

52 Pilotní výsledky komplexního farmakogenetického sledování pacientů léčených protinádorovou chemoterapií s 5-fluorouracilem zaměřené na deficienci dihydropyrimidin dehydrogenázy.

Demlová R.¹, Bednaříková M.¹, Riedlová P.², Dušek L.⁴, Kuilenburg A.³, Votavová I.¹, Valík D.¹

1) Masarykův onkologický ústav, Brno

2) Onkologické centrum J. G. Mendela, Nový Jičín

3) Academic hospital Amsterdam, The Netherlands

4) Institut biostatistiky a analýz

Úvod

Interindividuální variabilita farmakokinetických parametrů po podání fluorouracilu byla prokázána v celé řadě studií, s variabilitou v rozmezí 10-40 %. Farmakokinetické parametry jsou závislé, podobně jako i u jiných léčiv, na řadě obecně známých faktorů, jako jsou např. dávka, cesta podání a dávkový režim, váha, tělesný povrch (BSA), věk, pohlaví, stav jaterních a renálních funkcí apod. Další faktor, který může farmakokinetiku fluorouracilu intenzivně ovlivnit, spadá svou povahou již mezi faktory farmakogenetické a je jím případný genetický polymorfismus katabolického enzymu dihydropyrimidindehydrogenázy (DPD).

Enzym dihydropyrimidindehydrogenáza katalyzuje konverzi 5-FU na jeho metabolit fluoro-5,6-dihydrofluorouracil (DHFU), a ten je následně přeměněn na fluoro-beta-ureidopropionát a fluoro-beta-alanin, a to za pomoci enzymů dihydropyrimidinázy a ureidopropionázy.

Dihydropyrimidindehydrogenáza (DHPD) je tak iniciálním a „rate-limiting“ enzymem odpovědným za katabolismus 5-fluorouracilu, zapojeným v třístupňové katabolické dráze uracilu a thyminu vedoucí ke tvorbě beta-alaninu a beta-aminoisomáselné kyseliny.

Významná interindividuální variabilita v clearance fluorouracilu, odpovědi nádoru na léčbu a především v pozorované toxicitě může být dána právě genetickými rozdíly v aktivitě DPD.

Vlastní projekt realizovaný v MOÚ

Jak již bylo uvedeno výše, vzhledem ke komplexnosti problematiky metabolizace 5-fluorouracilu byl navržen protokol komplexního farmakogenetického sledování, který v sobě zahrnuje jak vyšetření genotypu, tak i stanovení farmakokinetických parametrů u pacientů, kterým byl podáván 5-fluorouracil v rámci léčby jejich nádorového onemocnění.

Primárním cílem bylo vyhodnotit a případně korelovat výsledky získané molekulární analýzou vybraných mutací DPD, farmakokinetickým monitorováním 5-FU a získanými klinickými daty.

Do projektu byli dle níže uvedených vstupních a vylučujících kritérií zařazováni pacienti léčení v Masarykově onkologickém ústavu, a to po podepsání Informovaného souhlasu schváleného Etickou komisí MOÚ. Hodnotitelný soubor obsahoval data získaná celkově od 41 pacientů, molekulárně-genetické vyšetření genu pro DPD pomocí jeho sekvenace pak bylo provedeno u 23 pacientů.

K vyhodnocení základních farmakokinetických parametrů 5-fluorouracilu a jeho metabolitu 5,6-DHFU byly provedeny odběry krve, u všech pacientů vždy při první sérii chemoterapie. Objem odebírané krve byl 1,5 ml/ každý vzorek, frekvence a čas odběrů byl závislý na zvoleném režimu chemoterapie:

U všech pacientů bylo v průběhu chemoterapie a následně i po jejím ukončení provedeno hodnocení nežádoucích účinků dle NCI kritérií.

