

Farmakogenetikai vizsgálatok a fluoropirimidint tartalmazó adjuváns kezelés hatékonyságának és toxicitásának előrejelzésére colorectalis daganatokban

Kralovánszky Judit, Adleff Vilmos, Hitre Erika, Pap Éva, Réti Andrea,
Komlósi Viktor, Budai Barna

Országos Onkológiai Intézet, Budapest

Az 5-fluorouracil (5-FU) citotoxikus hatását elsősorban a timidilátszintáz (TS) enzim gátlása biztosítja, ugyanakkor az 5-FU a dihidropirimidin-dehidrogenáz (DPD) útján lebomlik. Az 5-FU-kezelés hatékonyságát és biztonságát e két enzim aktivitása és az azokat befolyásoló farmakogenetikai tényezők határozzák meg. 5-FU-val kezelt colorectalis daganatos (CRC) betegek perifériás mononukleáris sejtekben 1.) meghatároztuk a DPD-aktivitás megoszlását, a DPD-hiány gyakoriságát és a DPD IVS14+1G>A pontmutáció előfordulását, és kapcsolatot kerestünk a DPD-csökkenés/hiány és az 5-FU-kezelés toxikus hatásai között; 2.) adjuváns 5-FU-kezelésben részesült CRC-s betegek esetében a TS génpolimorfizmusai, a DPD-aktivitás valamint a betegek tünetmentes- és teljes túlélése közötti összefüggést vizsgáltuk. A DPD-hiány gyakoriságának vizsgálatát 764 5-FU-val kezelt CRC-s beteg vérmintájából izolált perifériás mononukleáris sejtekben radioenzimológiai módszerrel határoztuk meg. A TS-génpolimorfizmusok és a DPD-szint összefüggését az 5-FU-alapú adjuváns kezelést követő túléléssel 166 CRC-s betegen vizsgáltuk. A génpolimorfizmusok meghatározását PCR + poliakrilamidgél-elektroforézissel (PCR-PAGE) és PCR-RFLP-PAGE (restriction fragment length polymorphism) módszerrel végeztük. Eredmények: 764 CRC-s beteg közül <10 pmol/perc/10⁶ limfocita DPD-érték 160 betegben (20,9%) fordult elő, ezek közül 38 betegben (4,9%) súlyos DPD-hiányt (5 pmol/perc/10⁶ limfocita alatti értéket) mértünk. Az utóbbi betegcsoportban súlyos (>Gr 3) toxicitás 87%-ban fordult elő. A DPD IVS14+1G>A mutáció a 38 súlyos DPD-hiányos beteg közül 3 esetben (7,8%) heterozigóta formában fordult elő, és mindhárom esetben Gr 4 toxicitással (neutropenia, mucositis, diarrhea) járt. A TS-génpolimorfizmusok összefüggést mutattak a túléléssel. Figyelemreméltó az 5'-TSER és a 3'-TSUTR 3-3 genotípusának kombinálásából keletkező 8 genotípus-kombináció eltérő lefutású túlélési görbéje, amelyek Cox regressziós analízis alapján két, prognosztikai különbséget mutató – „A” jó prognózisú (RR<1) és „B” rossz prognózisú (RR>1) – csoportba sorolhatók. E két csoport Kaplan-Meier-analízis szerinti betegségmentes- és teljes túlélése szignifikánsan eltérő. A DPD-aktivitás szintén szignifikáns összefüggést mutatott a túléléssel, a 10 pmol/perc/10⁶ limfocita alatti DPD-aktivitású betegek betegségmentes- és teljes túlélése szignifikánsan hosszabb volt, mint a magasabb aktivitásúaké. A DPD-aktivitás meghatározása jobb prognosztikai faktor az 5-FU által okozott súlyos toxicitás előrejelzésére, mint a IVS14+1G>A mutáció analízise. Cox multivariáns analízis szerint mind a TS-polimorfizmus-kombináció, mind a DPD-aktivitás a túlélés független prognosztikai faktora 5-FU-alapú adjuváns kezelés esetén. *Magyar Onkológia* 51:113–125, 2007

The cytotoxic effect of 5-fluorouracil (5-FU) is mediated by the inhibition of thymidylate synthase (TS), however, at the same time 5-FU is catabolized by dihydropyrimidine dehydrogenase (DPD). Efficacy of 5-FU may therefore depend on the TS and DPD activity and on pharmacogenetic factors influencing these enzymes. Our aims were 1) to determine the distribution of DPD activity, the frequency of DPD deficiency and the DPD (IVS14+1G>A) mutation in the peripheral blood mononuclear cells of colorectal cancer (CRC) patients, and study the relationship between DPD deficiency and toxicity of 5-FU; 2) to investigate the influence of TS polymorphisms and DPD activity on the survival of CRC

Közlésre érkezett: 2007. május 16.
Elfogadva: 2007. május 24.

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

A munka az NKFP 00024/2005 pályázat támogatásával készült.

patients receiving 5-FU-based adjuvant therapy. The frequency of DPD deficiency was determined by radiochemical methods in the peripheral blood mononuclear cells (PBMCs) of 764 CRC patients treated with 5-FU. The relationship between the TS polymorphisms, DPD activity and the disease-free- and overall survival was studied in 166 CRC patients receiving 5-FU-based adjuvant therapy. TS polymorphisms were determined in the DNA samples separated from the PBMCs, by PCR-PAGE and PCR-RFLP-PAGE (restriction fragment length polymorphism) methods. Low DPD values (<10 pmol/min/ 10^6 PBMCs) were demonstrated in 160/764 patients (20.9%), and of those DPD deficiency (<5 pmol/min/ 10^6 PBMCs) was verified in 38 patients (4.9%). In the latter group severe ($>Gr$ 3) toxicity was found in 87%. The prevalence of the DPD IVS14+1G>A mutation among the 38 DPD-deficient patients was 7.8% (3/38) and was accompanied by severe Gr 4 toxic symptoms (neutropenia, mucositis, diarrhea). TS polymorphisms showed a relationship with the survival of CRC patients. It is important to mention that by combining the 3-3 genotypes of 5'-TSER and 3'-TSUTR polymorphisms the obtained 8 genotype combinations showed significantly different Kaplan-Meier survival curves. The evaluation of these curves with Cox regression analysis resulted in two prognostically different groups: „A” good prognosis ($RR<1$) and „B” bad prognosis ($RR>1$). The disease-free- and overall survival of these two groups were significantly different. DPD activity also showed correlation with the survival; patients with DPD activity <10 pmol/min/ 10^6 PBMCs showed significantly longer disease-free- and overall survival. The determination of DPD activity proved to be a more valuable parameter in the evaluation of serious 5-FU-related toxicity compared to the IVS14+1G>A mutation analysis. According to the Cox multivariate analysis the combination of germline TS polymorphisms and DPD activity is/an independent prognostic marker of survival in CRC patients treated with adjuvant 5-FU therapy. Kralovánszky J, Adleff V, Hitre E, Pap É, Réti A, Komlósi V, Budai B. Pharmacogenetic studies on the prediction of efficacy and toxicity of fluoropyrimidine-based adjuvant therapy in colorectal cancer. *Hungarian Oncology* 51:113–12, 2007



Egyetemi tanulmányaim befejezése után jelentkeztem az Országos Onkológiai Intézet Belgyógyászati Osztályára, és felvételem után a Dr. Sellei Camilló és Dr. Eckhardt Sándor által vezetett Klinikai Kísérleti Laboratóriumban kerültem, ahol a hazai daganattelenes gyógyszerek klinikai farmakológiai vizsgálatai történtek. Talán ma már kevesen tudják, hogy a Degranol és a dibrómhexitok (Myelobromol és Elobromol) gyógyszerre fejlesztésének köszönhetően a magyar daganattelenes gyógyszerkutatás azokban az években az európai országokban is nagy figyelmet kapott. A vizsgálatok eredményeit, amelyekben volt szerencsém résztvenni igen neves európai szaklapok közölték. Eckhardt Professzor kutatási iránymutatása, amely már akkor az emberen, az emberért végzett vizsgálatokat helyezte középpontba – klinikai kísérleti kutatás –, a mai napig befolyásolta és segítette kutatói pályámat, amelyért hálás köszönettel tartozom.

Bevezetés

A colorectalis rák (CRC) Magyarországon mind a férfiak, mind a nők körében a második leggyakoribb halálokot jelenti, 2003-ban 2787 férfi és 2311 nő halt meg vastag- és végbéldaganatban (32). Ismeretes ugyanakkor, hogy az utóbbi öt évben az előrehaladott CRC-s betegek esetében a teljes túlélés közel kétszeresére emelkedett (38), amely elsősorban a klasszikus hatóanyagcsoport, az 5-fluoropirimidinek mellett e daganatok kezelésébe bevezetett új gyógyszerek – irinotecan, oxaliplatin, valamint az angiogenezist gátló bevacizumab és az epidermális növekedési faktor receptort gátló cetuximab – alkalmazásának köszönhető. A betegek esetében szignifikáns, egyének közötti különbség van az egyes gyógyszerekre adott válaszból és a velük szembeni toleranciában,

amelyet a nem, életkor, egyes szervek funkciói, a daganat patológiai stádiuma, differenciáltsága, molekuláris jellemzői, a metabolizmus cirkadián ritmusa mellett az egyes gyógyszerek farmakológiájában szerepet játszó genetikai tényezők is befolyásolnak. E genetikai tényezők, a DNS szekvencia variánsai, az ún. génpolimorfizmusok befolyásolhatják a gyógyszerek farmakokinetikáját (felszívódás, megoszlás, metabolizmus, elimináció) és farmakodinámiáját (molekuláris target, terápiás válasz, toxicitás, túlélés).

