignifikáns

zett. Nem találtunk szignifikáns eltérést a nem, tumorlokalizáció, differenciáltsági fok, valamint a kezelési típus (kemo- vs. radio-kemoterápia és 5-FU vs. 5-FU+irinotecan/oxaliplatin) szerinti genotípus-megoszlásokban. A követési idő alatt meghaltak részaránya sem különbözött a két alcsoportban. Az átlagos túlélés viszont hosszabb a T alléllal rendelkező betegek esetében, és ez a különbség a Kaplan-Meier kiértékelésnél szignifikáns ($p=0,036$) (2. táblázat, 1. ábra).

A lokalizáció szerint csoportosított túlélési görbék esetében is megállapítható, hogy a hosszabb túlélés a CT és TT genotípusok esetében nyilvánvaló, de a különbség csak a colon/sigmatumoros betegek esetében volt szignifikáns ($p=0,0212$) (2, 3. ábra).

Feltételezve, hogy az 5-FU-alapú kemoterápia eredményesebb a hosszán tartó, több kezelési vonalon átnyúló esetekben, ennek megfelelően csoportosítottuk azokat a betegeket, akik csak első vonalbeli kezelést kaptak, szemben azokkal, akik másod- vagy harmadvonalban is 5-FU-alapú kezelésben részesültek. Mindkét genotípusnál a

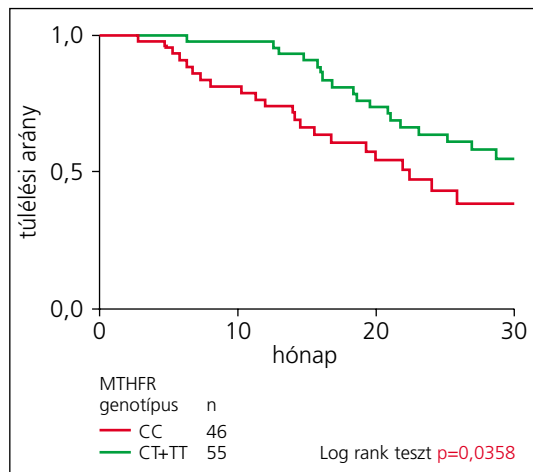
hosszán tartó kezelés esetén nyilvánvaló a hosszabb túlélés, és ez a különbség a T alléllal rendelkező betegek esetén szignifikáns ($p=0,0154$) (4. ábra).

A Cox regressziós analízis alapján – a kor, nem, tumorlokalizáció, differenciáltsági fok, MTHFR genotípus és kezelési mód (csak első vonalbeli vs. több vonalbeli kezelés) változókat figyelembe véve – az MTHFR genotípus és a kezelési mód mutatott erősen szignifikáns összefüggést a túléléssel. A relatív rizikó a CC genotípus esetében 2,8 a T alléllal rendelkezőkhöz viszonyítva. A csak első vonalbeli kezelésben részesülők esetében a relatív rizikó 2,5 a több vonalbeli kezelésben részesülőkhez viszonyítva (3. táblázat).

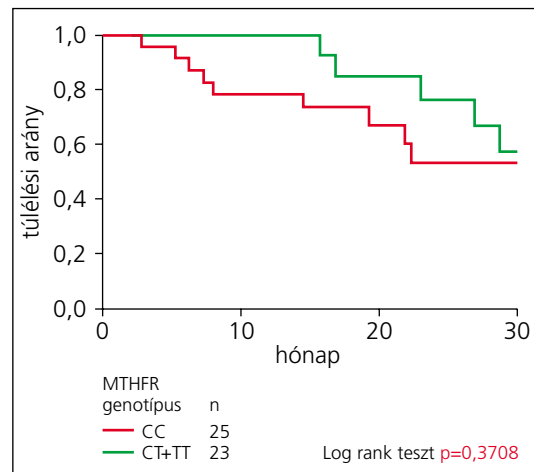
Megbeszélés

Számos közlemény beszámol az MTHFR-polimorfizmus és a colorectalis ill. más lokalizációjú rákrizikó kapcsolatáról (15, 18). A colorectalis rák kialakulása és az alacsony folátstátus között ismert a kapcsolat (9), ugyanakkor a folátstátus és

