

1/48/2001

3. Részjelentés: 2003. November 30.-2004. december 31.

RP.8. A rákellenes gyógyszerhatás feltételeinek molekuláris és farmakológiai vizsgálata
B. Génpolimorfizmusok és a betegek gyógyszerekre való
reagálásának kapcsolata

Dr. Kralovánszky Judit
Országos Onkológiai Intézet

RP8.2. A rákellenes gyógyszerhatás feltételeinek molekuláris és farmakológiai vizsgálata
témavezető: Dr. Kralovánszky Judit

résztvevők: Dr. Adleff Vilmos, Dr. Hitre Erika, Dr. Budai Barna, Dr. Katona Csilla, Pandi Erzsébet, Dr. Tímár Ferenc, Dr. Jeney András, Dr. Oláh Julianna, Dr. Müller Judit, Pap Éva, Dr. Komlósi Viktor

2. A gén polimorfizmusok és a betegek gyógyszerekre való reagálásának kapcsolata.

2.4. Összefüggés keresése a target gén polimorfizmusok valamint a mRNS és fehérje expresszió között.

2.5. A különböző 5-FU kezelési sémák esetében kialakuló farmakokinetikai paraméterek, valamint a katabolikus enzim a (DPD) aktivitása és a molekuláris target (TS) gén és protein expressziója közötti összefüggések vizsgálata. A dózis optimalizálása.

2.6. Összefüggés a terápia megkezdése előtt meghatározott génexpressziók nagysága, azok fenotípusos következményei valamint a betegek kezelésre adott válasza, és a betegség prognózisa között.

1. altéma A Timidilátszintáz (TS) génpolimorfizmusok kombinált értékelése adjuváns 5-fluorouracil kezelésben részesült colorectális daganatos betegek esetében

Az 5-fluorouracil (5-FU) molekuláris targetje, a timidilát szintáz (TS) enzim, a timidilát bioszintézisen túl fontos regulációs funkciókat is ellát pl. a nukleotid pool arányok szabályozását, valamint ribonukleoprotein komplexeken keresztül több sejtciklus szabályzó gén expressziójának modulációját (p53, c-myc). Emellett a saját mRNS-ének transzlációs autoregulációját is végzi. A fluoropirimidinekkel szembeni egyéni terápiás válaszkülönbségek egyik lehetséges oka a TS génen fellelhető több, a transzkriptre lokalizált, nagy populációs gyakoriságot mutató és funkcionálisan aktív polimorfizmus jelenléte, amelyből kettő a transzkripciót és a transzlációt egyaránt befolyásoló TSER (TS *enhancer region*) helyen, az mRNS 5'-UTR régióban lokalizált, és egy harmadik a 1494del6, a 3'-UTR végen található.

Korábbi jelentéseinkben már számot adtunk azon vizsgálati eredményeinkről mely szerint a timidilátszintáz (TS) génpolimorfizmusok jelentős biomarkerként szerepelhetnek a colorectális rákok (CRC) prevenciójában, mely szerint a TS nem csak leukémiákban, de a magyar populációban a CRC-ban is szuszceptibilitást módosító tényező lehet. (*Adleff et al. Int J. Cancer 2004, 108: 852-856*)

A vizsgálatok további **célkitűzése** egy olyan prediktív rendszer kidolgozása volt, amely a betegeket gyógyszerekkel kezelő klinikusok részére információt nyújt a kezelés várható eredményességéről, /betegségmentes (DFS) és teljes túlélés (OS)/ valamint a kezelés során esetleg várható súlyosabb mellékhatásokról. A TS polimorfizmusok és a betegek 5-FU kezelésre adott válaszána kisebb betegszámon történt, értékeléséről előző jelentésünkben már szóltunk. Ebben a jelentésünkben 168, adjuváns kezelésben részesült CRC-s beteg TS génpolimorfizmus vizsgálatának kombinált értékelésének eredményei és a betegek klinikai adatai kerültek összehasonlításra.

A TS 5' vég TSER (3R/3R, 2R/3R, 2R/2R) és 3' vég TSUTR (-6bp/-6bp, -6bp/+6bp, +6bp/+6bp) polimorfizmusait 166 adjuváns kezelésben részesült beteg véréből szeparált lymphocytából kinyert DNS mintákból végeztük PCR és RFLP módszerrel a korábbi jelentésünkben részletezett **módszer** szerint.

Eredmények:

A vizsgált betegek demográfiai szövettani és genotípusok szerint megoszlását és azok összefüggését a túléléssel egyváltozós analízis (univariate analysis) szerinti értékeltük és az eredményeket az 1. táblázatban foglaltuk össze.

1. Táblázat 5-fluorouracil adjuváns kezelésben részesült colorectalis tumoros betegek túlélésének egyváltozós analízise

| | n | Betegségmentes túlélés | | | | Teljes túlélés | | | |
|----------------|----|------------------------|-----------------------|-----------------|-----------|----------------|-----------------------|------|------------|
| | | át ^a | p ^b | RR ^c | 95% CI | át | p | RR | 95% CI |
| Nem | | | | | | | | | |
| férfi | 91 | 20 | 0,055 | 1 | | 26 | 0,718 | 1 | |
| nő | 75 | 22 | | 0,59 | 0,35-1,02 | 25 | | 1,15 | 0,54-2,45 |
| Kor (év) | | | | | | | | | |
| <58 | 84 | 21 | 0,877 | 1 | | 27 | 0,267 | 1 | |
| ≥58 | 82 | 21 | | 0,94 | 0,56-1,57 | 24 | | 1,48 | 0,69-3,16 |
| Dukes stádium | | | | | | | | | |
| B2 | 46 | 24 | 0,481 | 1 | | 29 | 0,119 | 1 | |
| C | 12 | 20 | | 1,23 | 0,69-2,19 | 24 | | 2,12 | 0,80-5,63 |
| Differenciáció | | | | | | | | | |
| 1/2 | 14 | 21 | 0,559 | 1 | | 26 | 0,817 | 1 | |
| 3 | 5 | 20 | | 0,80 | 0,38-1,70 | 25 | | 0,87 | 0,26-2,89 |
| Tumor helye | | | | | | | | | |
| 1 rectum | 82 | 18 | 0,182 | 1 | | 23 | 0,214 | 1 | |
| 2 sigma | 35 | 23 | 1 vs 2 0,120 | 0,59 | 0,29-1,21 | 28 | 1 vs 2 0,094 | 0,35 | 0,10-1,2 |
| 3 colon | 49 | 24 | 1 vs 3 0,137 | 0,64 | 0,35-1,16 | 28 | 1 vs 3 0,353 | 0,80 | 0,35-1,82 |
| | | | 1 vs 2+3 0,065 | 0,62 | 0,37-1,04 | | 1 vs 2+3 0,184 | 0,60 | 0,28-1,29 |
| Kezelési típus | | | | | | | | | |
| bolus | 70 | 20 | 0,036 | 1 | | 27 | 0,615 | 1 | |
| Infúziós | 96 | 22 | | 0,58 | 0,35-0,97 | 25 | | 0,82 | 0,39-1,75 |
| 5'-TSER | | | | | | | | | |
| 1 3R/3R | 57 | 24 | 0,134 | 1 | | 29 | 0,027 | 1 | |
| 2 2R/3R | 80 | 20 | 1 vs 2 0,093 | 1,73 | 0,94-3,21 | 24 | 1 vs 2 0,012 | 3,99 | 1,35-11,84 |
| 3 2R/2R | 29 | 18 | 1 vs 3 0,080 | 1,95 | 0,92-4,14 | 23 | 1 vs 3 0,081 | 3,19 | 0,85-11,9 |
| | | | 1 vs 2+3 0,048 | 1,79 | 1,00-3,22 | | 1 vs 2+3 0,009 | 3,79 | 1,31-10,98 |
| 3'-TSUTR | | | | | | | | | |
| 1 -6bp/-6bp | 17 | 20 | 0,552 | 1 | | 26 | 0,659 | 1 | |
| 2 -6bp/+6bp | 79 | 22 | 1 vs 2 0,325 | 0,69 | 0,32-1,52 | 27 | 1 vs 2 0,696 | 0,75 | 0,25-2,27 |
| 3 +6bp/+6bp | 70 | 20 | 1 vs 3 0,307 | 0,65 | 0,29-1,47 | 24 | 1 vs 3 0,406 | 0,59 | 0,18-1,91 |
| | | | 1 vs 2+3 0,285 | 0,67 | 0,32-1,42 | | 1 vs 2+3 0,467 | 0,68 | 0,23-1,95 |

^a átlagos túlélés (hónap)

^b log-rank teszt

^c RR (relatív rizikó) Cox regressziós modellel számolva

Az eredmények szerint a nem, életkor, Dukes' stádium és a tumor helye, nem befolyásolta szignifikánsan a betegek túlélését ugyanakkor a kezelés típusa és az 5'-TSER polimorfizmus szignifikáns összefüggést mutatott a betegek betegségmentes és teljes túlélésével. A 2R/2R homozigóta genotípus 1,95-szörös relatív rizikót jelentett a betegségmentes és 3,19-szeres relatív rizikót a teljes túlélés vonatkozásában.