Nežádoucí účinky chemoterapie pak byly skórovány dle jejich četnosti a stupně závažnosti (ve škále 0 (žádný) – 4 (maximální). U více než poloviny pacientů byl zaznamenán minimálně jeden nežádoucí účinek související s podávanou chemoterapií. Nejčastěji se objevovaly průjem a mukositida, tedy očekávaná slizniční toxicita ve vztahu k 5-FU, a dále pak nechuť k jídlu a granulocytopenie. Stupeň závažnosti byl u uvedených nežádoucích účinků podobný, nejčastěji se pohyboval mezi stupněm 1-2, pouze v případě granulocytopenie bylo dosahováno závažnějšího stupně 2-4. Lze obecně konstatovat, že žádný ze zaznamenaných nežádoucích účinků nebyl dominující a že celkově byl stav pacienta komplikován spíše kumulací jednotlivých nežádoucích účinků.

Současně lze také vysledovat, že narůstající počet nežádoucích účinků u daného pacienta většinou koreluje se závažnějším stupněm zaznamenané toxicity, která rovněž v čase narůstá. Na základě těchto faktů bylo pro hodnocení toxicity navrženo komplexní skórování toxicity („comprehensive severity score“), které logicky agreguje četnost a stupeň závažnosti včetně jejich vývoje v čase.

Agregace incidence a stupně závažnosti zaznamenaných nežádoucích účinků v komplexním skórování toxicity I-IV („comprehensive severity score“)

LABORATORNÍ DIAGNOSTIKA NÁDORŮ

No. of toxic effects per patient (summed for the 1st series of CHT)	Grade of toxic effects in summary	Patients with further escalated toxicity in time (%)
0 (N = 20)	–	35 %
1-2 (N = 13)	1 (1; 2)	23 %
3-4 (N = 8)	2 (1; 4)	63 %

Most frequent types of toxic effects and their severity (grade)

Diarhea (N = 13)	1 (1; 2)
Anorexia (N = 11)	1 (1; 2)
Mucositis (N = 10)	1 (1; 2)
Granulocytopenia (N = 7)	2 (2; 4)
Nausea (N = 7)	1 (1; 2)
Leukopenie (N = 6)	1 (1; 2)
Fatigue (N = 6)	1 (1; 2)

Proposed comprehensive severity score

I (N = 13; 31.7 %)	0	0 %
II (N = 13; 31.7 %)	1 (1; 2)	38.5 %
III (N = 10; 34.4 %)	2 (1; 3)	50.0 %
IV (N = 5; 12.2 %)	2 (2; 4)	100 %

- **I:** Patients without any toxic effects, both during the 1st series of CHT and during further therapeutic steps
- **II:** Patients with weak toxic effects (max. 2 events) with typical grade 1. N = 7 patients without any toxic effects during 1st series of CHT but with subsequent complications, again of relatively low grade
- **III:** Patients with moderate to severe complications, during 1st series of CHT (up to 3 events). Grade ranges from 1 to 3.
- **IV:** Patients with very severe and cumulated complications, during 1st series of CHT >2 events, typically with elevated grade degree. All patients suffered from escalated toxicity during further therapeutic steps.

Z publikovaných literárních údajů vyplývá, že hodnotu AUC lze považovat za vhodný farmakokinetický parametr, který má prediktivní hodnotu ve vztahu k očekávané farmakodynamice léčiva.

Stanovení AUC bylo provedeno jak u mateřského léčiva 5-FU, tak i u jeho metabolitu 5,6-DHFU. Následně byl kalkulován poměr obou AUC a provedena statistická korelace mezi naměřenými hodnotami a nežádoucími účinky léčiva.

Primární hodnoty AUC byly při statistickém vyhodnocení z důvodu dosažení symetrického rozložení a homogenní odchyly logaritmizovány. Statistickou analýzou byla následně potvrzena statisticky významná závislost mezi parametry AUC (5-FU, 5,6-DHFU) a nežádoucími účinky podávané chemoterapie s 5-FU.