A csírasejtes (germline) génpolimorfizmusokat az egyes betegek normális szövetéből (fehérvérsejtek, szájnyálkahártya-sejtek és kontroll szöveti minták) izolált DNS-ből határozzák meg. Ismert, hogy a tumorokat igen nagyfokú génnestabilitás jellemzi, ugyanakkor a malignus sejtek a beteg normális sejtjeinek malignus transzformációja útján keletkeznek, az eredeti szövet számos genetikai tulajdonságát megtartva. Ez a tény adja a lehetőséget, hogy az egészséges szövetből izolált DNS-ből történő vizsgálatok prediktív hatásúak lehetnek a daganatos betegséggel kapcsolatban. Marsh és mtsai (29) 13 gén 28 polimorfizmusát hasonlították össze 44 CRC-s beteg normális colon-nyálkahártyájából és tumorszövetéből származó DNS-mintán. Az értékelhető 1139 összehasonlításból 13 esetben (1,1%) találtak eltérő genotípust a kétféle DNS-mintában. Ez a tény alátámasztja a csírasejtes DNS-mintákon történő génpolimorfizmus-vizsgálatok alkalmazhatóságát, ugyanakkor felhívja a figyelmet az ugyan igen ritkán előforduló, de lehetséges eltérő eredményre. Természetesen a tumorgenom is tartalmazhat ún. szomatikus mutációkat, kromoszómaátrendeződéseket, kromoszóma-vesztést, duplikációt, amelyek klinikailag fontos prediktív információt tar-

talmazhatnak, gondoljunk csak a nem kissejtes tüdőrákokban (NSCLC) alkalmazott epidermális növekedési faktor-receptor (EGFR) tirozinkináz doménjét gátló hatóanyagokra (gefitinib, erlotinib), amelyek esetében klinikai választ a szomatikus mutációkat tartalmazó EGFR esetében mutattak ki (30). A mutációkat csak a tumorszövetből származó mintákban mutatták ki, a megfelelő egészséges szövetben nem fordultak elő.

A csírasejtes polimorfizmusok legnagyobb többsége (>90%) ún. SNP (single nucleotid polymorphism), de előfordulnak még inszerciók/delécio, változó számú tandem ismétlődések, mikroszatelliták és hosszpolimorfizmusok. A humán genom szekvenciájának felismerésekor 1,42 millió SNP-t mutattak ki, amelyek közül néhány már bevezetést nyert az onkológiában a terápiás válasz, túlélés, tumorprogresszió és a mellékhatások előrejelzésére (37).

A colorectalis rákok gyógyszeres kezelésében még ma is a fluoropirimidin típusú hatóanyagok (5-fluorouracil, tegafur, capecitabin, S-1, UFT) jelentik a terápia sarokkövét. Monoterápia formájában alkalmazva az 5-fluorouracil (5-FU) kb. 20%-os válaszadást eredményez metasztatikus daganatok esetében, mintegy 12 hónapos medián túlélést eredményezve. Valamivel magasabb válaszadási arányt és hosszabb túlélést értek el, ha az 5-FU-t leukovorinnal együtt alkalmazták (31) vagy folyamatos infúzió formájában adagolták (9).

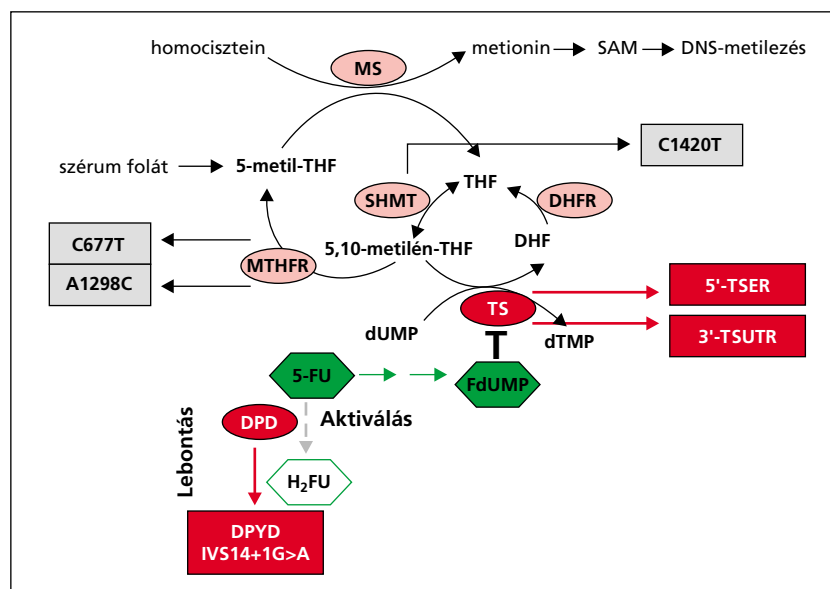
A fluoropirimidinek terápiás hatékonyságát különböző tényezők befolyásolják, elsősorban a vegyületek aktiválását és lebontását biztosító enzimek működése (23). A pirimidin- és folátanyagcsere-enzimek genetikai variabilitásának megismerése új megközelítést, a farmakogenetikai vizsgálatok bevezetését tette lehetővé e fontos anyagcsereutak és az őket befolyásoló gyógyszerek metabolizmusának és hatékonyságának tanulmányozásában. Az 5-FU hatékonysága szempontjából kiemelkedő szerepe van a vegyület legfontosabb molekuláris targetjének, a timidilátszintáznak (TS), valamint a lebontás sebességmeghatározó enzimének, a dihidropirimidin-dehidrogenáznak (DPD) (1. ábra).

Az 5-FU a szervezetbe kerülve azonnal anabolikus átalakuláson megy keresztül és több lépésben 5-fluor-2'-dezoxiuridin-monofoszfáttá (FdUMP) alakul át, amely a TS-hoz irreverzibilisen kötődve gátolja a pirimidin-bioszintézist és ezáltal a proliferációt. Kimutatták, hogy a tumor magas TS-szintje (mRNS-, fehérjeexpresszió, enzimaktivitás) rossz terápiás válasszal, rövidebb túléléssel jár elsősorban a metasztatikus daganatokban (17, 22). Ugyanakkor más vizsgálatokban, adjuváns kezelés esetén a magas TS-szint hosszabb betegségmentes- és teljes túlélést eredményezett (8, 21).

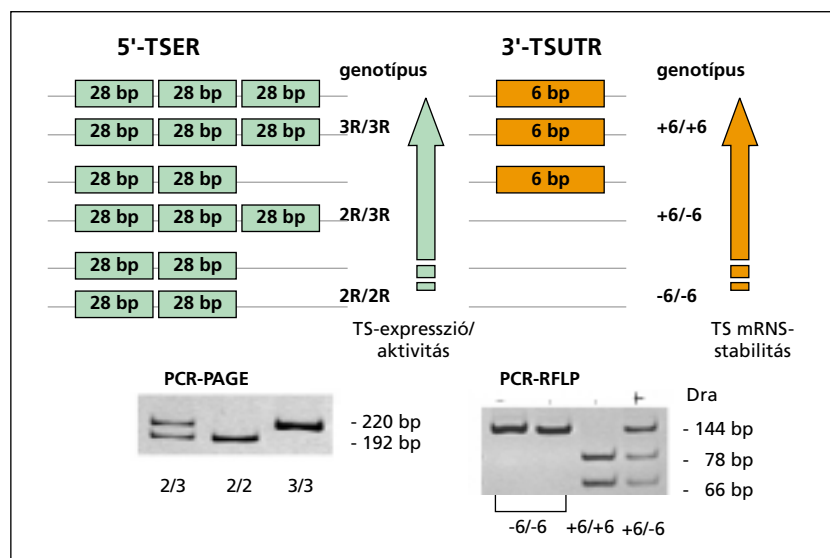
A TS génen (TYMS) előforduló néhány polimorfizmus befolyásolja a génexpressziót és az mRNS stabilitását, emiatt szerepük lehet az 5-FU-kezelés hatékonyságában. A TS gén promotor enhancer régiójában (5'-TSER) egy 28 bázispár hosszúságú tandem ismétlődés található, amely leggyakrabban 2 (2R) és 3 (3R) ismétlődéseket tartalmaz, és befolyásolja a TS gén transzlációs autoregulációját, emel-

lett a 3R/3R homozigóta genotípus a tumorban magasabb TS mRNS-expresszióval jár együtt, összehasonlítva a 2R/R genotípussal (38). Egy második, 6 bázispár inszerció/delécio polimorfizmus található a TS mRNS 3'-UTR régióban a TS 1494del6 locuson, amely a TS mRNS stabilitását befolyásolja. A +6/+6 (+/+) genotípus esetén az mRNS fokozott stabilitása szignifikánsan magasabb TS mRNS-expressziót eredményez összehasonlítva a -6/-6 (-/-) homozigótákkal (28) (2. ábra).

1. ábra. Az 5-fluoruracil metabolizmusában és hatásában szerepet játszó legfontosabb pirimidin- és folátanyagcsere-enzimek és génpolimorfizmusai (piros színnel jelölve a közleményben vizsgált enzimek és polimorfizmusai). Ovális háttérben: enzimek neve; MS: metioninszintáz; SHMT: szerin-hidroximetil-transzferáz; DHFR: dihidrofolát-reduktáz; MTHFR: metiléntetrahidrofolát-reduktáz; TS: timidilátszintáz; DPD: dihidropirimidin-dehidrogenáz. Szögletes háttérben az enzimekhez tartozó legfontosabb génpolimorfizmusok, metabolitok; SAM: S-adenozil-metionin; THF: tetrahidrofolát; DHF: dihidrofolát; dUMP: dezoxiuridin-monofoszfát; dTMP: deoxitimidin-monofoszfát. Hatszögletes háttérben; 5-FU: 5-fluoruracil; FdUMP: 5-fluor-dezoxiuridin-monofoszfát; H2FU: dihidro-5-fluoruracil



2. ábra. A timidilátszintáz (TS) gén polimorfizmusai



A vizsgálatok nagy többségében a TS-polimorfizmusokat a primer tumorból vagy a metasztázisból határozzák meg, ugyanakkor igen nagy előnyt jelenthet a vérből izolált sejtekből való genotipizálás, amely nem invazív és gyorsan elvégezhető módszer.

Bár az 5-FU hatékonyságát nagymértékben az aktiválás és az azt követő TS-gátlás határozza meg, szignifikáns szerepet játszik a hatás kialakulásában a vegyület igen gyors lebontása a dihidropirimidin-dehidrogenáz (DPD) enzim útján, ami az 5-FU-szint mintegy 80%-os csökkenését eredményezi a kezelés utáni első 30 percben, ezáltal meghatározva az aktiválás számára rendelkezésre álló 5-FU szintjét (24). A DPD-t számos szövetszövetben kimutatták, de a legmagasabb aktivitás a májban található, amely a pirimidinek, így az 5-FU lebontásában is fontos szerepet játszik. A vér mononukleáris sejtjeinek (PBMC) DPD-aktivitása igen jó korrelációt mutat a máj aktivitásával, ezért rutinszerűen felhasználható a teljes test DPD-aktivitásának helyettesítő („surrogate”) markereként (6). Kimutatták, hogy a DPD-aktivitás fordítottan arányos az 5-FU plazmakoncentrációjával folyamatos infúziós kezelés során (14).