A 3'-UTR polimorfizmus bár önmagában nem mutatott szignifikáns összefüggést a betegek betegségmentes vagy teljes túlélésével azonban jól látható, hogy a 6bp inszerciót tartalmazó heterozigóta (-6bp/+6bp) vagy homozigóta (+6bp/+6bp) genotípusok jobb prognózisúak amelyet a relatív rizikó (RR) jelentős csökkenése mutat.

A továbbiakban ezért a két vég polimorfizmusainak kombinált értékelését végeztük el, annak a tisztázása céljából, hogy a kombinált értékelés finomabb predikciót fog-e eredményezni. Az értékelés során összesen 8 genotípus kombinációt hasonlítottunk össze a túlélések vonatkozásában (2R/2R & -6bp/-6bp genotípus kombináció ugyanis az anyagban nem fordult elő).

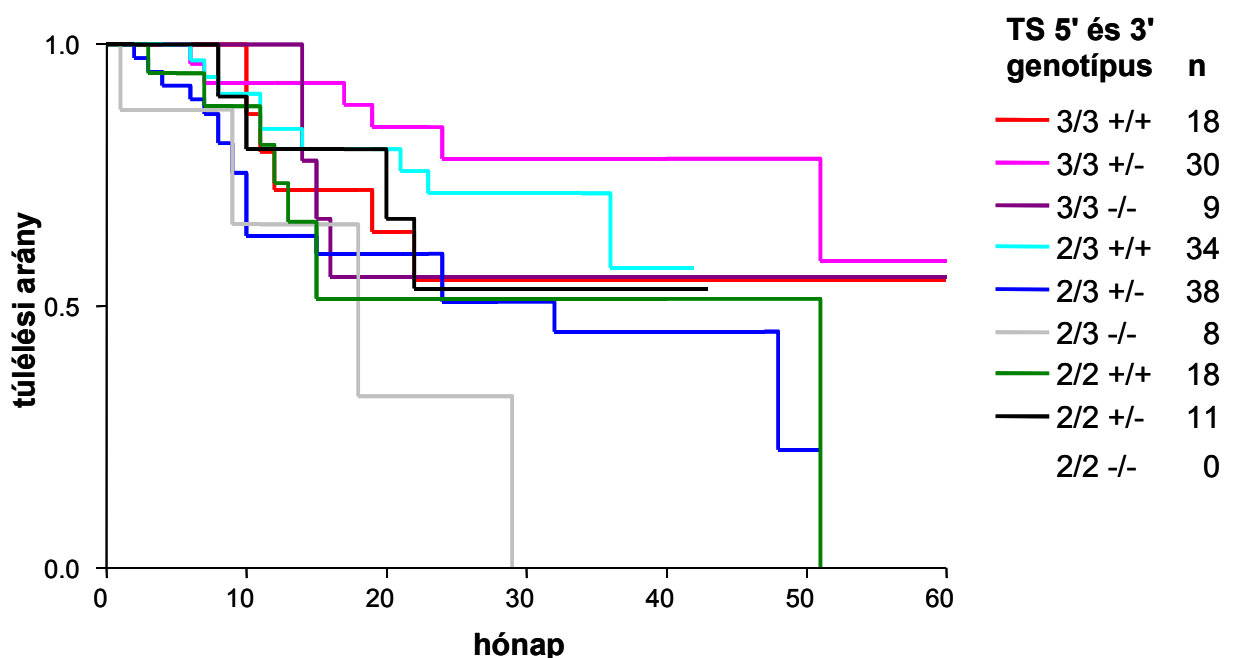
A 8 genotípus kombináció és a betegek betegségmentes túlélésének összefüggéseit az 1. ábra a teljes túlélésének összefüggéseit a 2. ábra szemlélteti. A betegségmentes túlélés statisztikai értékelését Cox regressziós analízissel végeztük és a 2. táblázatban adjuk meg.

A leghosszabb betegségmentes túlélést a 3R/3R genotípusú betegeknél találtunk bármilyen 3'-UTR polimorfizmussal kombinálódott is az 5'-vég. A 3'-vég jelentőségét a pontosabb prognózis megállapításában az mutatja, hogy amennyiben a 2R/3R heterozigóta genotípus +6bp/+6bp homozigóta 3'-véggel kombinálódott úgy a 3R/3R genotípusokhoz hasonló, hosszú betegségmentes túlélés mutatkozott a betegeknél.

A két típusú polimorfizmus kombinált értékelése elsősorban az 5'TSER heterozigóták (2R/3R) esetében jelent nagy segítséget a különböző prognózisú betegek elkülönítésében.

Amennyiben a 2R/3R heterozigóta genotípus +6bp/+6bp véggel kombinálódik akkor a relatív rizikó értéke 1,4 amennyiben +6bp/-6bp véggel akkor 3,0 és ha -6bp/-6bp véggel akkor 5,6.

A betegek teljes túlélése is szignifikáns összefüggést mutatott a fenti polimorfizmus kombinációkkal. (2. ábra)

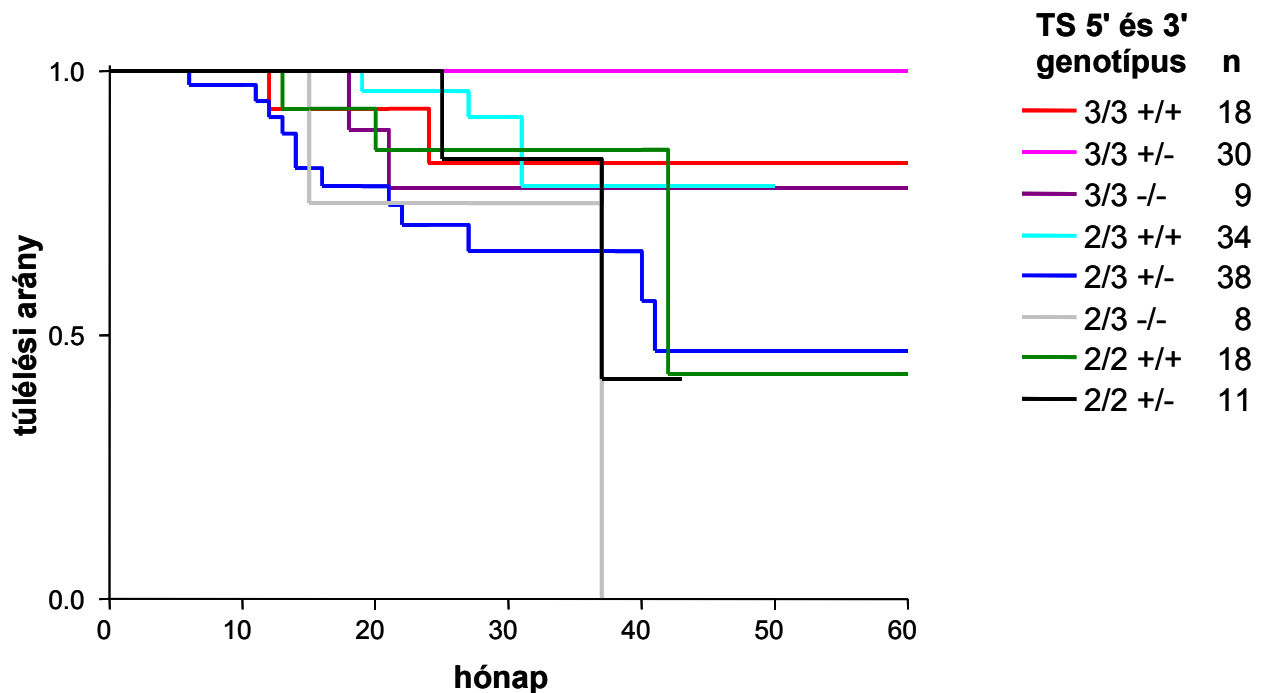


Log rank teszt $p=0,063$; trend $p=0,027$

1. ábra Összefüggés a TS genotípusok kombinációja és a 166 CRC-s beteg betegségmentes túlélése között

