

CHEMORADIOTERAPIE – MECHANISMUS ZVÝŠENÉ AKTIVACE CYTOSTATIK BĚHEM PORADIAČNÍ REAKCE

CHEMORADIOTHERAPY - MECHANISM OF INCREASED CYTOSTATICS ACTIVATION DURING THE POST-RADIATION REACTION

VÍTEK P., ROSINA J. *, TALTYNOV O. **, HOZÁK P. **

ÚSTAV RADIČNÍ ONKOLOGIE I. LF UK FN NA BULOVCE

* ÚSTAV BIOFYZIKY 3. LF UK PRAHA

** ÚSTAV EXPERIMENTÁLNÍ MEDICÍNY AV ČR PRAHA

Souhrn: Chemoradioterapie s použitím nukleosidových analogů, zejména fluorovaných pyrimidinů se stala standardním postupem u řady zhoubných nádorů. Mechanismus efektu není přesně popsán. Po zavedení capecitabinu byl detailně zkoumán původní koncept zvýšené aktivace pyrimidinů do aktivních forem při indukci pyrimidiny metabolizujících enzymů v rámci poradiační reakce. Vlivem ozáření se indukuje široké spektrum enzymů a cytokinů zahrnující metabolické enzymy thymidinofosforylázu (TP), thymidinkinázu (TK), dihydropyrimidin dehydrogenázu (DPD), thymidylsyntetázu (TS), deoxycytidinkinázu (dCK), deoxycytidinmonofosfát kinázu (dCMPK) a deoxycytidindeaminázu (dCyD), které metabolizují pyrimidinová nukleosidová analoga – 5-fluorouracil, capecitabin, ara-C a gemcitabin. U téměř všech bylo v ozářené tkáni prokázáno buď zvýšení transkripce příslušné mRNA nebo zvýšení obsahu příslušného proteinu nebo obojí. Poměr nárůstu anabolizujících a katabolizujících enzymů (TP/DPD) je ve prospěch zvýšení anabolismu nukleosidových analogů do účinných forem. Poradiační reakce ve spektru proteinů je dlouhodobá. Zvýšení obsahu proteinu probíhá v úseku 24 hod. – 5 dní po ozáření dávkami 2-10 Gy. Zvýšení transkripce počíná v rozmezí do 24 hod. včetně časných reakcí od 1. hodiny po ozáření. Průběh poradiační reakce je variabilní v závislosti na typu ozářené tkáně. V nádorových tkáních je indukce metabolických enzymů intenzivnější než ve tkáni nenádorové, což je podkladem pro určitou selektivitu cytostatického efektu. Dosavadní nálezy pocházejí převážně z tkáňových kultur nebo experimentálních nádorů na zvířatech. Informace o mechanismech potenciace cytostatika během poradiační reakce mají zatím jen minimální praktické výstupy. Dosavadní poznatky podporují zavedená schemata kontinuálního podání cytostatik 5-FU a capecitabinu. Individuální hodnocení poradiační reakce s využitím v predikci efektu chemoradiace je zatím mimo běžné možnosti.

Klíčová slova: Chemoradioterapie, XIP, thymidinkináza, thymidylsyntetáza, dihydropyrimidindehydrogenáza, thymidinkináza, deoxycytidinkináza, 5-fluorouracil, capecitabin, gemcitabin, poradiační reakce

Abstract: Chemoradiotherapy employing nucleoside analogues, esp. fluorinated pyrimidines became a standard treatment approach in a variety of malignant tumours. Its mechanism of effect has not been discovered in detail. The introduction of capecitabine initiated a detailed investigation of the original concept of enhanced pyrimidine activation to active forms caused by an induction of pyrimidine metabolizing enzymes in a scope of a post-radiation reaction. A wide spectrum of cytokines and enzymes is induced by an irradiation including metabolic enzymes – thymidine phosphorylase (TP), thymidine kinase (TK), dihydropyrimidine dehydrogenase (DPD), thymidylate synthetase (TS), deoxycytidine kinase (dCK), deoxycytidine monophosphate kinase (dCMPK) and deoxycytidine deaminase (dCyD). These enzymes metabolize pyrimidine nucleoside analogues – 5-fluorouracil, capecitabine, ara-C and gemcitabine. Either an enhanced transcription of the relevant mRNA or an increased protein content or both had been found in irradiated cells. A ratio between the enhancement of anabolising and catabolising enzymes (TP/DPD) favours the increased anabolism of nucleoside analogues to active forms. The post-radiation reaction in a spectrum of proteins is long lasting. The increased protein content is apparent in a period between 24 hours and 5 days after the irradiation by a dose of 2 – 10 Gy. The increased transcription initiates within 24 hours, including early reactions within the first hour after the irradiation. Quantitatively there is a variability of post-radiation reactions related to the kind of the irradiated tissue. There is a more intensive induction of metabolic enzymes in tumour tissue than in a normal (non-tumour) tissue indicating a potential of cytostatic effect selectivity. The available references originate predominantly from tissue cultures or experimental animal tumour xenografts. So far only minimal practical measures can be derived from the information on mechanism of cytostatic effect potentiation. The current information supports the established regimens of a continuous administration of 5-FU and capecitabine. An individual assessment of a post-radiation reaction applicable for a prediction of a chemoradiation effect is not within the compass of our care.