Rágcsálókban megállapították, hogy a DPD mRNS-expressziója és aktivitása cirkadián ritmust mutat. Humán vizsgálatokban egészséges egyénekben és daganatos betegekben egyes esetekben ugyan kimutattak cirkadián ritmust, azonban ez különbségeket mutatott az egyes egyének között (34). Számos munkacsoport igazolta, hogy az alacsony DPD-aktivitás fontos rizikófaktor az 5-FU-toxicitás kialakulása szempontjából (6, 17). Az alacsony DPD-aktivitás küszöbértéke a normális populáció átlagértékének 70%-a. Ezt a küszöbértéket véve figyelembe, a normális populáció 10-14%-a rizikócsoportnak tekinthető egy esetleges 5-FU-kezelés esetén, a súlyos toxicitás kialakulása szempontjából.

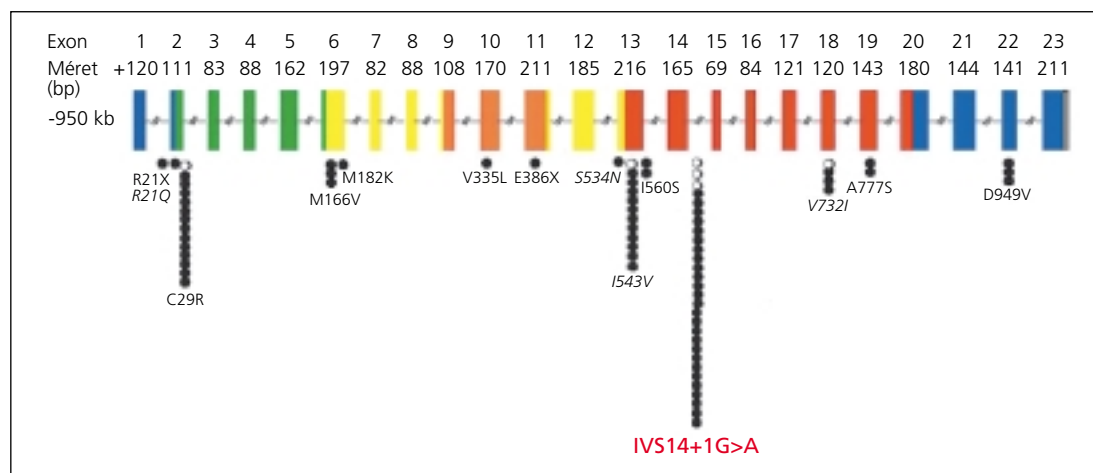
A humán DPD gén (DPYD) az 1p22 kromoszómán található, 23 exonból áll. A géntérkép

szerint legalább 950 kb hosszúságú, 3 kb hosszú kódoló szekvenciát tartalmaz, az átlagos intronméret 43 kb (45). A DPD génen 39 különböző mutációt és polimorfizmust írtak le, amelyek nagy többségét veleszületett, komplett DPD-hiányos egyénekben ismerték fel. Ezeket a mutációkat a legkülönbözőbb klinikai tünetek (neurológiai tünetek, autizmus, hypertonia, hyperreflexia, stb.) kísérték. A mutációk a kódoló régióban nem egyenletesen oszlanak el a 23 exonon, 81% a 2-14-es exonon található. Számos mutáns DPD allélról számoltak be 5-FU-adagolást követő súlyos toxicitás esetén, ilyen betegekben 14 mutációt írtak le: 1 splice site (IVS14+1G>A), 2 nonsense (R21X, E386X), 6 missense mutációt (M166V, M182K, V335L, I560S, A777S, D949V) és 5 polimorfizmust (C29R, R21Q, S543N, I543V, V732I) (44) (3. ábra).

A leggyakrabban előforduló, a 14. exonon található G>A pontmutáció (IVS14+1G>A) a 14. exon kieséséhez vezet a DPD pre-mRNS splicing során. Ennek eredményeképpen az mRNS-ből egy 165 nukleotid hosszúságú szegmens hiányzik, amely az 581-635. aminosavakat kódolja, így sérült, nem funkcionáló fehérje szintetizálódik (44). A G>A pontmutáció gyakoriságát 7 populációban megvizsgálva azt találták, hogy magas allélfrekvencia mutatható ki a holland, német, finn, török és taiwani népességekben, míg a mutáció nem volt kimutatható a japán és afro-amerikai egyénekben (44). 5-fluorouracil-toxicitásban szenvedő betegeken a DPD gén különböző mutációi közül a 14. exonon található G>A pontmutáció előfordulása a leggyakoribb, amely már heterozigóta formában jelentős DPD-csökkenést, homozigóta formában teljes DPD-hiányt okoz, ami 5-FU-kezelés során súlyos, esetleg halálos toxicitáshoz vezet.

Az alacsony DPD-aktivitás az 5-FU-kezelést követően kialakuló toxicitás fontos prediktív markere, ugyanakkor a magas DPD-szint következményeként az 5-FU fokozott lebontása, a ke-

3. ábra. Súlyos 5-FU-toxicitásban szenvedő betegeken a DPYD génen előforduló 14 mutáció illetve polimorfizmus. Az egyes szimbólumok egy-egy beteget jelentenek, akik homozigóták (●) illetve heterozigóták (◐) az adott mutációra nézve. A leggyakrabban előforduló mutáció a 14. exonon található IVS14+1G>A pontmutáció van. (Kuilenburg ABP: Eur J Cancer 40: 939-950, 2004 (44); az Elsevier Kiadó szíves engedélyével)



zelés csökkent eredményességének vagy eredménytelenségének előrejelzője lehet. Sejtvonalaikon és humán tumorxenograftokon egyértelmű fordított korrelációt mutattak ki a DPD-aktivitás és az 5-FU-érzékenység között (3). Az emberi colorectalis tumorszövetből meghatározott DPD mRNS-expresszió/fehérje/enzimaktivitás és az 5-FU-kezelés eredményessége között a vizsgálatok csak mintegy 50%-ában találtak összefüggést a tumor DPD-szintje és az 5-FU hatékonysága között (44). Érdemes megemlíteni, hogy a tumor és normális szövet DPD mRNS-expresszióját/aktivitását összehasonlítva a tumorban alacsonyabb DPD-szintet találtak, mint a normális mucosában, és feltehetően ez is közrejátszik, hogy nem találtak egyértelmű összefüggést a tumorban mért DPD-szint és a kezelés eredményessége között (40).

Vizsgálataink célja: Az 1. ábrán kiemelten feltüntetett DPD és TS enzimek, valamint mutációjuk/polimorfizmusaik szerepét vizsgálni az adjuváns, 5-FU-t tartalmazó kezelés hatékonyságában és a toxikus mellékhatások kialakulásában. Tanulmányoztuk a DPD-aktivitás megoszlását a CRC-s betegek perifériás mononukleáris sejtjeiben, és összefüggést kerestünk a DPD-csökkenés/hiány és az 5-FU-kezelés toxikus hatásai között. Vizsgáltuk a DPD IVS14+1G>A mutáció előfordulási gyakoriságát az alacsony DPD-aktivitású betegekben. Adjuváns 5-FU-kezelésben részesült CRC-s betegek esetében összefüggést kerestünk a TS-génpolimorfizmusok, a DPD-aktivitás, valamint a betegek tünetmentes és teljes túlélése között.

Vizsgálati anyagok és módszerek

Betegek

A DPD-aktivitás/mutáció megoszlásának tanulmányozása céljából az enzim meghatározását 2001. január és 2003. november között osztályunkra érkezett olyan CRC diagnózisú betegek

esetében végeztük el, akik az Országos Onkológiai Intézetben (néhány esetben más kórház vagy klinika onkológiai osztályán) adjuváns vagy palliatív 5-FU-alapú kezelésre kerültek. A 764 vizsgált beteg közül 93 beteg esetében (akiknél a DPD-aktivitás 10,0 pmol/perc/10⁶ limfocita érték alatt volt) vizsgálat történt a DPD IVS14+1G>A mutáció meghatározására is.

A timidilátszintáz 5'-TSER és 3'-TSUTR polimorfizmusok és a DPD-aktivitás valamint az 5-FU-kezelés eredményességének meghatározása 1966, 1995. május és 2004. június között adjuváns kezelésben részesült Dukes B2 és C stádiumú CRC-s beteg esetében történt. A betegek 5-FU-alapú kezelésben részesültek bolus 5-FU-kezelés (Mayo protokoll) vagy bolus + folyamatos infúziós kezelés (De Gramont protokoll) illetve folyamatos infúziós kezelés (CiFU) formájában. A rectum-tumoros betegek műtét előtt sugárkezelést kaptak. A vizsgálatok végzését az Országos Onkológiai Intézet Etikai Bizottsága (IEB) írásban engedélyezte. A betegek klinikai-patológiai jellemzők szerinti megoszlását az 1. táblázat szemlélteti.

Módszerek

Perifériás mononukleáris sejtek (limfociták) szeparálása: A betegektől levett 10 ml (15% EDTA) alvadésgátlót tartalmazó vérmintából Ficoll-gradiensén történt a perifériás mononukleáris sejtek szeparálása. A sejtszámot Bürker-kamrában történt számolással határoztuk meg és a sejteket további feldolgozásig folyékony nitrogénben tároltuk.

DPD radioenzimológiai meghatározása: A sejtek feltárása folyékony nitrogénben történő fagyasztással és 25°C-on való felolvasztással (3x30 sec) történt. A feltárt sejteket 30 percig ultracentrifugáltuk 20 000 g-n. A DPD enzim meghatározását a citoszolból végeztük, míg az üledéket feleretettük a polimorfizmus és mutáció vizsgálatához történő DNS-szeparálás céljára.

Az enzimvizsgálat az általunk korábbiakban leírt módszer módosítása alapján történt (18). A citoszolt 6-[¹⁴C]-5-FU-t (26,5 µM), NADPH-t (12 µM), MgCl₂-t (6,5 mM), és nikotinamidot (1 mM) tartalmazó nátriumfoszfát-pufferben (pH=8,0) 37 °C-on inkubáltuk 0 illetve 20 percig. Az inkubáció befejezése után a reakciót jéghideg 96%-os etanollal állítottuk le, és a minták 0,2 µm pórusméretű Vecta Spin mikrocentrifuga szűrőn történő leszűrése után a DPD enzim hatására keletkezett katabolizot [¹⁴C]-H₂5-FU-t (dihidro-5-fluorouracil) és az eredeti [¹⁴C]-5-FU-t folyadékkromatográfiás (HPLC) módszerrel választottuk szét. A detektálás on-line radiokémiai detektorral történt. A DPD értékét a 10⁶ limfocitából keletkezett H₂5-FU mennyiségében adtuk meg pmol/perc/10⁶ limfocita egységben.