2. Táblázat A különböző TS 5' és 3' genotípusú betegek betegségmentes túlélésének Cox regressziós analízise

| csoport | genotípus | n | RR | 95% CI | p |
|---------|---------------|----|-----|------------|-------|
| 8 | 3R/3R 0bp/6bp | 30 | 1,0 | referencia | 1,000 |
| 6 | 2R/3R 6bp/6bp | 34 | 1,4 | 0,50 4,06 | 0,513 |
| 9 | 3R/3R 6bp/6bp | 18 | 2,1 | 0,62 6,96 | 0,195 |
| 7 | 3R/3R 0bp/0bp | 9 | 2,2 | 0,50 9,41 | 0,216 |
| 2 | 2R/2R 0bp/6bp | 11 | 2,3 | 0,52 9,98 | 0,191 |
| 5 | 2R/3R 0bp/6bp | 38 | 3,0 | 1,34 6,62 | 0,015 |
| 3 | 2R/2R 6bp/6bp | 18 | 3,3 | 1,03 10,43 | 0,020 |
| 4 | 2R/3R 0bp/0bp | 8 | 5,6 | 0,75 41,93 | 0,003 |



Log rank teszt $p=0,031$; trend $p=0,016$

2.ábra Összefüggés a TS genotípusok kombinációja és a 166 CRC-s beteg teljes túlélése között

Következtetés: vizsgálataink eredményeit összefoglalva megállapítható, hogy a TS mRNS két végén található génpolimorfizmusok vizsgálata és kombinált értékelése a CRC-s betegek esetében az adjuváns kezelésre adott terápiás válasz, a betegségmentes- és teljes túlélés predikcióját teszi lehetővé és ezzel a rossz prognózisú esetekben az 5-fluorouracil kezelés más gyógyszerrel (irinotecan, oxaliplatin, bevacizumab, cetuximab) történő kiegészítésének szükségességét jelzi.

3.altéma *A metabolikus és target gének expressziójának változása daganatos sejteken kemoterápiás szerek hatására (Az RP8A altéma munkatársaival együttműködésben)*

A timidilátszintáz (TS) fontos célpont a kemoterápiában. A TS gátolható nukleotid és folát analógokkal. Az 5-FU metabolitja az FdUMP egy relatív stabil ternier komplexet képez a TS-sel és az 5,10-metiléntetrahidrofoláttal (MTHF) és ezáltal a TS inaktiválódik. A komplex stabilitását a leukovorin tovább növeli ezért alkalmazzák a klinikumban az 5-FU+ leukovorin kombinált kezelést.

Korábbi in vitro és in vivo vizsgálatainkból ismert, hogy egy másik nukleozid analóg, az 5-etil-2'-dezoxiuridin (EUdR) is képes fokozni az 5-FU citotoxikus hatását. Az EUdR foszforilálódása után keletkező EdUMP is képes gátolni a TS aktivitást és kombinációban az 5-FU kezeléssel, növeli annak tumorelles hatását. Feltehetően az EdUMP TS-t inaktíváló hatása is komplexképzés révén valósul meg azonban lehetséges, hogy egyéb molekuláris mechanizmusok is szerepet játszanak a kombináció hatékonyságában.

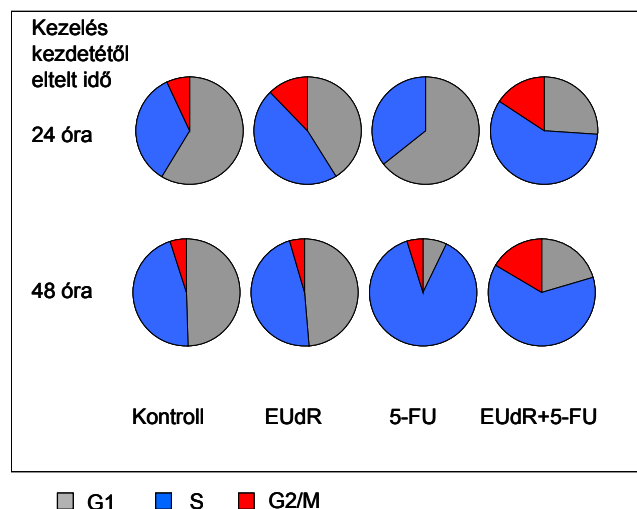
Előző jelentésünkben beszámoltunk az SW-620 colon tumor sejtvonalak 4 órás 5-FU, EUdR és kombinált kezelését követő sejt proliferáció, TS expresszió és FdUMP+TS komplex képződésének vizsgálatáról.

Jelen munkánkban a kombináció hatását vizsgáltuk a sejtkinetikai változásokra, az apoptózis kialakulására, a p53 és PCNA expresszióra, a DNS fragmentációra és ezáltal újabb adatokat kívántunk szerezni a colorectális daganatokban olyan széleskörben alkalmazott az 5-FU valamint az 5-FU és a hatékonyságát fokozó nukleozid analóg az 5-etil-2'-dezoxiuridin gyógyszerkombináció molekuláris mechanizmusára vonatkozóan.

Eredmények:

Sejtkinetikai paraméterek változása 5-FU, EUdR és kombinációjuk hatására

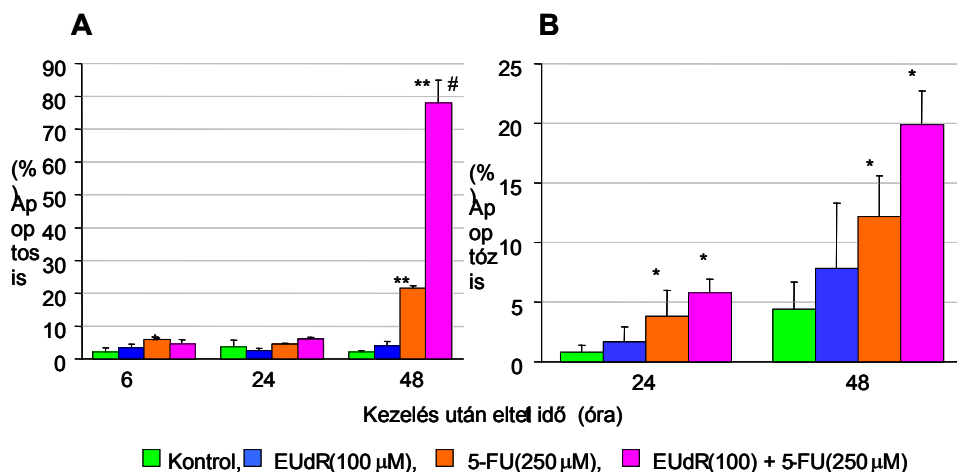
Az 5-FU a sejtciklus S fázisában fejt ki hatását. Vizsgáltuk, hogy az 5-FU, az EUdR és kombinációjuk milyen változásokat okoz a sejtciklus fázisaiban. Az 5-FU kezelés hatására 48 óra múlva az S fázisú sejtek aránya megnőtt a populáción belül, ezzel párhuzamosan a G1 fázisú sejtek aránya csökkent. Az EUdR kezelés önmagában nem okozott szembetűnő változást ugyanakkor a sejtek megnövekedett százalékos aránya a G2/M átmenetben az EUdR+5-FU kombinált kezelés esetén a legkifejezettebb (3.ábra).



3. ábra Sejtciklus változások 5-FU és EUdR kezelés után SW620 sejtvonalon. Hatóanyag koncentráció: EUdR:100µM, 5-FU:250 µM

Vizsgáltuk, hogy az 5-FU citotoxikus hatása megnyilvánul-e az apoptózis létrejöttében, ill. az EUdR által okozott hatásfokozódás esetén az apoptózis arány módosul-e. Az SW620 sejtvonalon a citotoxicitási tesztekben 100 μM EUdR okozta az 5-FU szenzitivitás legnagyobb mértékű növekedését, így jelen kísérleteinkben 100 μM EUdR és az IC_{50} -nek megfelelő 250 μM 5-FU kezelést alkalmaztuk. Az egyik esetben a sejteket folyamatos EUdR+5-FU expozíciónak vetettük alá, a kezelés után tápfolyadékcseré nem történt. Az apoptózis arány meghatározása a kezelés kezdetétől számított 6, 24 és 48 óra elteltével történt. (4.ábra A).