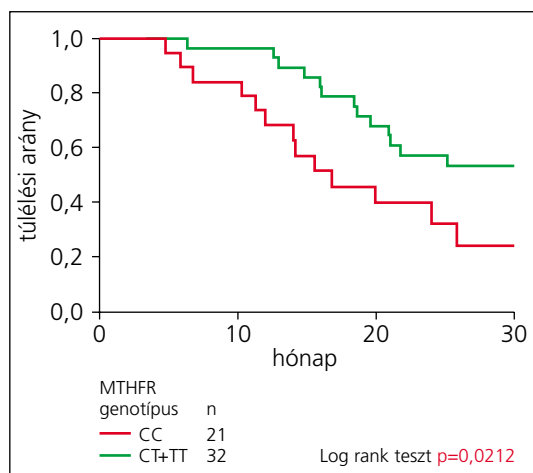
1. ábra. A MTHFR C677T polimorfizmus alapján csoportosított metasztatikus colorectalis tumoros betegek teljes túlélése



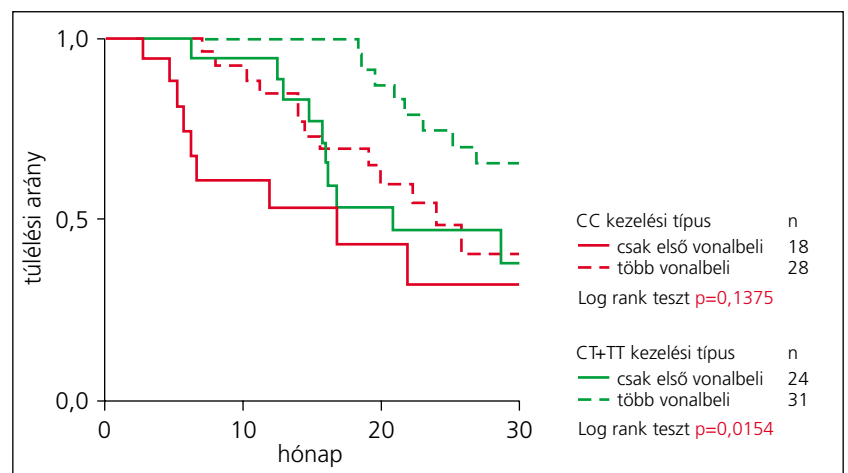
2. ábra. A MTHFR C677T polimorfizmus alapján csoportosított metasztatikus rectumtumoros betegek teljes túlélése



3. ábra. A MTHFR C677T polimorfizmus alapján csoportosított metasztatikus colon + sigmatumoros betegek teljes túlélése



4. ábra. A MTHFR C677T polimorfizmus és a kezelési típus (csak első vonalbeli vs. több vonalbeli kezelés) alapján csoportosított metasztatikus colorectalis tumoros betegek teljes túlélése



az MTHFR-polimorfizmus szoros kölcsönhatásban hatnak: a TT genotípus esetén 50%-os a rizikócsökkenés a magas folátszintű egyének esetében, ugyanakkor az alacsony folátszinttel rendelkezők körében ez a tendencia eltűnik (12). A magyarországi népességre jellemző a T alléllal rendelkezők viszonylag magas aránya és az alacsony folátbevitel (4). Vizsgált anyagunkban mind az egészséges kontrollok, mind pedig a colorectalis tumoros betegek esetében a T alléllal rendelkezők aránya 57 ill. 54%, ami Czeizel és mtsai (4) eredményével (56%) jól egyezik. A CT és TT genotípus részarányának egyezése az egészséges és colorectalis tumoros betegcsoportban valószínűvé teszi, hogy a folátszint az egészséges populációban valóban nem magas, és ezért az MTHFR-polimorfizmus nem fejtheti ki a rákrizikót csökkentő hatását.

Vizsgálatunkban a fő munkahipotézis annak igazolása, hogy azok a betegek, akik az MTHFR gén C677T polimorfizmusát hordozzák, feltehetően másként reagálnak az 5-fluoropirimidin-alapú kezelésre. Amennyiben ez a polimorfizmus csökkenti az enzimaktivitást, megnövelheti a folátszintet (főként a sejten belüli MTHF-koncentrációt), mely a TS reakcióhoz szükséges, és ezáltal a TS inhibitor 5-FU hatását fokozhatja.