Farmakogenetikai módszerek

DNS-szeparálás: A DNS-szeparálás az ultracentrifugálás után nyert üledékből történt MasterPure DNS-tisztító kit segítségével (Episentre Technologies, Madison, WI, USA) az előállító által megadott módszer szerint.

1. táblázat.
A vizsgált betegek száma, klinikai és patológiai jellemzői

	n	%
Összes beteg	166	100
Nem		
Férfi	91	55
Nő	75	45
Kor		
<58	84	51
≥58	82	49
Lokalizáció		
Rectum	82	49
Colon	84	51
Dukes-stádium		
B2	46	28
C	120	72
Differenciáció (grade)		
1/2	145	87
3	21	13
Kezelés típusa		
Bolus	70	42
Infúziós	96	58

A *DPD IVS14+1G>A* mutációt a van Kuilenburg és mtsai által leírt módszer (43) szerint határoztuk meg. A 14-es exon-szélét magába foglaló gén régiót PCR-rel amplifikáltuk. A felhasznált primer pár: 5'-ATCAGGACATTGTGACATATGTTTC-3' (szenz) és 5'-CTTGTTTTAG-ATGTTAAATCACACATA-3' (antiszenz) volt. A primerek a kiemelt helyen NdeI restrikciós enzim-hasítóhelyet képeznek a PCR-terméken egy allélfüggő ill. egy allél-független szakaszon. Így módon a NdeI-RFLP (restriction fragment length polymorphism) vizsgálat nemcsak az allél-diszkriminációt teszi lehetővé, hanem egy belső emésztési kontrollal is rendelkezik.

Az RFLP vizsgálat alapján a 198 bp méretű PCR-termékből a 181 bp hosszúságúvá való átalakulás a teljes emésztés kontrollját, a 154 bp fragmentum megjelenése pedig a mutáns allél jelenlétét igazolja.

5'TSER polimorfizmus: a meghatározást a Kawakami és mtsai (19) által leírt módszer szerint végeztük a következő primereket alkalmazva: (szenz) 5'-GTGGCTCCTGCGTTTCCCCC-3', (antiszenz) 5'-TCCGAGCCGCCACAGGCAT-3'. A PCR-termékeket nem denaturáló PAG-elektroforézissel analizáltuk 10%-os gélen. A 28 bázispár differencia a 2R (192 bp) és 3R (220 bp) allélek között a gélen jól megkülönböztethető.

3'-TSUTR polimorfizmus: a meghatározást PCR amplifikációt követő RFLP-vel végeztük az Ulrich és mtsai (41) által leírt módszer szerint a következő primereket alkalmazva: (szenz) 5'-CAAATCTGAGGGAGCTGAGT-3', (antiszenz) 5'-CAGATAAGTGGCAGTACAGA-3'. A PCR-terméket DraI restrikciós enzimmel emésztettük 1 órán át, majd 10%-os nem denaturáló PAG-elektroforézissel szeparáltuk. A standard protokoll, a PCR összetétele és körülményei korábbi vizsgálatainknak megfelelőek voltak (1).

Statistikai módszerek

A vizsgált paramétereket, mint a túlélés lehetséges prediktív faktorait univariáns módszerrel analizáltuk. A túlélést Kaplan-Meier-módszerrel vizsgáltuk, a túlélési görbék összehasonlítására log-rank-tesztet alkalmaztunk. Univariáns és multivariáns Cox regressziós analízist alkalmaztunk a relatív rizikó (RR) és a 95%-os konfidenciaintervallum meghatározására. A multivariáns Cox regressziós analízist a „hierarchical forward with switching” modell alapján végeztük. A számításokhoz NCSS Kaysville, UT., USA) számítógépes programot alkalmaztunk.

Eredmények

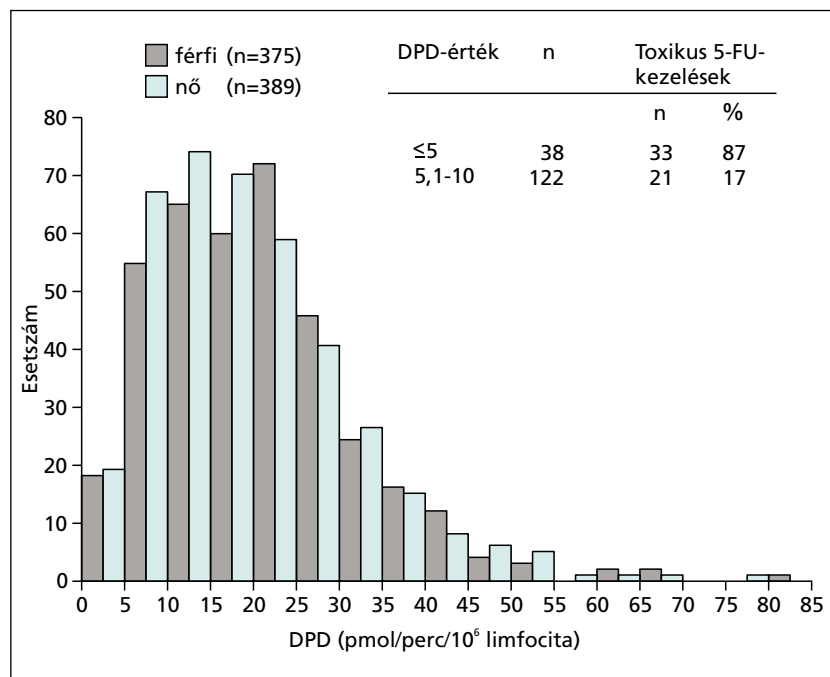
DPD-aktivitásértékek megoszlása CRC-s betegeken és a *DPD IVS14+1G>A* mutáció előfordulási gyakorisága

A 764 CRC-s beteg DPD-aktivitásértékének megoszlása normál Gauss-eloszlást mutat, nem nagy számban, de előfordul igen magas DPD-értékekkel. Alacsony (≤ 10 pmol/perc/ 10^6 limfocita)

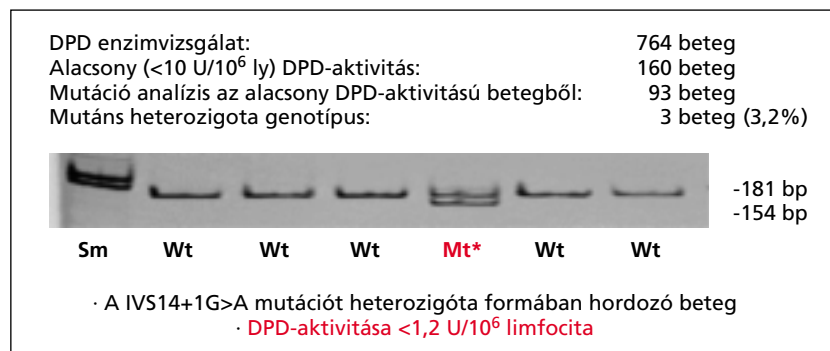
DPD-érték 160 beteg esetében (20,9%) fordult elő, és ezek közül 38 betegben (4,9%) súlyos DPD-hiányt, 5 pmol/perc/ 10^6 limfocita alatti értéket mérünk. Az utóbbi betegcsoportban 87%-ban fordultak elő toxikus 5-FU-kezelések, amelyek Gr 3-4 neutropeniával, mucositiszsel, hasmenéssel jártak együtt. Az 5-10 pmol/perc/ 10^6 limfocita érték közötti csoportban csak 17%-ban fordult elő súlyosabb ($> \text{Gr } 2$) toxicitás (4. ábra).

A *DPD IVS14+1G>A* mutációt a <10 pmol/perc/ 10^6 limfocita enzimaktivitású csoport betegei közül 93 esetben határoztuk meg, és 3 betegben mutattuk ki heterozigóta formában, ami a 38 súlyos DPD-hiányos (<5 pmol/perc/ 10^6 limfocita) beteget véve figyelembe 7,8%-os gyakoriságot jelent. Ezekben a betegekben igen súlyos, gyakran halmozott toxicitás, Gr 3-4 neutropenia vagy pancytopenia, Gr 3-4 mucositis, hasmenés (egy esetben véres hasmenés) fordult elő. A toxikus állapot rendezése csontvelő-stimuláló faktor és széles spektrumú antibiotikum adásával sikerült. A további kezelések során ezek a betegek nem kaptak 5-FU-t tartalmazó gyógyszerkombinációt (5. ábra).

4. ábra. DPD-aktivitásértékek megoszlása 764 colorectalis daganatban szenvedő beteg limfocitáiban. Az alacsony DPD-értékek és a toxikus 5-FU-kezelések (Gr 3-4 neutropenia, mucositis, hasmenés) gyakoriságát a táblázat szemlélteti.



5. ábra. A *DPD IVS14+1G>A* mutáció analízise 93 (≤ 10 pmol/perc/ 10^6 limfocita) DPD-aktivitású colorectalis daganatos betegen. Sm: molekulatömeg-marker; Wt: vad típus; Mt: mutáns heterozigóta genotípus



A timidilátszintáz-génpolimorfizmusok összefüggése az 5-FU-alapú adjuváns kezelésben részesült betegek túlélésével

A vizsgálatba 166 beteget vontunk be, a medián követési idő 19 ± 14 hónap volt. A 5'-TSER és 3'-TSUTR polimorfizmusok megoszlását a betegek klinikai és patológiai jellemzői (nem, életkor, Dukés-stádium, differenciáció, tumorlokalizáció, kezelés típusa) szerint összehasonlítva szignifikáns különbséget egyedül a 3'-TSUTR genotípusok megoszlásában találtunk a nemek között, ahol a -6/-6 (-/-) genotípus előfordulása a férfiakban magasabb, 14%, míg a nőkben csak 3% volt ($p=0,035$).