Hasonló feltételek mellett, de a kezelési időt 4 órára módosítva is elvégeztük a vizsgálatot. Az apoptózis arány meghatározása a kezelés kezdete után 24, ill. 48 órával történt. Az 5-FU, illetve a kombinált kezelés hatására szignifikánsan megnövekedett apoptózis arányt 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. ábra B).

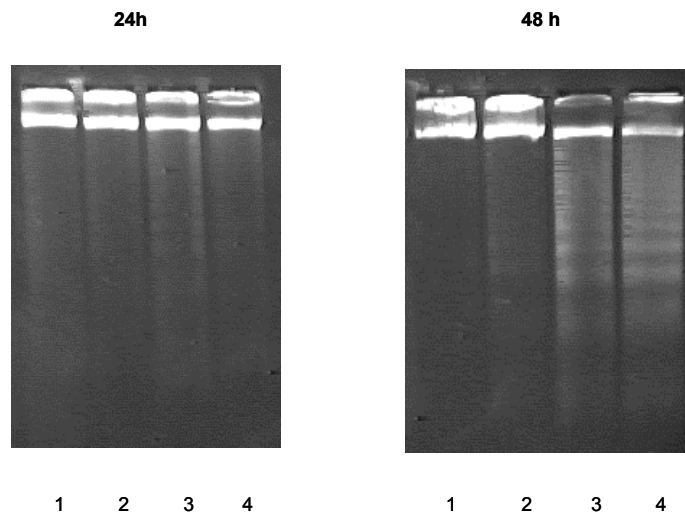


4.ábra Az apoptózis arány változása 5-FU és EUdR kezelést követően SW620 sejtvonalon. A= folyamatos kezelés, B= 4 órás kezelés (Az apoptotikus és nekrotikus sejtek számolása Bürker kamrában történt. (Három kezelés után számolt átlag \pm standard deviáció értékei)

* $p < 0,01$, ** $p < 0,000001$ vs kontroll, # $p < 0,000001$ vs 5-FU kezelt

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).

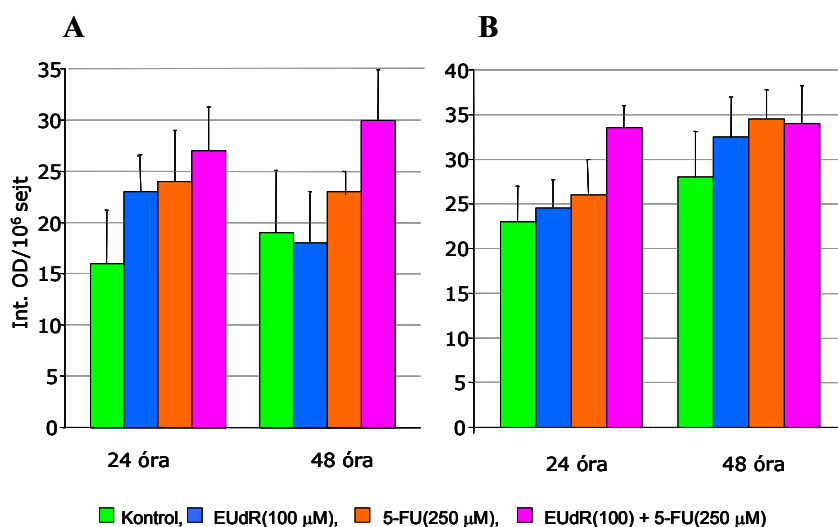


5.ábra DNS fragmentáció vizsgálata 5-FU és EUdR kezelés során SW620 sejtvonalon.

1: Kontrol, 2: 100 μ M EUdR, 3: 250 μ M 5-FU, 4: 100 μ M EUdR + 250 μ M 5-FU folyamatos kezelés

A kombinált kezelés során megfigyelt, emelkedett apoptózis aránnyal kapcsolatosan vizsgáltuk a p53 expresszió változását. Ezen kívül meghatároztuk a PCNA protein expresszió mértékét az EUdR és 5-FU kezelés után. (15.ábra)

Az 5-FU kezelés után mért, kissé emelkedett p53 expresszió az EUdR hatására tovább nőtt és ez a változás a kezelést követően 48 óra elteltével kifejezettebb volt (6.ábra A.). A PCNA expresszió a kezelést követően 24 órával az 5-FU+EUdR kombináció esetén megnőtt, 48 óra elteltével az expresszió mértéke nem különbözött az 5-FU-val, ill. az 5-FU+EUdR kombinációval kezelt mintákban (6.ábra B).



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

Western technika: mintánként 100 μ g fehérje. (A) p53 és (B) PCNA expresszió változása

Következtetés: Az 5-FU citotoxikus hatását az EUdR dózisfüggően potenciózta. A gyógyszerkombináció, a korábbiakban már megállapított TS és DPD expresszió gátlása mellett fokozta a sejtek G2/M átmenetben való felhalmozódását, a timidin beépülését a DNS-be és az apoptózis kialakulását. Az EUdR továbbá potenciálta az 5-FU által okozott p53 fehérje expresszió növekedését.

4.altéma Összefüggés a terápia megkezdése előtt meghatározott génpolimorfizmusok valamint a betegek kezelésre adott válasza/mellékhatásai és a betegség lefolyása között

A colorectális daganatok esetében a gyógyszerek hatékonyságában és toxicitásában megmutatkozó interindividuális különbségek hátterében számos tényező állhat, melyek közül a gyógyszerek farmakokinetikájában és a target gén, a TS gén-polimorfizmusában mutatkozó különbségek mellett a folát anyagcsere egyéb génjei (MTHFR, SHMT) is fontos szerepet játszhatnak a betegek gyógyszerekkel szembeni érzékenységében

4.1 A metiléntetrahidrofolát-reduktáz (MTHFR) C677T polimorfizmus klinikai jelentősége a metasztatikus colorectális daganatok 5-fluoropirimidin alapú kezelésében

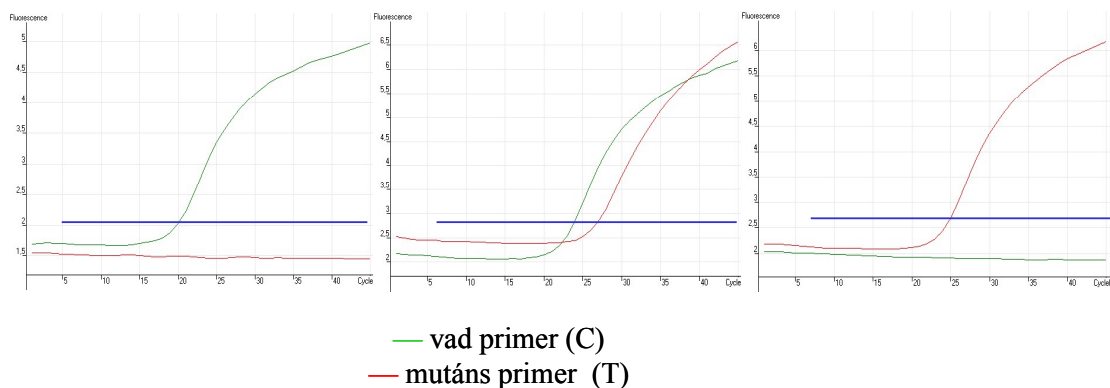
A metiléntetrahidrofolát reduktáz (MTHFR) a folát anyagcsere kritikus enzime, mely irreverzibilisen katalizálja az 5,10-metiléntetrahidrofolát (MTHF) → 5-metil-tetrahidrofolát átalakulást és elősegíti a homocisztein remetilációját, ezáltal metil donort szolgáltatva a DNS metilációhoz. Az eddig leírt MTHFR génpolimorfizmusok közül a C677T (Ala →Val) SNP fordul elő leggyakrabban. A homozigóta mutáns (TT) esetekben az enzimaktivitás 30 %-ra csökken. Emiatt felhalmozódik az 5,10-metilén-THF, mely a timidilát de novo bioszintézis kofaktora és ezáltal a DNS szintézis előnybe kerül a DNS metilációval szemben. Az MTHF felhalmozódásának szerepe lehet az colorectalis tumoros betegek 5-fluorouracil alapú kezelésre adott válaszában, mivel az 5-FU metabolitja, az 5-fluoro-2'-deoxiuridin-5'-monofoszfát (FdUMP), a timidilát szintáz (TS) és az MTHF egy stabil ternier komplexet képez. A komplex-képzés nyomán a TS aktivitás gátlódik és ez intracelluláris timidin hiányhoz vezet és végül a DNS szintézis leáll. A megemelkedett intracelluláris MTHF szint elősegíti a ternier komplex képződést és stabilitást, 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.