Key words: Chemoradiotherapy, XIP, thymidine dinase, thymidylate synthetase, thymidine dinase, deoxycytidine kinase, 5-fluorouracil, capecitabine, gemcitabine, post-radiation reaction

Úvod

Chemoradioterapie různých solidních nádorů je v posledních 10 letech standartním postupem u řady solidních nádorů zvláště u nádorů s vysokou incidencí (nádory plic, čípku děložního, rekta, ORL oblasti). Ve většině léčebných schémat se využívá radiopotenciačních efektů platinových derivátů a fluorovaných pyrimidinů – 5-fluorouracilu (5-FU) nebo capecitabinu.

Synergie ionizujícího záření a chemoterapie je prokázána empiricky, ve studiích fáze III, což umožňuje použití chemoradioterapie jako standardu. Přesto mechanismus synergie není

dosud jednoznačně popsán, zvláště u fluorovaných pyrimidinů. Literatura uvádí jako pravděpodobný mechanismus inhibici reparačních mechanismů (reparace subletálních a potenciálně letálních poškození DNA), změny v distribuci v buněčném cyklu (efekt synchronizace) a inhibici repopulace. Všechny tyto teoretické mechanismy vycházejí z toho, že efekty záření jsou prvotní. K nim přiřazují pravděpodobný mechanismus účinku chemoterapie, kterým lze dosáhnout celkového účinku supraaditivního. Originální koncept mechanismu účinku prezentuje Blackstock et al. již v roce 1994. V experimentu prokázal prodlouženou retenci zvýšení tkáňo-

vé koncentrace metabolitů 5-FU (FdUMP) po ozáření dávkami 2Gy resp. 5Gy (1). Podklad nachází ve zvýšení koncentrace thymidinkinázy, enzymu metabolizujícího 5-FU do aktivní formy (FdUMP), která byla prokázána v předchozích experimentech. Blackstockův koncept chemoradiace pak spočívá v potenciaci efektů chemoterapie zářením.

Další zájem o poznání mechanismu vzájemné potenciace fluorovaných pyrimidinů a záření přichází s širším použitím capecitabinu a to zejména u nádorů zaživacího traktu. Capecitabin jako „pro-drug“ je do účinné formy aktivován enzymem thymidin-fosforylázou (TP). Několik experimentů prokazuje indukci TP po dávkách záření 2-5 Gy a zvýšenou konverzi capecitabinu na 5-deoxy-5-fluorouridin. Efekty jsou dokonce do jisté míry selektivní pro nádorovou tkáň. Problematika chemoradioterapie s fluorovanými pyrimidiny pochopitelně nelze omezit pouze na indukci jejich metabolismu do účinných forem. Zrychlený metabolismus může představovat jeden z mechanismů majoritních, zvláště u capecitabinu. Dalšími potenciálními mechanismy jsou indukce cílových enzymů (substrátů), konkrétně thymidylsyntetázy (TS) u fluorovaných pyrimidinů. Vlivem záření se potenciálně indukují i enzymy katabolizující a otázka potenciace pak závisí na metabolické rovnováze. Je evidentní, že v konceptu alterovaného metabolismu cytostatika v ozařované tkáni je nezbytné popsat kompletní anabolickou a katabolickou kaskádu účinné látky včetně substrátu a znát komplexní poradiační reakci na molekulární úrovni.