Állatkísérletekben is megállapították, hogy az 5-FU hatássűrűségét növelte, ha MTHF-et is adtak (1). Más szerzők kimutatták, hogy az MTHFR in vivo antiszenz gátlása foszforotioát oligonukleotidok alkalmazásával csökkentette számos transzformált colonsajtóvonal növekedését, ami szintén azt az elvet bizonyítja, hogy az MTHFR-aktivitás csökkenése, mutáció vagy antiszenz kezelés révén, a tumornövekedést csökkenti (16).

Érdekes módon 5-FU ± folsavval kezelt emlő-, fejnyaki, colon-, vékonybél- és pancreas-tumor-sajtóvonalak vizsgálatok nem tapasztaltak a várakozásoknak megfelelő IC50-szintcsökkenést a CT és TT MTHFR-polimorfizmusú sejtek esetében, ellenben a MTHFR A1298C polimorfizmus esetén igen (5). Ez lehetséges, hogy annak a következménye, hogy egyrészt a vizsgált 19 sejtvonal nagyon heterogén lokalizációból származott (6-6 emlő és colon, 5 fejnyaki régió, 1-1 vékony-

bél és pancreas), másrészt az MTHFR C677T és A1298C polimorfizmus-típusok megoszlása nagyon jelentős eltérést mutatott a kaukázusi populációra megállapítotthoz viszonyítva (2, 13). Más szerzők ezzel szemben részletes tanulmányukban colon- és emlőráksejt-vonalakon, valamint egér xenograftokon igazolták, hogy az MTHFR C677T polimorfizmus megnöveli az 5-FU-val szembeni érzékenységet (17).

Klinikai vizsgálatban a folát (LV) és 5-FU kombináció alkalmazása előrehaladott colorectalis tumoros betegek esetében növelte a válaszadók arányát a csak önállóan 5-FU-val kezeltével összehasonlítva (14). Más klinikai vizsgálatban III. stádiumú colontumoros betegek 5-FU + LV kezelése kapcsán nem szignifikáns, de jobb túlélést találtak a T alléllal hordozók esetében (19). Metasztatikus colorectalis tumoros betegek 5-FU-alapú kezelésre adott válaszában MTHFR genotípus szerinti kiértékelése eddig csak egy kis létszámú betegcsoport esetében történt meg. A 43 vizsgált beteg esetében jelentősen magasabb volt a jó eredménnyel kezelhetők részaránya a CT + TT genotípusú csoportban (3).

Jelen vizsgálatunk eredményei az eddigi tanulmányok eredményeinek túlnyomó többségét és kezdeti feltételezésünket megerősítik. Ezen túl figyelemre méltó az az eredmény, mely a hosszantartó, több vonalban alkalmazott 5-FU-alapú palliatív kezelést kapcsolatba hozza a jobb túléléssel ill. 2,5-ször kisebb relatív kockázattal, ami a legkifejezettebb a CT és TT genotípusú betegek esetén.

Következtetésként megállapítható, hogy az MTHFR C677T polimorfizmus meghatározása az 5-fluoropirimidin kezelésű metasztatikus colorectalis tumoros betegek esetében prognosztikai értékkel bír. Ezen felül segítséget nyújthat a személyre (csoportra) szabott terápia megtervezésére: pl. a rosszabb prognózisú CC genotípusú betegek esetében a szekvenciális kemoterápia (első vonalban 5-FU + LV, második vonalban 5-FU + LV + Irinotecan/oxaliplatin alkalmazása), vagy ha egyéb kontraindikáció nincs, az első vonalbeli 5-FU + LV + Irinotecan majd 5-FU + LV + oxaliplatin kombináció javasolható.

3. táblázat.
A Cox regressziós
analízis eredményei

Paraméterek	RR	95% CI	p
Kor (folyamatos változó)	0,9978	0,9694-1,0271	0,8813
Nem (férfi/nő)	0,7840	0,4151-1,4808	0,4533
Tumorlokizáció (rectum/colon+sigma)	0,4665	0,2302-0,9451	0,0343
Differenciáltsági fok (jóközepes/rossz)	0,5228	0,2271-1,2035	0,1274
Kezelési típus (csak első vonalbeli/több vonalbeli)	2,4720	1,2655-4,8290	0,0081
MTHFR (CC/CT+TT)	2,8399	1,4070-5,7322	0,0036