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

A vizsgálatba 101 metasztatikus colorectalis 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.

Az MTHFR genotípezálására alkalmazott RFLP-PCR **módszer** időigényes és nagyszámú minta rutinszerű vizsgálatakor nehézkes. Ezért kidolgoztunk egy real-time PCR készüléken kivitelezhető, nagy mintaszám genotípezálásához alkalmas módszert. Ezzel párhuzamosan a plazma homocisztein szintjének meghatározását HPLC-re kifejlesztett kittel (Homocystein

HPLC, Immundiagnostic) végezzük. A vérből a homocisztein méréshez szükséges plazma szeparáció után magvas fehérvérsejtet szeparáltunk (Ficoll, Pharmacia), majd ebből (MasterPure™ Genomic DNA Purification Kit, Epicentre) vagy a teljes vérből (ReadyAmp Genomic DNA, Promega) DNS-t preparáltunk. A DNS-ből 2 mintás real-time PCR módszerrel határoztuk meg az MTHFR genotípust SybrGreen I festéssel. Három oligot terveztünk, melyből kettő allélspecifikus. Az allélspecifikus primer esetében csak a megfelelő szekvenciánál indul el az amplifikáció. Az egyik csőbe a vad típusú primer (C), míg a másikba a mutáns szekvencián elinduló (T) primer kerül. A homozigoták esetén csak az egyik vagy a másik csőben mérhető a fluoreszcencia intenzitásának növekedése, a heterozigota típus mindkét csőben amplifikálódik. A ΔCt küszöbértékét (± 5) 100 minta genotípusának két módszerrel (real-time és RFPL-PCR) történő egyidejű meghatározásával állítottuk be. (7. ábra)

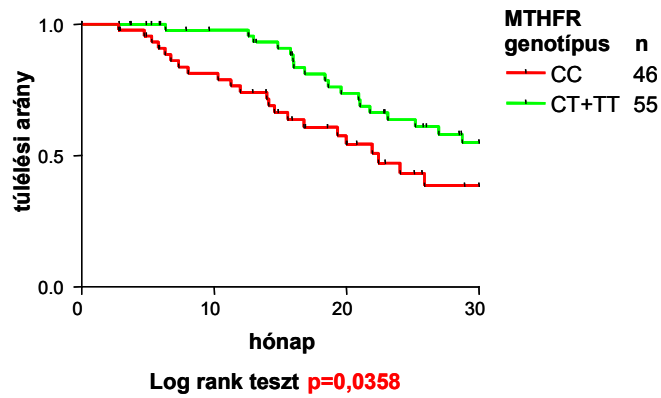


| | | | |
|----------------------|---------|----------|---------|
| Ct_{vad} | 20,05 | 23,61 | > 45,00 |
| $Ct_{\text{mutáns}}$ | > 45,00 | 26,95 | 25,02 |
| ΔCt | < - 5 | [- 5, 5] | > 5 |
| MTHFR genotípus | CC | CT | TT |

7. ábra MTHFR genotípusok meghatározása real-time PCR alkalmazásával

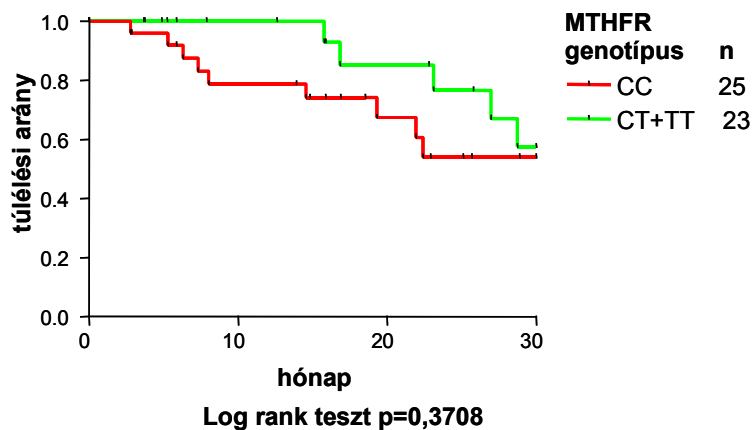
Eredmények:

Nem találtunk szignifikáns eltérést a nem, tumor lokalizáció, 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 átlag túlélés viszont hosszabb a T alléllal rendelkező betegek esetében és ez a különbség a Kaplan-Meier kiértékelésnél szignifikáns ($p=0.035$) (8. ábra).

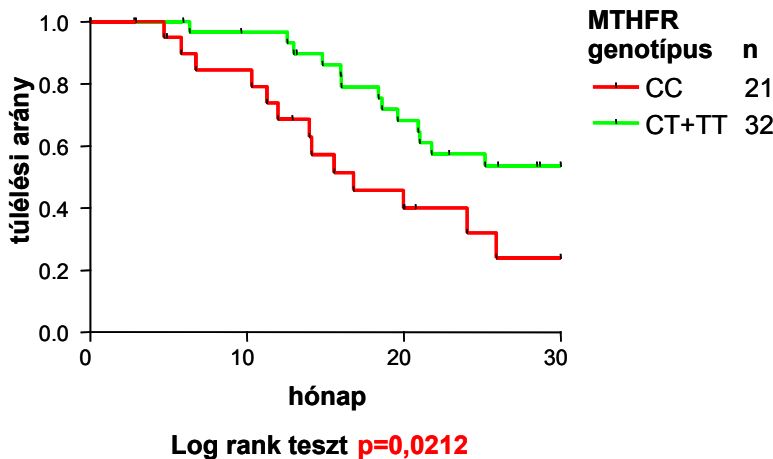


8.ábra A MTHFR C677T polimorfizmus alapján csoportosított metasztatikus colorectalis tumoros betegek teljes túlélése

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/sigma tumoros betegek esetében volt szignifikáns ($p=0,0212$). (9.,10 ábra)



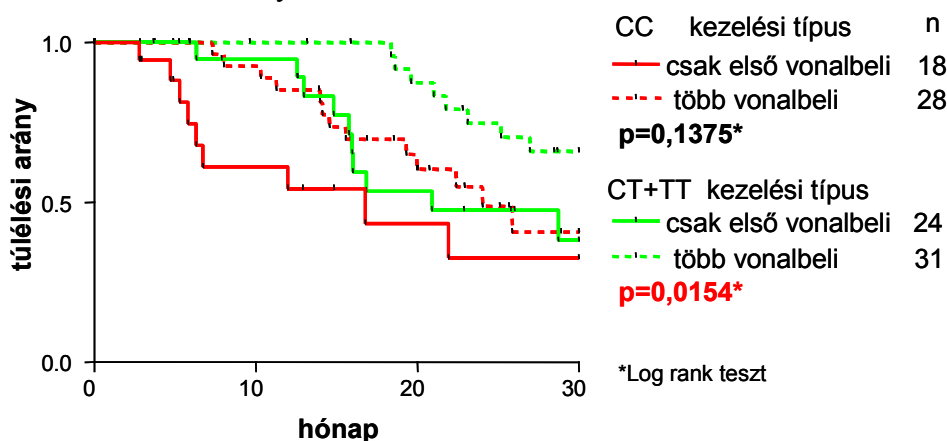
9.ábra A MTHFR C677T polimorfizmus alapján csoportosított metasztatikus rectum tumoros betegek teljes túlélése



10.ábra A MTHFR C677T polimorfizmus alapján csoportosított metasztatikus colon+sigma tumoros betegek teljes túlélése.