Poradiační reakce

Buněčná odpověď na ionizující záření není přesně popsána. Podle dosavadních poznatků zahrnuje indukci více procesů z následujících kategorií: Indukce enzymů řídících signální transdukcii, stimulace reparace dvojitého zlomu DNA („double strand break“ – DSB), přednostně mechanismem nehomo-

logního spojování („non-homologous end joining“ – NHEJ), indukce „metabolických“ proteinů, které se účastní v reparačním procesu, blokáda „checkpointů“ ve fázích G1, S a G2 buněčného cyklu, indukce zymogenů účastnících se v procesu apoptózy, indukce dalších proteinů, které se účastní dalších procesů v důsledku zátěže zářením – angiogenezy, imunitní odpovědi apod.

Již koncem 80. let předchozího století byl vyvinut první systém klasifikace transkriptů resp. proteinů indukovaných ionizujícím zářením tzv. XIP („X-ray inducible polypeptide“, „X-ray inducible protein“ nebo v přeneseném smyslu „X-ray inducible transcript“) (2). Transkripty a příslušné proteiny byly identifikovány, ale jejich funkce nebyla známa. Proto vznikla původně číselná nomenklatura, identifikující XIP podle molekulové váhy (XIP 126 – XIP 275). Následně byla identifikována řada molekul XIP ze skupiny metabolických enzymů, regulačních faktorů a cytokinů a nomenklatura XIP ustupuje do pozadí. U některých molekul je ale XIP nomenklatura stále užívána, a proto je uvedena v tabulce č. 1.

Z prvních experimentů byly patrné některé obecné závěry (4):

- Většina proteinů ze skupiny XIP je indukována specificky ionizujícím zářením a ne jinými podněty (kupř. hypertermií – „heat shock“).
- XIP jsou indukovány pouze nízkými dávkami záření (200 – 600 cGy).
- Po vyšších dávkách záření, přes 10 Gy, jsou některé XIP suprimovány.
- Transkripce všech XIP neprobíhá synchronně.

Spektrum současně známých záření indukovaných proteinů je rozsáhlé a zahrnuje i řadu cytokinů (kupř. tumor necrosis factor alfa (TNF- α)). Pak zákonitě vzniká otázka, do jaké míry je indukce dalších cytokinů přímá, v rámci poradiační reakce, nebo nepřímá vlivem indukovaného cytokinu.

Pro výzkum interakce ionizujícího záření a chemoterapie mají přirozeně zásadní význam XIP ze skupiny metabolických enzymů, jejichž indukce potenciálně alteruje metabolismus příslušné účinné látky. Proto byly a jsou předmětem výzkumu zejm. enzymy metabolizující DNA a RNA prekursorů. Problematika byla řešena zejména v souvislosti se zavedením „pro-drug“ capecitabinu, který se metabolickými enzymy aktivuje do účinné formy.

Tabulka č. 1.

Nomenklatura „XIP“	Identifikovaná molekula	Funkce	Pozn.
XIP-6	„Tissue plasminogen activator“, t-PA	Aktivace plasminogenu	
XIP-8	Clusterin, KUB-1	Reparace DSB cestou NHEJ (3)	Isoforma proapoptotická n-CLU cytoprotektivní s-CLU
XIP-11	Thymidinkináza, TK	Metabolismus DNA	
XIP-3	DT diaforáza (NAD(P)H menadion oxidoreduktáza	Metabolický enzym	

Tabulka č. 2.

Cytostatikum, účinná látka	Indukovaný metabolizující enzym (potenciální XIP)	Potenciální důsledek aktivace	Důsledek pro účinnost + zvýšení – snížení
5-fluorouracil	TP, TK	Zvýšený anabolismus do účinné formy, 5-FdUMP	+
	DPD	Zvýšený katabolismus do inaktivní formy dihydro 5-FU	–
	TS	Zvýšení koncentrace cílové struktury	+
Capecitabin	TP	Zvýšený anabolismus na 5-FdUMP a 5-FU	+
Raltitrexed	TS	Zvýšení koncentrace cílové struktury	+
Gemcitabin	dCK, dCMPK, dCDPK	Zvýšený anabolismus do účinné formy	+
Cytosin arabinosid	dCyD	Katabolismus do neúčinné formy d-UMP	–

Zkratky: TP – thymidinofosforyláza, TK – thymidinkináza, DPD – dihydrofymidindehydrogenáza, TS – thymidylsyntetáza, dCK – doxycytidinkináza, dCMPK – doxycytidinmonofosfátkináza, dCDPK – doxycytidindifosfátkináza, dCyD – doxycytidindeamináza, 5-FdUMP – 5-fluorodeoxyuridinmonofosfát, 5-FU – 5-fluorouracil, d-UMP – deoxyuridin onofosfát