RR: relatív rizikó, CI: konfidenciaintervallum

Irodalom

- Carlsson G, Hafstrom LO, Spears CP, et al. 5-FU and 5,10-methylene tetrahydrofolate (5,10-CH₂FH₄) as adjuvant therapy in an experimental rodent colon carcinoma model. *Anticancer Res* 17:3671-3674, 1997
- Chen J, Ma J, Stampfer MJ, et al. Linkage disequilibrium between the 677C>T and 1298A>C polymorphisms in human methylenetetrahydrofolate reductase gene and their contributions to risk of colorectal cancer. *Pharmacogenetics* 12:339-342, 2002
- Cohen V, Panet-Raymond V, Sabbaghian N, et al. Methylenetetrahydrofolate reductase polymorphism in advanced colorectal cancer. *Clin Cancer Res* 9:1611-1615, 2003
- Czeizel E, Timár L, Botto L. A metiléntetrahydrofolát-reduktáz (MTHFR) gén polimorfizmusának (C677T) magyarországi gyakorisága. *Orvosi Hetilap* 142:1227-1229, 2001
- Etienne MC, Ilc K, Formento JL, et al. Thymidylate synthase and methylenetetrahydrofolate reductase gene

- polymorphisms: relationships with 5-fluorouracil sensitivity. *Br J Cancer* 90:526-534, 2004
6. Flieger D, Keller R, Fischbach W. A colorectalis carcinoma kezelési stratégiái. *Kommentár: Láng I. Orvostovábbképző Szemle* 6:67-76, 2004
 7. Frosst P, Blom HJ, Milos R, et al. A candidate genetic risk factor for vascular disease: a common mutation in methylenetetrahydrofolate reductase. *Nat Genet* 10:111-113, 1995
 8. Goyette P, Sumner JS, Milos R, et al. Human methylenetetrahydrofolate reductase: isolation of cDNA mapping and mutation identification. *Nat Genet* 7:195-200, 1994
 9. Kim YI. Folate and carcinogenesis: evidence, mechanisms and implications. *J Nutr Biochem* 10:66-88, 1999
 10. Kralovánszky J, Köves I, Orosz Z, et al. Prognostic significance of the thymidylate biosynthetic enzymes in human colorectal tumors. *Oncology* 62:167-174, 2002
 11. Kuhn JG. Fluorouracil and the new oral fluorinated pyrimidines. *Ann Pharmacother* 35:217-227, 2001
 12. Levine AJ, Siegmund KD, Ervin CM, et al. The methylenetetrahydrofolate reductase 677C→T polymorphism and distal colorectal adenoma risk. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 9:657-663, 2000
 13. Ogino S, Wilson RB. Genotype and haplotype distributions of MTHFR677C>T and 1298A>C single nucleotide polymorphisms: a meta-analysis. *J Hum Genet* 48:1-7, 2003
 14. Petrelli N, Herrera L, Rustum Y, et al. A prospective randomized trial of 5-FU versus 5-FU and high-dose leucovorin versus 5-FU and methotrexate in previously untreated patients with advanced colorectal carcinoma. *J Clin Oncol* 5:1559-1565, 1987
 15. Schwahn B, Rozen R. Polymorphism in the methylenetetrahydrofolate reductase gene: clinical consequences. *Am J Pharmacogenomics* 1:189-201, 2001
 16. Sekhon J, Pereira P, Sabbaghian N, et al. Antisense inhibition of methylenetetrahydrofolate reductase reduces survival of methionine-dependent colon carcinoma cells in vitro. *Br J Cancer* 87:225-230, 2002
 17. Sohn KJ, Croxford R, Yates Z, et al. Effect of the methylenetetrahydrofolate reductase C677T polymorphism on chemosensitivity of colon and breast cancer cells to 5-fluorouracil and methotrexate. *J Natl Cancer Inst* 96:134-144, 2004
 18. Ueland PM, Hustad S, Schneede J, et al. Biological and clinical implications of the MTHFR C677T polymorphism. *Trends Pharmacol Sci* 22:195-201, 2001
 19. Wisotzkey JD, Toman J, Bell T, et al. MTHFR (C677T) polymorphisms and stage III colon cancer: response to therapy. *Mol Diagn* 4:95-99, 1999