Feltételezve, hogy az 5-FU-alapú kemoterápia eredményesebb a hosszantartó, több kezelési vonalon átnyúló esetekben, ennek megfelelően csoportosítottuk azokat a betegeket, akik csak elsővonalbeli kezelést kaptak, szemben azokkal, akik másod- vagy harmadvonalban is 5-FU-alapú kezelésben részesültek. Mindkét genotípusnál a hosszantartó kezelés esetén nyilvánvaló a hosszabb túlélés és ez a különbség a T alléllal rendelkező betegek esetén szignifikáns ($p=0.0154$). (11. ábra)

A Cox regressziós analízis alapján, - a relatív rizikó a CC genotípus esetében 2,8 a T alléllal rendelkezőkhöz viszonyítva.



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

Következtetésként megállapítható, hogy a MTHFR C677T polimorfizmus meghatározása a 5-fluoropirimidin kezelésű metasztatikus colorectalis 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)

4.2 Szerin hidroximetil-transzferáz C1420T gén polimorfizmus vizsgálata CRC-s betegekben és egészséges egyéneknél

A szerin hidroximetil-transzferáz (SHMT) egy kulcsfontosságú folát anyagcsere enzim, amely B6 vitamin jelenlétében katalizálja a THF (tetrahidrofolát) és szerin átalakulását 5,10-metiléntetrahidrofoláttá (5,10-MTHF) valamint glicinné, reverzibilis reakcióban. Az 5,10-MTHF fontos intermedier a metilcsoport-háztartásban és ezáltal a DNS-metilációban, valamint részt vesz a nukleotid bioszintézisben mint a timidilátszintáz fontos kofaktora.

A SHMT enzim két változata ismert, a SHMT1 (cSHMT) a citoszolban és a SHMT2 (mSHMT) a mitokondriumban.

A citoszolikus izoforma génjén egy feltehetően funkcionálisan aktív génpolimorfizmus, a C1420T szubsztitúció ismert, amely befolyásolja a plazma folsav szinteket.

Nincs adat arra vonatkozóan, hogy a fenti polimorfizmus mennyiben befolyásolja az SHMT enzim működését.

Célkitűzés:

Az SHMT polimorfizmus vizsgálatára alkalmas technika beállítása és colorectális tumoros (CRC) betegek valamint egészséges egyének véréből származó DNS minták polimorfizmus megoszlásának összehasonlítása. A további vizsgálatok során választ keresünk arra a kérdésre, hogy a CRC-s betegnél előforduló genotípusok befolyásolják-e az 5,10-MTHF szintet és ennek van-e jelentősége a TS targetre ható citotoxikus hatású gyógyszerek hatásában.

Módszerek:

CRC-s betegek perifériás lymphocitáiból DNS-t izoláltunk MasterPure™ (Epicenter) genomiális DNS-tisztító kit segítségével. Kontrollként egészséges véradók savómentesített véralvadékából izoláltunk DNS-t. (ReadyAmp™, Promega)

Az SHMT1 C1420T genotipizálást két technikával végeztünk:

I: PCR RFLP módszerrel:

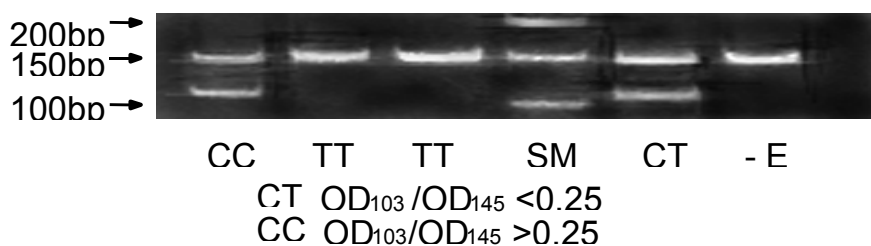
5'-CAG-AGC-CAC-CCT-GAA-AGA-GTT-C-3'(FWD) és

5'-AGT-GGG-CCC-GCT-CCT-TTA-3' (REV) primerekkel kiemelt amplikont

Eam1104I (Fermentas) restrikciós endonukleázos fragmens analízissel tipizáltuk.

(12.ábra).

12.ábra Az SHMT C1420T genotípusok vizsgálata PCR RFLP módszerrel



II: TaqMan próbás valósídejű PCR –al

az előbbi primerek és két allélspecifikus próba

5’FAM-CGC-CTC-TCT-CTT-C-MGB3’ és

5’-JOE-CGC-CTC-TTT-CTT-C-MGB3’ (ABI) segítségével egy közös mixben történő génamplifikációval.

A vizsgálat kiegészítéseként plazma homocisztein szinteket határoztunk meg reverz fázisú HPLC-s technikával, fluoreszcens detektálás mellett, KC2801 kit

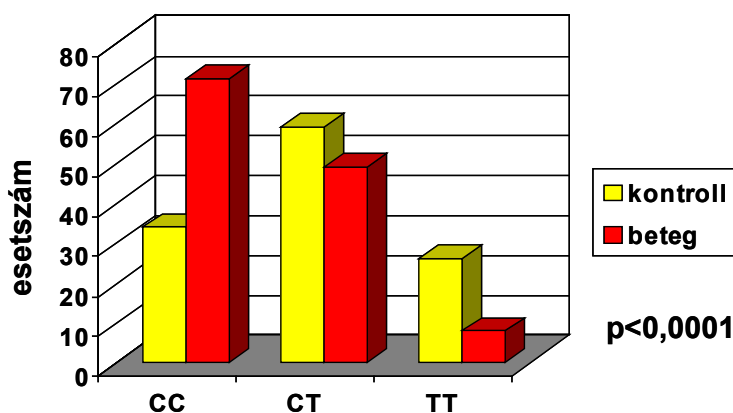
(ImmunDiagnostik) alapján. (13.ábra).

13.ábra Az SHMT C1420T genotípusok meghatározása TaqMan RT-PCR módszerrel

Eredmények:

Az alkalmazható PCR-RFLP technika képes kvalitatívan jól elkülöníteni a TT genotípusokat, viszont a CC / CT megkülönböztetés csak gél-fluoreszcencia denzitálással oldható meg. (12.ábra). A TaqMan próbás Real-time PCR-os módszer érzékenysége megfelel a genotípusok meghatározására. (13.ábra)

A vizsgált kontrollpopuláció SHMT1 C1420T genotípus megoszlása nem tért el az ismert kaukázusi populációs eloszlásától. A CRC-s és a kontroll populációk genotípus frekvenciái megfelelnek a Hardy-Weinberg eloszlásnak. A vizsgált CRC populáció SHMT1 genotípus frekvenciái nem térnek el kor, nem és lokalizáció szerint, viszont szignifikánsan eltérnek a kontroll populációétól.

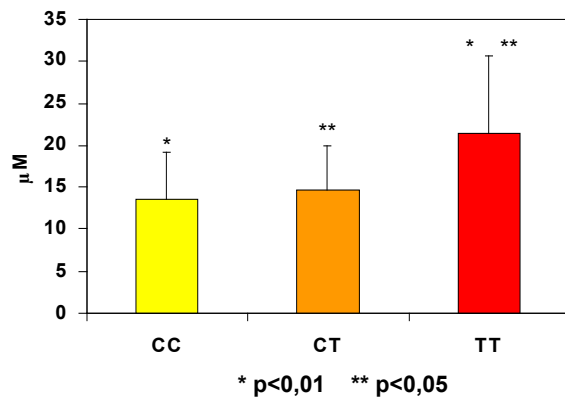


14.ábra Az SHMT C1420T polimorfizmus genotípus megoszlása a kontrollok és CRC-s betegek esetében

A T típusú allél alacsonyabb frekvenciája a beteg csoportban felveti a colorectális daganatos megbetegedésre való SHMT1 polimorfizmus szerinti eltérő genetikai fogékonyság lehetőségét. (14.ábra)

A folát metabolizmus befolyásolását támasztják alá a betegek SHMT1 genotípus szerinti eltérő homocisztein értékei. (15.ábra)

A továbbiakban vizsgált CRC-s betegek klinikai adatainak elemzésével összefüggést keresünk a terápiára adott válasz a SHMT genotípusok és a homocisztein szint között.