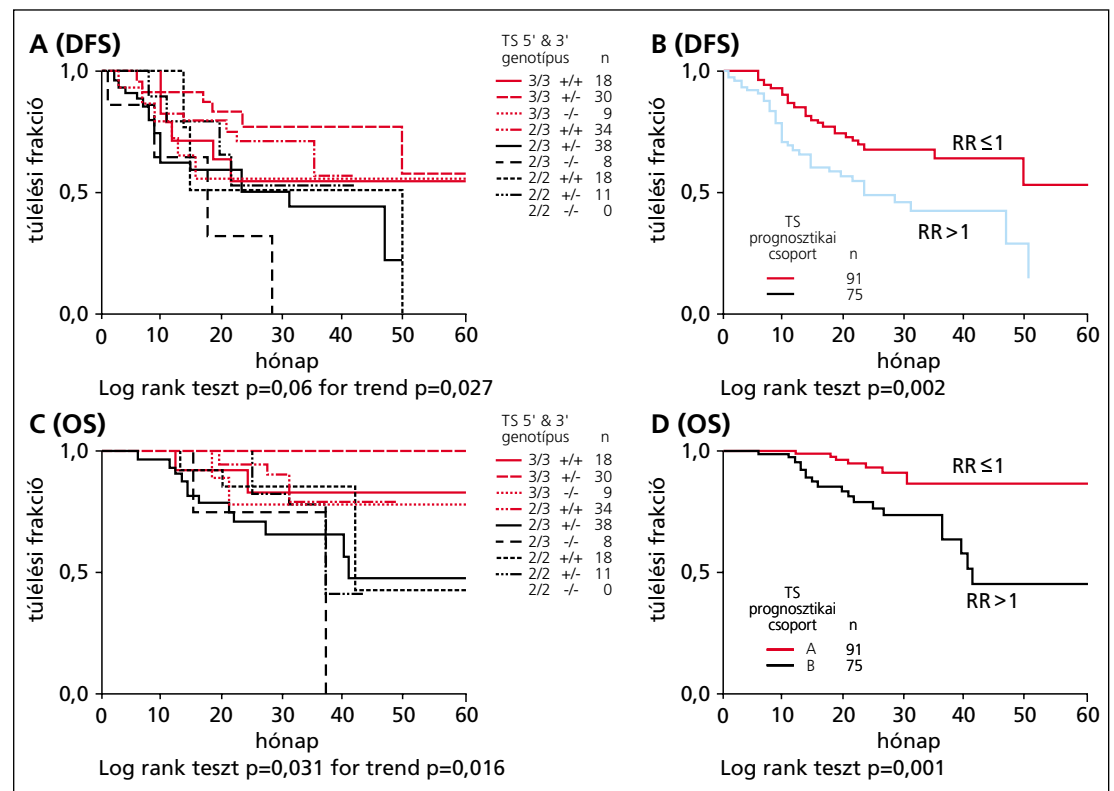
A követési idő alatt (19 ± 14 hónap) 58 beteg (34,9%) esetében alakult ki relapszus (11 lokális recidíva és 47 távoli metasztázis). A betegségmentes- (DFS) és teljes túlélés (OS) összefüggését klinikai patológiai paraméterekkel, valamint a TS-polimorfizmusokkal univariáns Cox regressziós analízissel a relatív rizikó (RR) és 95% konfidenciaintervallum (95% CI) számítása alapján vizsgáltuk. A klinikai patológiai paraméterek nem befolyásolták szignifikánsan a túlélést, kivéve a kezelés típusa, mely esetében a folyamatos infúziós kezelésben részesülő betegeknél szignifikánsan hosszabb betegségmentes túlélést ($p=0,036$) tapasztaltunk a bolus kezeléssel összehasonlítva. A TS-polimorfizmusok esetében megállapítottuk, hogy az 5'-TSER 2R

allél jelenléte heterozigóta vagy homozigóta (2R/3R vagy 2R/2R) formában szignifikánsan rövidebb betegségmentes- ($p=0,048$) és teljes túlélést ($p=0,009$) eredményezett a 3R/3R homozigóta betegekéhez képest. Bár a 3'-TSUTR genotípusok nem mutattak szignifikáns összefüggést sem a betegségmentes-, sem a teljes túléléssel, a -6/-6 homozigóták esetében a relatív rizikó magasabb volt, mint azokban a betegekben, akik legalább egy +6 allélt tartalmaztak (RR=1 vs. 0,67 és 1 vs. 0,68) (a részletes adatokat nem mutatjuk).

Figyelembe véve, hogy mindkét polimorfizmus esetében találtunk jobb és kevésbé jó prognózist jelző genotípusokat, érdemesnek látszott a két polimorfizmus kombinációját összehasonlítani a túlélésekkel. Feltételezve, hogy minden 5'-TSER genotípus kombinálódhat minden 3'-TSER genotípussal, elméletileg 9 kombináció lehetséges, amelyek közül betegeink esetében 8 fordult elő (2/2 & -6/-6 kombinációt nem találtunk). Ezeket a genotípus-kombinációkat a 6. A és C ábrákon tüntettük fel.

A betegségmentes túlélést vizsgálva (6.A ábra) hosszabb betegségmentes túlélést találtunk az összes 3R/3R genotípust tartalmazó kombináció és a 2R/3R heterozigóták közül a +6/+6 genotípussal való kombináció esetében. A többi négy, 2R/3R heterozigóta és 2R/2R homozigóta genotípust tartalmazó kombináció esetében rövidebb túlélést találtunk. A log-rank-teszt szerint szigni-

6. ábra. Összefüggés a 166, 5-FU-tartalmú adjuváns kezelésben részesült CRC-s beteg betegségmentes- és teljes túlélése, valamint az 5'-TSER- és 3'-TSUTR genotípus-kombinációk között. A, C: a 8 előfordult genotípus-kombinációhoz tartozó betegek Kaplan-Meier-analízis szerinti betegségmentes- (DFS) és teljes túlélése (OS). B, D: A túlélés univariáns Cox regressziós analízise alapján a 8 genotípus-kombinációhoz tartozó betegeket két csoportba osztottuk: „A” (jó prognózis): relatív rizikó (RR) ≤ 1 , „B” (rosszabb prognózisú): RR > 1



fikáns trend ($p=0,027$) mutatkozott a 8 kombináció túlélésre gyakorolt hatásában. Hasonló eredményeket kaptunk a teljes túlélés értékelésekor is (trend $p=0,016$) (6.C ábra). Abból a célból, hogy a nyolc túlélési görbe értékelését megkönnyítsük, a nyolc genotípus-kombinációval jellemezhető betegek betegségmentes túlélése esetén a relapszusrizikót univariáns Cox regressziós analízissel értékeltük, melynek alapján azokat a kombinációkat, ahol a relatív rizikó értéke (RR) ≤ 1 volt, a jó prognózisú („A”) csoportba, míg azokat, ahol az RR >1 volt, a rosszabb prognózisú („B”) csoportba osztottuk. Az „A” és „B” csoport Kaplan-Meier túlélési analízise két szignifikánsan eltérő prognosztikai csoportot eredményezett. A log-rank-teszt eredménye betegségmentes túlélés esetén $p=0,002$, a teljes túlélés esetén $p=0,001$ volt (6.B,D ábra).

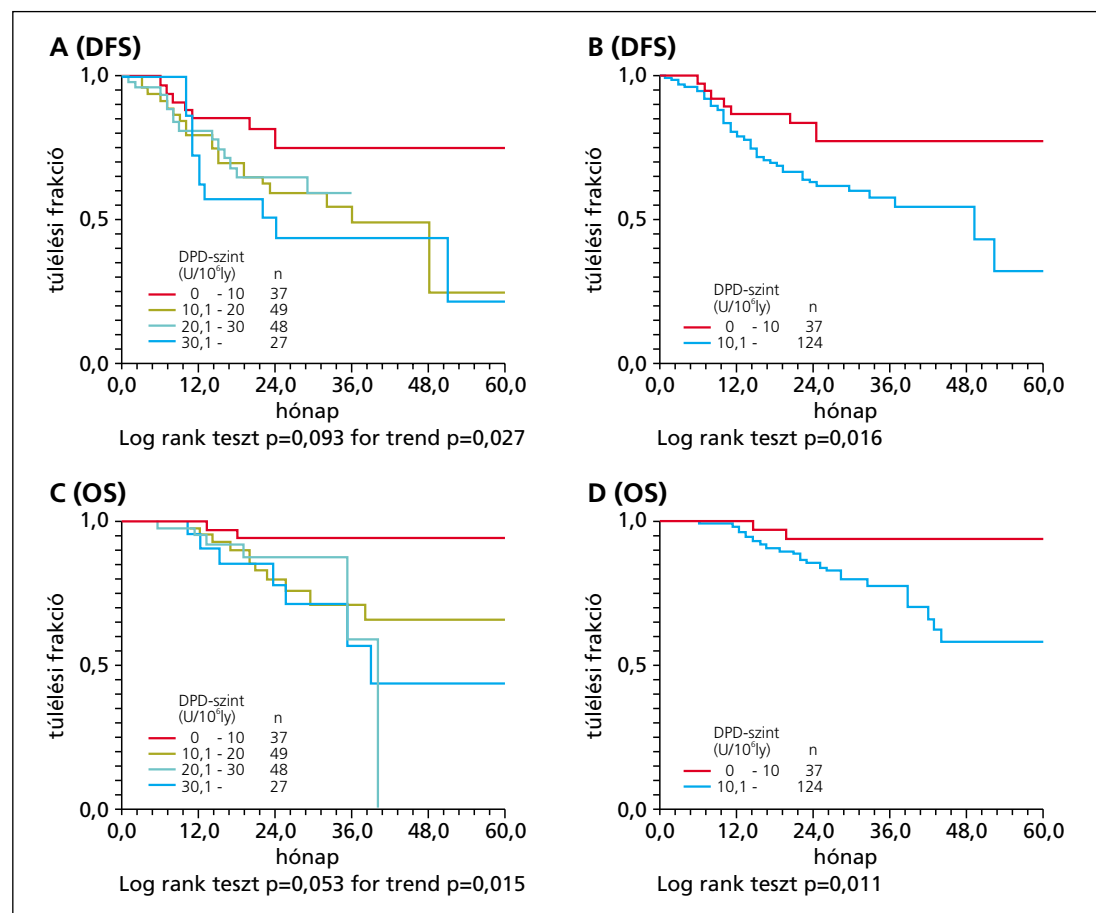
Összefüggés a dihidropirimidin-dehidrogenáz-aktivitás és az 5-FU-alapú adjuváns kezelésben részesült betegek túlélése között

A 166 adjuváns kezelésben részesült beteg közül 161 beteg esetében határoztuk meg a DPD-aktivitást. Elemeztük a DPD-értékek és a betegek klinikai-patológiai tulajdonságai, valamint a DPD-értékek és a TS-polimorfizmusok közötti lehetséges összefüggéseket. Nem találtunk szignifikáns különbséget a nem, életkor, tumorlokalizáció, Dukes-stádium és a kezelés típusa szerint csoportosított betegek esetén a DPD-átlagértékekben, ugyanakkor a differenciáltság szerint történő cso-