Výsledky

- AUC_{5-FU} dosahuje signifikantně vyšších hodnot u všech skupin pacientů, u kterých byly zaznamenány jakékoliv nežádoucí účinky bez ohledu na stupeň jejich závažnosti (tedy u skupin II-IV při použití komplexního skórování toxicity). U skupiny II a III-IV jsou průměrné hodnoty AUC 2,6 (1.4,3.3) □ mol.l⁻¹.min⁻¹, resp. 2,5 (1.5; 3.5) □ mol.l⁻¹.min⁻¹, ve srovnání se skupinou I (bez toxicity), AUC 1.2 (0.4; 2.4) mol.l⁻¹.min⁻¹, p=0,012
- průměrné hodnoty AUC_{5,6-DHFU} v jednotlivých skupinách I – IV nevykazovaly statisticky významné rozdíly, důvodem může být i poměrně vysoká intra-skupinová variabilita hodnot
- poměr AUC_{5-FU}/AUC_{5,6-DHFU} se jeví jako nejvhodnější parametr ve vztahu k pozorované toxicitě, tento poměr se signifikantně zvyšuje s narůstajícím stupněm závažnosti nežádoucích účinků (I >IV). V kontrastu s průměrnými hodnotami AUC_{5-FU} je poměr AUC_{5-FU}/AUC_{5,6-DHFU} jednoznačně zvýšen ve skupině IV, tedy ve skupině s nejvyšším počtem i stupněm závažnosti pozorovaných nežádoucích účinků.

Součástí práce bylo i molekulárně-genetické vyšetření genu pro DHPD pomocí jeho sekvenace, které bylo provedeno u 23 pacientů z výše uvedeného souboru, výsledky lze tedy prezentovat pouze jako pilotní projekt. Při sekvenaci byla využita genomová DNA izolovaná z leukocytů periferní krve před zahájením terapie. Byla provedena mutační analýza kódující sekvenace DPD pomocí sekvenování cDNA, a to u 23 pacientů základního souboru, u kterých se projeví nežádoucí účinky po podání 5-fluorouracilu. Izolace genetického materiálu (DNA a celkové RNA) z periferní krve byla provedena standardními postupy. Testováno bylo 23 exonů. U všech pacientů v souboru byla nalezena minimálně jedna mutace, ať již v homozygotní nebo hete-

LABORATORNÍ DIAGNOSTIKA NÁDORŮ

rozygotní formě. Celkem bylo nalezeno 8 typů genetických alterací, nalezené mutace/polymorfismy byly potvrzeny sekvenováním z genomové DNA.

Zajímavým nálezem analýzy byla nejen vysoká četnost genetických změn u pacientů s toxicitou a jejich multiplicita, ale také nízký výskyt delece exonu 14, která je nejčastěji uváděnou patogenní změnou nacházenou v evropské populaci. Přítomnost genetických změn na exonu 2,6,8 a 23.2 a 23.3, a to rozhodně více než v 50% pacientů testovaného souboru, jsou pravděpodobně populačně specifickými změnami genu DPD. Jejich četnost významně snižuje pravděpodobnost, že by se mohlo jednat o patogenní genetické varianty vysvětluující toxicitu 5-fluorouracilu.

Pro významnější závěry, zejména korelace nežádoucích účinků a genových alterací na úrovni DPD, by bylo potřeba vyhodnotit rozsáhlejší soubor a provést jeho srovnání se souborem pacientů léčených 5-FU bez toxicity. Důvodem testování pouze výběrového souboru byly především finanční důvody, neboť sekvenace 23 exonů je finančně velmi nákladná. I přesto lze konstatovat, a je tomu tak i v souladu s publikovanými výsledky jiných autorů s reprezentativnějším soubory, že mutační analýzy genu DPD zatím neumožňují samy o sobě selekci populace pacientů ohrožených vznikem závažných nežádoucích účinků po podání 5-FU.

Závěr

V této studii jsme pozorovali závislost mezi nežádoucími účinky 5-fluorouracilu a individuální farmakokinetikou léčiva u konkrétního pacienta, vyjádřená hodnotou AUC. Jako nejprůkaznější prediktor toxicity se jeví hodnota poměru $AUC_{5-FU}/AUC_{5,6-DHFU}$, jehož hodnota se zvyšovala při zvyšujícím se počtu i závažnosti nežádoucích účinků. Lze usuzovat, že u těchto pacientů je dosahováno vysoké plazmatické koncentrace 5-FU s následnou nízkou metabolickou produkcí 5,6-DHFU a z toho rezultující zvýšenou toxicitou podávaného léčiva. Zvýšená hodnota poměru obou AUC je tedy efektivním markerem predikce toxicity, což je v souladu s publikovanými pracemi.

Výsledky z našeho pilotního souboru ukazují, že provedení pouze genetického vyšetření není dostatečným prediktorem nežádoucího efektu terapie fluoropyrimidiny.