15.ábra CRC-s betegek homocisztein átlag értékei (+SD) genotípus szerinti megoszlásban

4.3. Farmakogenetikai módszerek a terápia során fellépő súlyos mellékhatások előrejelzésére

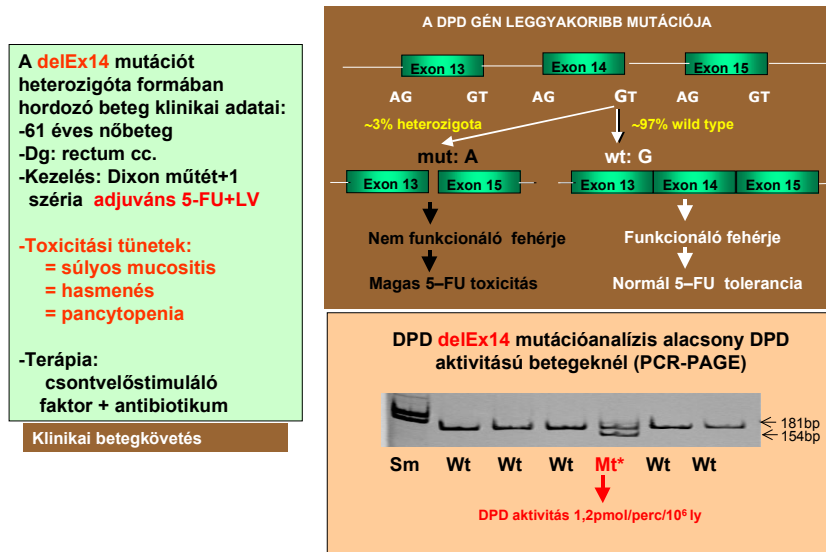
A farmakogenomikai módszerek nemcsak a betegek prognózisának, a gyógyszerekkel szembeni érzékenységének prediktálására alkalmasak, hanem igen gyakran a nemvárt, súlyos mellékhatások előrejelzéséhez illetve megértéséhez is segítséget jelentenek.

4.3.1. DPD IVS14+1G- →A mutáció vizsgálata CRC-s betegeken

A korábbi jelentésünkben már említett dihidropirimidin dehidrogenáz (DPD), az 5-FU lebontó enzime, igen fontos prediktora az 5-fluoropirimidin terápia során fellépő súlyos, (esetleg életet veszélyeztető) mellékhatásoknak. Az enzim alacsony (< 5 pmol/perc/10⁶ lymphocyt) értéke a terápia során fellépő mellékhatások előrejelzője. Az enzim vizsgálatát rendszeresen végezzük az OOI-ben és más onkológiai központokban kezelt CRC-s betegek részére. Eddig 785 vizsgálatot végeztünk, (lásd 4.táblázat) és a betegek kb. 5 %-ában találtunk súlyos DPD hiányt.

Az alacsony aktivitás hátterében gyakran a DPD 14-es exonján található G→A pontmutációja felelős, amely 14-es exon kieséshez és ezáltal nem funkcionáló enzim szintéziséhez vezet, amely már heterozigóta formában is igen súlyos, életet veszélyeztető toxicitás kialakulását eredményezi. A mutáció vizsgálatát RFLP módszerrel végezzük (16.ábra)

Következtetés: Alacsony DPD aktivitás és vagy *IVS14+1G-→A* mutáció esetén fluoropirimidin terápia alkalmazása tilos, helyette más gyógyszert (pl. irinotecan) kell alkalmazni.



16.ábra A DPD hiány klinikai következményei és farmakogenetikai analízise

4.3.2 MTHFR C677T génpolimorfizmus és a MTX farmakokinetikai vizsgálatának jelentősége nagy dózisú MTX kezelésben részesült osteosarcomás beteg esetében kialakult súlyos toxicitás esetén

A nagy dózisú methotrexat (MTX) az osteosarcoma neoadjuváns és adjuváns kezelésének a legfontosabb gyógyszere. A kezelést követően fellépő akut és krónikus mellékhatások azonban jelentős klinikai problémát okozhatnak. A metiléntetrahidrofolát redukáz (MTHFR) kulcsfontosságú szerepet játszik a folát anyagcserében, polimorfizmusa, mint azt már korábban említettük, mutáns homozigóta (TT) formában 70%-al csökkent enzimaktivitással jár és antimetabolittal (MTX) történő kezelés esetén a homocysteinemia fokozódását és súlyos toxicitást okozhat.

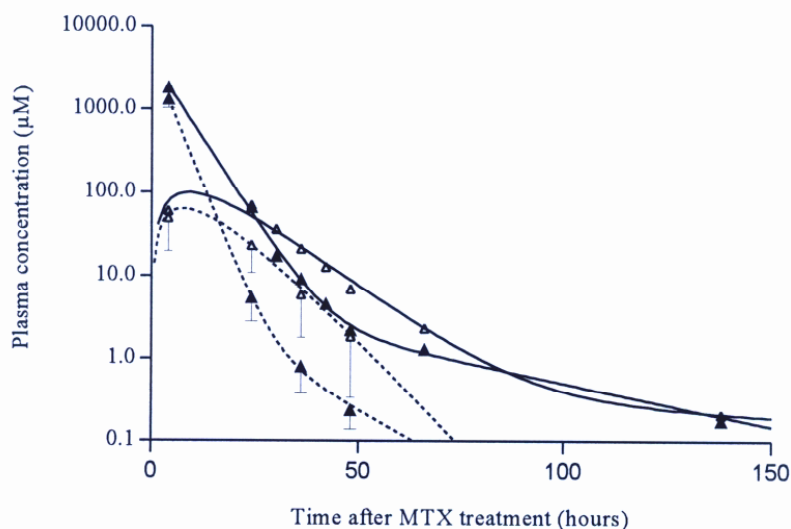
Vizsgálataink során az Semmelweis Egyetem II.Gyermekklinikáján kezelt osteosarcomás betegek véréből szeparált DNS mintákban rendszeresen meghatározzuk az MTHFR génpolimorfizmust és farmakokinetikai módszerrel követjük a MTX szint ürülését.

A két módszer együttes jelentőségét a nagy dózisú MTX által okozott súlyos mellékhatás monitorozásában egy beteg példáján keresztül kívánjuk bemutatni.

10 éves osteosarcomás beteg nagy dózisú MTX (12 g/m²/6h) kezelése során 20 perccel a gyógyszer beadása után kialakult akut neurológiai (encephalopathia) és WHO Gr III-IV hepatotoxicitás miatt vizsgáltuk a MTHFR 677C→T génpolimorfizmusát (17.ábra) és a MTX farmakokinetikáját követtük nagynyomású folyadékkromatográfiás módszerrel (18.ábra).



17.ábra MTHFR genotípus meghatározás osteosarcomás gyerekek DNS mintájából. PCR-RFLP analízis Hinf I restrikciós enzim alkalmazásával. MTHFR genotípusok: CC = vad homozigóta, CT = heterozigóta és TT = mutáns homozigóta, * = vizsgált beteg.



18.ábra A plazma methotrexat (MTX) és 7-OH-MTX koncentrációjának változása nagy dózisu (12 g/m²/6h) MTX kezelés után.▲=MTX,△= 7-OH-MTX, — vizsgált beteg, ●●● 20, nagy dózisu MTX kezelt osteo-sarcomás beteg átlaga ± SD értéke

Eredmények:

A beteg MTHFR genotípusa TT homozigóta volt és a 9.ábrán látható, hogy a hozzá hasonlított 20 nagy dózisu MTX-tal kezelt beteghez képest igen elhúzódó szérumszintű MTX és 7-OH-MTX szintet lehetett kimutatni a toxicitást szenvedett beteg esetében. Az eliminációs félidő értékei különösen a $t_{1/2\beta}$ igen jelentősen meghosszabbodott a toxicitást szenvedett beteg esetében. (4. táblázat.)

3. Táblázat A MTX és a 7-OH-MTX eliminációs félidő értékei a toxikus esetben és az osteosarcomás kontroll csoportban

| Mért paraméter | Eliminációs félidő (óra) | |
|-----------------------------------|--------------------------|------------------|
| | $t_{1/2\alpha}$ | $t_{1/2\beta}^*$ |
| MTX (beteg) | 3.96 | 29.45 |
| 7-OH-MTX (beteg) | 8.55 | 99.75 |
| MTX (kontroll csoport, n=20) | 2.44 | 10.87 |
| 7-OH-MTX (kontroll csoport, n=20) | 5.28 | - |

Feltételezhetően a súlyos MTX toxicitás a MTHFR C677T polimorfizmus TT homozigótásága következtében fellépő hiperhomocisteinaemiának köszönhető, amely a folát státuszban okozott zavarok következtében a központi idegrendszert az antimetabolit hatásával szemben sérülékenyebbé tette. Ez, együtt a jelentősen elhúzódtó MTX clearance-szel vezetett a súlyos toxicitás kialakulásához

Nagy dózisú MTX kezelés előtt javasolható a a MTHFR C677T polimorfizmus és a plazma homocisztein koncentrációjának meghatározása.