2. táblázat. A dihidropirimidin-dehidrogenáz-aktivitás összefüggése a klinikai és patológiai paraméterekkel, valamint a TS-polimorfizmusokkal

	n	átlag	SD	SE	p
Nem					
Férfi	87	21,7	10,4	1,1	NS
Nő	74	19,0	11,7	1,4	
Kor					
<58	81	21,2	12,4	1,4	NS
≥58	80	19,7	9,7	1,1	
Lokalizáció					
Rectum	79	22,2	12,0	1,3	NS
Colon	82	18,8	10,0	1,1	
Dukes stádium					
B2	45	22,2	11,7	1,7	NS
C	116	19,8	10,0	1,0	
Differenciáció (grade)					p=0,003*
1/2	140	21,1	11,5	1,0	
3	21	16,9	7,8	1,6	
Kezelés típusa					
Bolus	68	20,7	10,7	1,3	NS
Infúziós	93	20,2	11,5	1,2	
5'-TSER					p=0,053
2R/2R	28	24,7	13,2	2,5	
2R/3R	77	20,3	11,6	1,3	
3R/3R	56	18,5	8,8	1,2	
3'-TSUTR					NS
0bp/0bp	17	23,3	9,7	2,4	
6bp/0bp	77	19,3	10,8	1,2	
6bp/6bp	67	21,0	11,8	1,4	

* Welch-corrected, unpaired t-test



7. ábra. Összefüggés a 161, 5-FU-tartalmú adjuváns kezelésben részesült CRC-s beteg betegségmentes- és teljes túlélése valamint a limfocitákban mért DPD-aktivitás között. A DPD-aktivitás alapján a betegeket 4 csoportra osztottuk: [1] 0-10; [2] 10,1-20; [3] 20,1-30; [4] $>30,1$ pmol/perc/ 10^6 limfocita. A, C: a 4 csoport Kaplan-Meier-analízis szerinti betegségmentes (DFS) és teljes túlélése (OS). A négy görbére elvégzett log-rank-teszt alapján a továbbiakban a betegeket két csoportba osztottuk ([1] 0-10 és [2] $>10,1$ pmol/perc/ 10^6 limfocita); betegségmentes- (B) és teljes túlélés (D). (Az ábrán a rövidítés kedvéért a DPD-értékeket az alábbi egységben adtuk meg: U/ 10^6 limfocita = pmol/perc/ 10^6 limfocita)

portosításkor a rosszul differenciált (Gr 3) tumoros betegek esetében szignifikánsan alacsonyabb DPD-értékeket találtunk a Gr 1-2 tumoros betegekhez képest ($p=0,003$). Nem volt szignifikáns összefüggés a TS-génpolimorfizmusok és a DPD-aktivitás között sem, bár az 5'-TSEER polimorfizmusok esetén a 3R/3R homozigótáktól a 2R/2R homozigóták irányába csökkenő DPD-aktivitás mutatható ki, amely megközelítette a szignifikancia határértékét ($p=0,053$) (2. táblázat).

A betegeket emelkedő DPD-aktivitás alapján 4 csoportra osztottuk: [1] 0-10; [2] 10,1-20; [3] 20,1-30; [4] $>30,1$ pmol/perc/ 10^6 limfocita. A 4 különböző DPD-aktivitású csoport Kaplan-Meier-analízis szerinti betegségmentes- (7.A ábra) és teljes túlélését (7.C ábra) ábrázolva megállapítható, hogy a túlélési görbék fordított összefüggést mutattak az emelkedő DPD-értékekkel (DFS trend $p=0,027$; OS trend $p=0,015$). Az egyes görbék összehasonlítása log-rank-teszttel azt mutatta, hogy mind a DFS, mind az OS esetében az 1. csoport (DPD ≤ 10 pmol/perc/ 10^6 limfocita) szignifikánsan különbözött az összevont 2+3+4 csoporttól (DFS $p=0,0162$; OS $p=0,0107$). Ennek az eredménynek az alapján a továbbiakban a betegeket két csoportba osztottuk ([1] DPD 0-10 és [2] DPD $>10,1$ pmol/perc/ 10^6 limfocita), és elvégeztük a Kaplan-Meier túlélési analízist a betegségmentes- (7.B ábra) és a teljes (7.D ábra) túlélésre, amely mindkét esetben szignifikáns különbséget mutatott a két túlélési görbe között ($p=0,016$ és $p=0,011$).

A multivariáns Cox regressziós analízis eredménye szerint mind a betegségmentes, mind a

teljes túlélés esetében a Dukes-stádium, tumorlokalizáció és a kezelés típusa mellett a TS-polimorfizmus-kombináció és a DPD-aktivitás független prognosztikai faktornak bizonyult (3. táblázat).

Megbeszélés

Az öröklött genetikai különbségek befolyásolhatják az egyének gyógyszerekkel szembeni érzékenységét. A farmakogenetika célja ennek az ismeretanyagnak az alkalmazása a gyógyszeres kezelés egyénre tervezésében, ugyanis a farmakogenetikai vizsgálatok egyik legfontosabb alkalmazási területe a gyógyszeres kezelést megelőzően annak a valószínűségnek a megállapítása, hogy egy adott beteg esetében egy specifikus gyógyszer/gyógyszer-kombináció hatékony lesz-e és milyen súlyos mellékhatásokkal jár majd a kezelés. Különösen fontos a farmakogenetikai paraméterek ismerete és alkalmazása a daganatellenes gyógyszeres kezelés során, hiszen jól ismert, hogy ezeknek a hatóanyagoknak igen szűk a terápiás indexe. Bár a farmakogenetika egy viszonylag fiatal tudományág, egyes gyógyszerek esetében eredményeit már az FDA, az amerikai gyógyszerengedélyezési hatóság is elfogadta, és a gyógyszerek alkalmazási előírataiban felhívják a klinikusok figyelmét a lehetséges prediktív genetikai tesztre. Ennek megfelelően pl. a mercaptopurine, azathioprine esetében a thiopurin-metiltranszferáz TPMT*2, TPMT*3A és TPMT*3C polimorfizmusok, az irinotecan esetében az UGT1A1*28 polimorfizmus javasolt meghatározása segíti a súlyos toxicitással járó esetek kiszűrését.

Mind a tumor, mind a normális szövetek génpolimorfizmusai befolyásolják a gyógyszerek hatását, azonban, ahogyan azt a bevezetésben már említettük, egy adott beteg esetében ezek több mint 98%-ban megegyeznek. Ez ad lehetőséget a normális szövetekből (perifériás mononukleáris sejtek, szájnyalkahártya-sejtek) történő génpolimorfizmus-meghatározásokra, amely könnyű, gyors, nem invazív módszer. A szomatikus mutációk, kromoszómavesztés vagy -amplifikációk kialakulásával ugyanakkor számolni kell, amelyek bár ritkán, de eltérő tumorgenotípust okozhatnak.

Az 5-fluorouracil a CRC-k bázisgyógyszere, amely alkalmazása során fontos metabolikus változásokon (lebontás, aktiválás) megy keresztül ahhoz, hogy daganatellenes hatását kifejtse. Az aktiválást és lebontást katalizáló enzimek és az őket kódoló gének polimorfizmusai jelentősen befolyásolhatják az 5-FU daganatellenes hatását és toxicitását (17, 18, 21, 22, 30).

Vizsgálataink során a 5-FU toxicitását, valamint hatását a CRC-s betegek adjuváns kezelését követő túlélésre a vegyület igen gyors lebontását katalizáló enzim, a DPD és IVS14+1G>A mutációja, valamint a molekuláris target TS polimorfizmusainak meghatározásával kívántuk jellemezni. A DPD-aktivitás esetén a normális populáció átlagértékének 70%-a alatti értékek esetén már kell számolni toxikus mellékhatások kialakulásával, míg az átlagérték 48%-a alatt a sú-

3. táblázat.
A túlélés multivariáns
Cox regressziós
analízise

	Betegségmentes túlélés RR*	p	Teljes túlélés RR	p
Nem				
Nő	1		1	
Férfi	1,48	0,290	1,2	0,676
Kor				
<58	1		1	
≥ 58	1,14	0,620	1,46	0,358
Lokalizáció				
Colon	1		1	
Rectum	2,1	0,028	3,08	0,023
Dukes-stádium				
B2	1		1	
C	2,04	0,042	4,9	0,009
Differenciáció (grade)				
1/2	1		1	
3	1,33	0,307	1,47	0,559
Kezelés típusa				
Infúziós	1		1	
Bolus	2,3	0,044	5,24	0,030
TS prognosztikai csoport				
„A”	1		1	
„B”	2,23	0,004	3,46	0,006
DPD-aktivitás				
<10 U/ 10^6 lymph.	1		1	
>10 U/ 10^6 lymph.	2,69	0,002	2,61	0,039

*RR = relatív rizikó

lyos toxicitások kialakulásának veszélye jelentősen fokozódik (42). A magyar kontroll populációban a DPD-aktivitás átlagértéke $14,04 \pm 7,42$ pmol/perc/ 10^6 limfocita. Ennek és az általunk a klinikumban tapasztalt toxikus eseményeknek az alapján a $10,0$ pmol/perc/ 10^6 limfocita DPD-érték alatti betegeket enyhén, az $5,0$ pmol/perc/ 10^6 limfocita érték alatti betegeket súlyosan DPD-hiányosnak tekintjük. Különböző 5-FU-val kezelt daganatos kórképekben az enyhe és súlyos DPD-hiány gyakorisága igen eltérő a különböző szerzők esetében. Három vizsgálat (10, 12, 26) értékeit összehasonlítva, az átlagérték 70%-ánál alacsonyabb DPD-aktivitás a vizsgált daganatos betegek (emlő-, fej-nyaki-, colorectalis rák, Hodgkin-kór) 8,3, 28,7 és 20%-ában, súlyos DPD-hiány 5,8, 6,0 és 2,7%-ában fordult elő, amellyel igen jó egyezést mutatnak a saját vizsgálatunk eredményei, amelyben mérsékelt DPD-csökkenés a betegek 20%-ában, míg súlyos DPD-hiány 4,9%-ban fordult elő. Eredményeink azt igazolták, hogy a súlyosan DPD-hiányos betegek esetében fokozott a veszély a Gr 3-4 toxikus mellékhatások (neutropenia, mucositis, hasmenés, kéz-láb-szindróma) kialakulására, ami e betegek mintegy 80-85%-át veszélyezteti. A DPD-hiány fontosságát a váratlan, súlyos 5-FU-toxicitások etiológiájában saját korábbi, alacsonyabb betegszámon végzett vizsgálataink (18) és számos munkacsoport igazolta, ezek szerint a toxikus esetekben 39-61%-ban találtak alacsony DPD-értékeket.