A vizsgálatok klinikai hasznosítása: a fenti beállított és értékelt paramétereket rutinszerűen vizsgáljuk és leletezzük az OOI betegosztályai, valamint számos külső onkológiai centrum részére. (4. Táblázat)

4. Táblázat

Az NKFP 1/48/2001 pályázat támogatásával bevezetett prognosztikai markerek rutinszerűen végzett vizsgálata vastag és végbélrákos betegeken

| Év | Beérkezett minták száma | |
|-----------|-------------------------|----------------------|
| | OOI* | Külső ** intézmények |
| 2002 | 187 | 16 |
| 2003 | 271 | 17 |
| 2004 | 260 | 44 |
| Összesen: | 708 | 77 |

* OOI. Országos Onkológiai Intézet

**Külső intézmények: Szegedi Egyetem Onkoradiológiai Kp., Debreceni Egyetem Onkológia, Semmelweis Egyetem Radiológiai Klinika, Pécsi Egyetem Onkológia, Uzsoki u-i kh., Péterfy S. u-i kh., Szt.Margit kh.

RP 8/B Kralovánszky J. és mtsai.

Publikációk

- 1.) Kralovánszky J., Köves I., Orosz Zs., Katona Cs., Tóth K., Rahóty P., Czeglédi F., Kovács T., Budai B., Hullán L., Jeney A.: Prognostic significance of the thymidylate biosynthetic enzymes in human colorectal tumors. *Oncology* 2002, 62: 167-174.
- 2.) Adleff V., Hitre E., Köves I., Orosz Zs., Kralovánszky J.: Heterozygote advantage for thymidylate synthase polymorphism in colorectal cancer: a Hungarian case-control study. *Int. J. Cancer* 2004, 108: 852-856.
- 3.) Katona Cs., Tímár F., Oláh J., Bócsi J., Budai B., Ötvös L., Kralovánszky J.: Az 5-fluorouracil (5-FU) hatékonyságának fokozása. Az 5-FU és 5-etil-2'-dezoxiuridin kombináció hatásában szerepet játszó molekuláris mechanizmusok. *Magyar Onkológia* 2004, 48/3:243-251.
- 4.) Budai B., Hitre E., Adleff V., Czeglédi F., Gyergyay F., Láng I., Kralovánszky J.: A metiléntetrahidrofolát-reduktáz (MTHFR) C677T polimorfizmus klinikai jelentősége a metasztatikus colorectalis daganatok 5-fluoropirimidin alapú kezelésében. *Magyar Onkológia* 2004, 48/3: 253-257
- 5.) Kralovánszky J.: A kolorektális rákok gyógyszeres terápiájának hatékonyságát meghatározó tényezők. *MOTESZ magazin* 2004/2 15-23.
- 6.) Ötvös L., Jeney A., Kralovánszky J., Veres Zs.: Drug development based on pharmacokinetic investigation of pyrimidine nucleosides. In: *Monoamine Oxidase inhibitors and their role in neurotransmission (drug development)* Eds: Török TL and Klebovich I. pp 231-250 *Medicina*, 2004
- 7.) Müller J., Kralovánszky J., Adleff V., Pap É., Németh K., Fekete Gy., Kovács G.: Toxic encephalopathy and delayed MTX clearance after high-dose methotrexate therapy in a child homozygous for the MTHFR C677T polymorphism. *Cancer Chemotherapy Pharmacology* (submitted 2004)

Megjelent absztraktok

- 1.) Adleff V., Kovács T., Czeglédi F., Hitre E., Gyergyay F., Orosz Zs., Kralovánszky J.: Timidilátszintáz génpolimorfizmusok hatása a TS enzimaktivitás alakulására daganatos és környező szövetekben. *Magyar Onkológia* 2001 45/3: 249, (Abstr.)
- 2.) Kralovánszky J., Köves I., Rahóty P., Kovács T., Czeglédi F., Adleff V., Budai B., Katona Cs., Orosz Zs.: A pirimidin metabolikus enzimek prognosztikai jelentősége emberi colorectalis daganatokban. *Magyar Onkológia* 2001, 45/3:288,. Abs.102.
- 2.) V. Adleff, T. Kovács, E. Hitre, Zs. Orosz, J. Kralovánszky: Thymidylate synthase (TS) promoter and 3'UTR polymorphisms in Hungarian colorectal cancer population and their association with TS activities in colon mucosa tissues. *XIVth World Congress of Pharmacology San Francisco Pharmacologist* 44: (Suppl.1.) abs. 76.16. 2002.
- 3.) Adleff V., Szarvas T., Budai B., Gazdag A., Hitre E., Kovács T., Kovalszky I., Kralovánszky J. Heterozigotáság vesztes jelentősége a timidilátszintáz génlókus környezetében (18p11.32) kolorektális daganatos szövetekben. *Magyar Onkológia* 2003; 47/3: p.235 Abs No.1.

- 4.) Kralovánszky J., Pandi E., Adleff V., Katona Cs., Budai B., Hitre E., Kovács T., Czeglédi F., Gyergyay F., Gazdag A., Orosz Zs.: The role of prognostic and predictive markers in the selection of optimal chemotherapy in colorectal cancers. *Magyar Onkológia* 2003; 47/3:p. 278 Abs No.123
- 5.) P.Gazdag A., Adleff V., Budai B., Czeglédi F., Hitre E., Orosz Zs., Kralovánszky J.: Metiléntetrahidrofolát-reduktáz (MTHFR) C677T génpolimorfizmus vizsgálata colorectális daganatos betegek és egészséges kontrollok esetében *Magyar Onkológia* 2003; 47/3:p.295 Abs No.178
- 6.) Hitre E., Adleff V., Budai B., Ganovszky E., Horváth Zs., Juhos É., Szabo E., Láng I., Czeglédi F., Orosz Zs., P.Gazdag A., Kralovánszky J.: Timidilátszintáz génpolimorfizmusok összefüggése colorectális daganatos betegek 5-fluorouracil (5-FU) terápiára adott válaszával. *Magyar Onkológia* 2003; 47/3 p.265 Abs No.87
- Pap É., Hitre E., Pandi E., Budai B., KRALOVÁNSZKY J.: Vastagbél daganatos betegek de Gramont kezelésének farmakokinetikai követése. *Magyar Onkológia* 2003, 47/3: p.297, (Abs)
- 7.) E.Hitre, V.Adleff, B.Budai, E. Szabó, Z.Horváth, I.Láng, F.Czeglédi, Z.Orosz, A.Gazdag, J.Kralovánszky: Thymidylate synthase gene polymorphism affect disease-free (DFS) and overall survival (OS) of colorectal cancer (CRC) patients treated with adjuvanr 5-fluorouracil-folinic acid (FUFA) *Proc. ASCO* 2004 p.265 Abs. 3581
- 8.) Adleff V., Szarvas T., Budai B., Gazdag A., Hitre E., Kovács T., Kovalszky I., Kralovánszky J.: Role of allelic imbalance at the thymidylate synthase gene locus in CRC patients. *EACR Congress Innsbruck* 2004, p.84 Abs.103
- 9.) Budai B., P.Gazdag A., Adleff V., Czeglédi F., Hitre E., Kralovánszky J.: Investigation of methylenetetrahydrofolate reductase (MTHFR) C677T polymorphism in 5-fluorouracil 85-FU) treated patients with colorectal cancer. *EACR Congress Innsbruck* 2004, p.311 Abs.532
- 10.) Pandi E., Adleff V., Budai B., Hitre E., Czeglédi F., Gyergyay F., Szabó E., Horváth Zs., P.Gazdag A., Kralovánszky J.: The frequency of dihydropyrimidine dehydrogenase (DPD) deficiency in a Hungarian colorectal cancer (CRC) population: lack of correlation between very low DPD values and the DPD IVS1G→A mutation. *Anticancer Research* 2004, 24: p.3581 Abs.381