A IVS14 + 1G > A pontmutációt 0,94-5,4% gyakoriságban mutatták ki a különböző európai populációkban, ugyanakkor érdekes megjegyezni, hogy a mutáció a japán és afrikai-amerikai populációban nem fordult elő (44). A mutáció megoszlásának gyakoriságára a súlyos DPD-hiányos betegek között igen eltérő adatok vannak: Portugáliában 73 beteget vizsgálva Gr 3-4 toxicitásban szenvedő betegek esetében 2/8 (25%) (35), Franciaországban 93 5-FU-toxicitásban szenvedő beteg közül 2/93 (2,2%) (27). Hollandiában eltérő gyakoriságot tapasztaltak a különböző vizsgálatok esetében. Bosch és mtsai (4) 8/165 (4,8%), míg van Kuilenburg és mtsai 16/60 (26%) (44) gyakoriságban mutatták ki a mutációt. Saját jelenlegi adataink esetében a 38 súlyos DPD-hiányos betegünk közül 3 esetben (7,8%) fordult elő a mutáció. Az eltérő adatok oka lehet, hogy egyes esetekben a súlyosan DPD-hiányos betegek számára, más esetben a Gr 3-4 neutropeniás betegek számára vonatkoztatták a mutáció gyakoriságát. A Hollandiában talált kiemelkedően magas gyakoriságnak ugyanakkor lehetséges, hogy etnikai okai vannak.

A fenti adatok azt mutatják, hogy a DPD-hiány nem minden esetben magyarázza az 5-FU-kezelést követő toxicitást, a 14. exonon található G > A pontmutáció vizsgálata pedig nem alkalmas módszer az 5-FU-val kezelt betegek között várhatóan jelentkező súlyos toxicitás előrejelzésére, ugyanakkor mutáns esetben Gr 3-4 toxicitás esetén igazolhatja a DPD-hiány okát. Újabb adatok azt mutatják, hogy a DPYD gén promoter régiójának metilációja kapcsolatba hozható az enzim

downregulációjával, amely alapján feltételezhető, hogy epigenetikus mechanizmusok is szerepet játszhatnak a DPD-aktivitás szabályozásában (10). További prospektív klinikai vizsgálatok szükségesek a mellékhatások igen pontos követésével és a DPD-aktivitás meghatározásával a vizsgálat pontos specificitásának és szenzitivitásának meghatározásához.

Az 5-FU várható klinikai hatékonyságának előrejelzésére a molekuláris target TS génpolimorfizmusait és a DPD-aktivitást vizsgáltuk. Korábbi vizsgálatok igazolták, hogy a TS gén 5'-TSER polimorfizmusa esetén a tandem ismétlődés hossza kapcsolatot mutat a TS fehérje expressziójával, a 3R/3R genotípus esetén a legnagyobb az expresszió (19). Ugyancsak ismert, hogy a 6 bp deléción a 3'-TSUTR régióban a TS mRNS instabilitását és alacsonyabb TS mRNS-szintet okoz (28). Egymásnak ellentmondó eredményeket találtunk ugyanakkor arra vonatkozólag, hogy a magas vagy az alacsony TS-expresszió jelent-e jó prognózist illetve terápiás választ adjuváns 5-FU-kezelés esetén. Egyes szerzők (5, 33) azt igazolták, hogy az intratumorális magas TS-expresszió rossz prognózisra utaló jel, ugyanakkor mások hosszabb túlélést találtak magas intratumorális TS-szint mellett adjuváns 5-FU-kezelés esetén (13, 21). A normális szövetekben az alacsony TS-expresszió vagy az olyan genotípus-kombinációk, amelyek alacsony TS-expresszióval járnak, ugyanakkor súlyos toxikus mellékhatásokkal járhatnak együtt, amelyek szintén rossz prognózisra utalhatnak (36). Lecomte és mtsai (25) a 3R/3R, 2R/3R és 2R/2R genotípusok esetén 3%, 18% és 43%-ban mutattak ki Gr 3-4 toxicitásokat. Saját vizsgálatunkban is a „B” prognosztikai csoportba (alacsony TS) tartozó betegek esetében szignifikánsan gyakrabban tapasztaltunk mellékhatásokat az „A” csoporttal összehasonlítva. Ezek az adatok is magyarázattal szolgálnak azon eredményeink megértéséhez, melyek szerint azok a csírasejtes TS-génpolimorfizmusok illetve polimorfizmus-kombinációk, amelyek magas TS-expresszióval járnak, jobb 5-FU terápiás választ, szignifikánsan hosszabb betegségmentes- és teljes túlélést jeleztek. A 8 polimorfizmus-kombináció esetében elvégzett Cox regressziós analízis eredményei is azt igazolták, hogy a magas TS-expressziót jelző genotípus-kombinációk esetében találtunk <1 relatív rizikót („A” jó prognózisú csoport), szemben a >1 relatív rizikójú „B” (rossz prognózisú) csoporttal. Ez az eredmény a továbbiakban lehetőséget ad egy adott beteg esetében a TS-génpolimorfizmus-kombináció meghatározása alapján az adjuváns kezelést követő prognózis megbecsülésére.

A DPD-aktivitást és az 5-FU-kezelésre adott választ vizsgálva 60 emberi tumorsejtvonalon fordított összefüggést igazoltak a sejtek DPD-aktivitása és 5-FU-érzékenysége között (3). Ez az eredmény arra utal, hogy az intratumorális DPD-aktivitásnak fontos szerepe lehet az 5-FU hatékonyságában. Egy összefoglaló tanulmányban colorectalis-, gyomor-, emlő-, fej-nyaki-, petefészek-, és hólyagdaganatokban a DPD-szint és az

5-FU-kezelés közti összefüggéseket elemezve azt mutatták ki, hogy bár elég nagy különbségek voltak a különböző csoportok DPD-értékei között, az esetek kb. 50%-ában összefüggés mutatható ki a DPD-szint és a prognózis között (44).

A DPD-szinteket adjuváns 5-FU-kezelést követően colorectalis- és gyomorrák esetében a tumor- és környező normális szöveti mintákban mRNS (21), fehérje (16) és enzim szinten (39) vizsgálták, és az eredmények azt mutatták, hogy alacsony DPD-szint esetén csökken a relapszus rizikója (39) és nő a betegségmentes- és teljes túlélés hossza (21, 39). A tumorszövet és a környező egészséges szövet DPD mRNS-expresszióját összehasonlítva szignifikánsan alacsonyabb értéket mutattak ki a tumor- mint a normális szövetben (2). Saját, még nem közölt vizsgálataink eredménye szerint ugyanakkor a vér perifériás mononukleáris sejteiben a DPD aktivitása egy ságrenddel magasabb, mint a colorectalis normális- és tumorszövetben. Figyelembe véve azt az eredményt, amely szerint a perifériás mononukleáris sejtek és a máj DPD-aktivitása igen jó korrelációt mutat (5) feltételezhető, hogy ezeknek a sejteknek a máj mellett igen jelentős szerepük van az 5-FU lebontásában. Ez a megfigyelés is alátámasztotta azt a célkitűzésünket, hogy a vér mononukleáris sejteiben mért DPD-aktivitás és az 5-FU-kezelés eredményessége közötti összefüggést vizsgáljuk. Vizsgálataink szerint összefüggés van a DPD-aktivitás és az 5-FU-kezelést követő betegségmentes- és teljes túlélés hossza között. Az alacsony (≤ 10 pmol/perc/ 10^6 limfocita) DPD-aktivitású betegek kb. 75%-a, míg a $10,1$ pmol/perc/ 10^6 limfocita érték feletti betegeknek csak 25%-a volt 5 évvel a kezelés után tünetmentes, és hasonló értékeket, 95% vs. 55% különbséget találtunk a teljes túlélésben. Az alacsony DPD-aktivitású betegekben az 5-FU plazmaszintje tartósan magasabb értéken marad, amelyet saját vizsgálati eredményeink is igazoltak, mely szerint szignifikáns fordított összefüggést mutatunk ki a DPD-aktivitás értéke és az 5-FU egyensúlyi plazmakoncentrációja (Css) között folyamatos infúziós 5-FU-kezelés során (15).

Természetesen, ahogyan azt jelen közleményünkben is bemutattuk, az alacsony DPD-értékek esetén fokozódhatnak az 5-FU-kezelés mellékhatásai, ezért a klinikusnak mérlegelni kell a vállalható rizikót a jobb terápiás eredmények érdekében, ugyanakkor ezekben az esetekben esetleg megfontolható az 5-FU dózisének csökkentése is. Említést érdemel Schuell és mtsai munkája (37), amelyben metasztatikus colorectalis daganatokban összefüggést kerestek a kemoterápiával kapcsolatos mellékhatások száma és a kezelés hatékonysága között, és korrelációt találtak a medián túlélés és a mellékhatások száma között; 0-1 mellékhatás esetén 10 hónap, míg 6 vagy efeletti számú mellékhatás esetén 18 hónapos medián túlélést mutattak ki. Eredményeink szerint a multi-váriáns Cox regressziós analízis igazolta, hogy a TS-polimorfizmusok mellett a DPD-aktivitás is a túlélés független prognosztikai faktora a CRC-k adjuváns 5-FU-kezelése esetén.

Következtetésekként megállapítható, hogy az 5-FU-kezelést megelőzően elvégzett DPD-enzimvizsgálat prediktív értékű a súlyos Gr 3-4 toxicitások előrejelzésében. A TS-génpolimorfizmusok és a DPD-szint együttes értékelése prognosztikai értékű az adjuváns kezelést követő túlélés előrejelzésében, ezáltal segítséget nyújt a gyógyszeres kezelés összetételének individuális megtervezéséhez.

Köszönetnyilvánítás

A szerzők köszönetüket fejezik ki Dr. Kahán Zsuzsa Tanár Asszonynak a DPD-vizsgálatra küldött betegek vérmintájáért és a rendelkezésre bocsátott klinikai adatokért. A DPD-vizsgálatok során nyújtott magas színvonalú asszisztensi munkáért köszönet illeti Kútvolgyi Judit, Osztafin Judit és Makácsné Polényi Csilla asszisztensnőket.

Irodalom

- Adleff V, Hitre E, Köves I, et al. Heterozygote deficiency in thymidylate synthase enhancer region polymorphism genotype distribution in Hungarian colorectal cancer patients. *Int J Cancer* 108:852-856, 2004
- Amatori F, Di Paolo A, Del Tacca M, et al. Thymidylate synthase, dihydropyrimidine dehydrogenase and thymidine phosphorylase expression in colorectal cancer and normal mucosa in patients. *Pharmacogen Genom* 16:809-816, 2006
- Beck A, Etienne MC, Chéradame S, et al. A role for dihydropyrimidine dehydrogenase and thymidylate synthase in tumour sensitivity to fluorouracil. *Eur J Cancer* 30A:1517-1522, 1994
- Bosch TM, Bakker R, Schellens JH, et al. Rapid detection of the DPYD IVS14+1G>A mutation for screening patients to prevent fluorouracil-related toxicity. *Mol Diagn Ther* 11:105-108, 2007
- Cascinu S, Graziano F, Valentini M, et al. Vascular endothelial growth factor expression, S-phase fraction and thymidylate synthase quantitation in node-positive colon cancer: relationship with tumor recurrence and resistance to adjuvant chemotherapy. *Ann Oncol* 12:239-244, 2001
- Chazal M, Etienne MC, Renée N, et al. Link between dihydropyrimidine dehydrogenase activity in peripheral blood mononuclear cells and liver. *Clin Cancer Res* 2:507-510, 1996
- Di Paolo A, Danesi R, Falcone A, et al. Relationship between 5-fluorouracil disposition, toxicity and dihydropyrimidine dehydrogenase activity in cancer patients. *Ann Oncol* 12:1301-1306, 2001
- Edler D, Glimelius B, Hallstrom M, et al. Thymidylate synthase expression in colorectal cancer: a prognostic and predictive marker of benefit from adjuvant fluorouracil-based chemotherapy. *J Clin Oncol* 20:1721-1728, 2002
- Efficacy of intravenous continuous infusion of fluorouracil compared with bolus administration in advanced colorectal cancer. Meta-analysis Group in Cancer. *J Clin Oncol* 16:301-308, 1998
- Etienne MC, Lagrange JL, Dassonville O, et al. Population study of dihydropyrimidine dehydrogenase in cancer patients. *J Clin Oncol* 12:2248-2253, 1994
- Ezzeldin H, Lee A, Mattison L, et al. Methylation of the DPYD promoter: An alternative mechanism for dihydropyrimidine dehydrogenase deficiency in cancer patients. *Clin Cancer Res* 11:8699-8705, 2005
- Fleming RA, Milano GA, Gaspard HM, et al. Dihydropyrimidine dehydrogenase activity in cancer patients. *Eur J Cancer* 29A:740-744, 1993
- Formentini A, Henne-Bruns D, Kornmann M. Thymidylate synthase expression and prognosis of patients with gastrointestinal cancers receiving adjuvant chemotherapy. *Langenbecks Arch Surg* 389:405-413, 2004

14. Harris BE, Song R, Soong SJ, et al. Relationship between dihydropyrimidine dehydrogenase activity and plasma 5-fluorouracil levels with evidence for circadian variation of enzyme activity and plasma drug levels in cancer patients receiving 5-fluorouracil by protracted continuous infusion. *Cancer Res* 50:197-201, 1990
15. Hitre E. Farmakogenetikai markerek jelentősége a colorectális daganatok fluoropirimidin alapú terápiájában. PhD értekezés, 2006
16. Jensen SA, Vainer B, Sorensen JB. The prognostic significance of thymidylate synthase and dihydropyrimidine dehydrogenase in colorectal cancer of 303 patients adjuvantly treated with 5-fluorouracil. *Int J Cancer* 120:694-701, 2006
17. Johnston PG, Lenz HJ, Leichman CG, et al. Thymidylate synthase gene and protein expression correlate and are associated with response to 5-fluorouracil in human colorectal and gastric tumors. *Cancer Res* 55:1407-1412, 1995
18. Katona C, Kralovánszky J, Rosta A, et al. Putative role of dihydropyrimidine dehydrogenase in the toxic side effect of 5-fluorouracil in colorectal cancer patients. *Oncology* 55:468-474, 1998
19. Kawakami K, Omura K, Kanehira E, et al. Polymorphic tandem repeats in the thymidylate synthase gene is associated with its protein expression in human gastrointestinal cancers. *Anticancer Res* 19:3249-3252, 1999
20. Kawakami K, Salonga D, Park JM, et al. Different lengths of a polymorphic repeat sequence in the thymidylate synthase gene affect translational efficiency but not its gene expression. *Clin Cancer Res* 7:4096-4101, 2001
21. Kornmann M, Schwabe W, Sander S, et al. Thymidylate synthase and dihydropyrimidine dehydrogenase mRNA expression levels: predictors for survival in colorectal cancer patients receiving adjuvant 5-fluorouracil. *Clin Cancer Res* 9:4116-4124, 2003
22. Kralovánszky J, Köves I, Orosz Z, et al. Prognostic significance of the thymidylate biosynthetic enzymes in human colorectal tumors. *Oncology* 62:167-174, 2002
23. Kralovánszky J, Katona Cs. Nukleotid bioszintézis gátlók. In: *Onkofarmakológia*, Eds. Jeney A, Kralovánszky J. Medicina Kiadó Rt, 2005, pp. 271-299
24. Kralovánszky J. Tőrekvések a gyógyszeres terápia hatékonyságának fokozására. In: *Onkofarmakológia*. Eds. Jeney A, Kralovánszky J. Medicina Kiadó RT, 2005, pp. 179-204
25. Lecomte T, Ferraz JM, Zinzindohoué F, et al. Thymidylate synthase gene polymorphism predicts toxicity in colorectal cancer patients receiving 5-fluorouracil based chemotherapy. *Clin Cancer Res* 10:5880-5888, 2004
26. Lu Z, Zhang R, Carpenter JT, et al. Decreased dihydropyrimidine dehydrogenase activity in a population of patients with breast cancer: implication for 5-fluorouracil-based chemotherapy. *Clin Cancer Res* 4:325-329, 1998
27. Magne N, Etienne-Grimaldi MC, Cals L, et al. Dihydropyrimidine dehydrogenase activity and the IVS14+1G>A mutation in patients developing 5-FU related toxicity. *Br J Clin Pharm* 2007 Feb28 (Epub ahead of print)
28. Mandola MV, Stoehlmacher J, Zhang W, et al. A 6 bp polymorphism in the thymidylate synthase gene causes message instability and is associated with decreased intratumoral TS mRNA levels. *Pharmacogenetics* 5:319-327, 2004
29. Marsh S, Mallon MA, Goodfellow P, et al. Concordance of pharmacogenetic markers in germline and colorectal tumor DNA. *Pharmacogenomics* 6:873-877, 2005
30. Marsh S, McLeod HL. Pharmacogenomics: from bedside to clinical practice. *Hum Mol Genet* 15:R89-93, 2006
31. Modulation of fluorouracil by leucovorine in patients with advanced colorectal cancer. Evidence in terms of response rate. Advanced Colorectal Cancer Meta-Analysis Project. *J Clin Oncol* 10:896-903, 1998
32. Ottó Sz, Kásler M. A hazai és nemzetközi daganatos halálozási és megbetegedési mutatók alakulása. *Magyar Onkológia* 49:99-107, 2005
33. Papat S, Matakidou A, Houlston RS. Thymidylate synthase expression and prognosis in colorectal cancer: a systematic review and meta-analysis. *J Clin Oncol* 22:529-536, 2004
34. Raida M, Kliche KO, Schwabe W, et al. Circadian variation of dihydropyrimidine dehydrogenase mRNA expression in leukocytes and serum cortisol levels in patients with advanced gastrointestinal carcinomas compared to healthy controls. *J Cancer Res Clin Oncol* 128:96-102, 2002
35. Salgueiro N, Fragosó VI, Sousa M, et al. Mutations in exon 14 of dihydropyrimidine dehydrogenase and 5-fluorouracil toxicity in Portuguese colorectal cancer patients. *Genet Med* 6:102-107, 2004
36. Santini D, Vincenzini B, Perrone G, et al. Thymidylate synthase expression in normal colonic mucosa: a predictive marker of toxicity in colorectal cancer patients receiving 5-fluorouracil based adjuvant chemotherapy. *Oncology* 67:135-142, 2004
37. Schuell B, Gruenberger T, Kornek GV, et al. Side effects during chemotherapy predict tumour response in advanced colorectal cancer. *Br J Cancer* 93:744-748, 2005
38. Tan BR, McLeod HL. Pharmacogenetic influences on treatment response and toxicity in colorectal cancer. *Semin Oncol* 32:113-119, 2005
39. Terashima M, Fujiwara H, Takagane, A et al. Prediction of sensitivity to fluoropyrimidines by metabolic and target enzyme activities in gastric cancer. *Gastric Cancer* 6 (Suppl 1):71-81, 2003
40. Uetake H, Ichikawa W, Takechi T, et al. Relationship between intratumoral dihydropyrimidine dehydrogenase activity and gene expression in human colorectal cancer. *Clin Cancer Res* 5:2836-2839, 2003
41. Ulrich CM, Bigler J, Velicer CM, et al. Searching expressed sequence tag databases: discovery and confirmation of a common polymorphism in the thymidylate synthase gene. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 9:1381-1385, 2000
42. van Kuilenburg AB, Meisma R, Zoetekouw L, et al. Increased risk of grade IV neutropenia after administration of 5-fluorouracil due to a dihydropyrimidine dehydrogenase deficiency: high prevalence of the IVS14+1G>A mutation. *Int J Cancer* 101:253-258, 2002
43. van Kuilenburg ABP, Muller EW, Haasjes J, et al. Lethal outcome of a patient with complete dihydropyrimidine dehydrogenase (DPD) deficiency after administration of 5-fluorouracil: frequency of the common IVS14+1G>A mutation causing DPD deficiency. *Clin Cancer Res* 7:1149-1152, 2001
44. van Kuilenburg ABP. Dihydropyrimidine dehydrogenase and the efficacy and toxicity of 5-fluorouracil. *Eur J Cancer* 40:939-950, 2004
45. van Kuilenburg ABP, Vreken P, Abeling NG, et al. Genotype and phenotype in patients with dihydropyrimidine dehydrogenase deficiency. *Hum Genet* 104:1-9, 1999
46. Wei X, Elizondo G, Sapone A, et al. Characterization of human dihydropyrimidine dehydrogenase gene. *Genomics* 51:391-400, 1998