Metabolismus cytostatik – interakce s poradiačními změnami

Skupina antimetabolitů ze skupiny fluorovaných pyrimidinů zahrnuje v současnosti běžně užívané látky 5-fluorouracil, capecitabin, gemcitabin a cytosin arabinosid. Schéma metabolismu 5-fluorouracilu, capecitabinu a gemcitabinu je na obr. 1, 2, 3. Do skupiny metabolických enzymů (a pravděpodobně XIP) spadá i thymidylsyntetáza (TS). Problematika interakce se zářením proto zahrnuje i další anti-metabolitu – raltitrexed, pro nějž představuje TS cílovou strukturu.

Problematika XIP resp. enzymatické indukce ionizujícím zářením zahrnuje:

- Indukci enzymů metabolizujících látky do aktivní formy - thymidin fosforyláza (TP), thymidinkináza (TK), deoxycytidin kináza (dCK), deoxycytidinmonofosfát kináza (dCMPK)
- Indukci cílové struktury, cílového enzymu – thymidylsyntetázy (TS).
- Indukci enzymu katabolizujícího látky do forem inaktivních – dihydropyrimidin dehydrogenáza (DPD), deoxycytidin deamináza (dCMP deamináza).

V metabolismu cytostatik se pak řeší v rámci poradiační reakce následující otázky:

- Rovnováha anabolismu a katabolismu příslušných látek (otázka aktuální zejm. u capecitabinu).
- Zvýšení koncentrace cílové struktury (TS u 5-FU, capecitabinu a raltitrexedu)
- Variabilita poradiační reakce v různých tkáních, selektivita potenciace efektu účinných látek pro nádorovou tkáň.
- Vývoj XIP v čase, potenciální podklady pro časování, „timing“ chemoradiooterapie.

Přehled teoretických interakcí pro různá cytostatika udává tabulka č. 2.

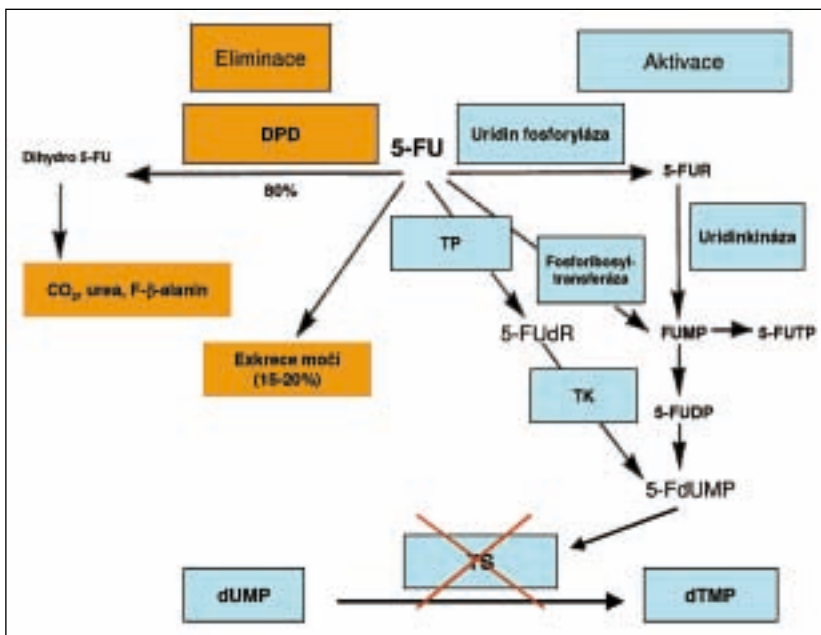
Thymidinfosforyláza (TP)

Indukce TP byla prokázána Sawadou et al. (5) u experimentálních nádorů (ca coli, ca colli uteri, ca ventriculi, ca mamme) ve zvířecím modelu. Při dávkách 2,5 – 5 Gy se intracelulární koncentrace TP v 5 typech modelových lidských nádorů zvyšuje na 10 – 20 násobek bazální hladiny. Maximum zvýšení nastává kolem 9. dne po radiaci a zvyšování přetrvává do 18. dne. Sawada současně prokazuje určitou selektivitu zvýšení při srovnání experimentálních nádorů a zdravé jaterní tkáně. Nicméně rozdíl v koncentraci TP jsou patrné i za normálních podmínek. Schueller (6) prokazuje in vivo u nemocných ca coli určitý gradient mezi koncentrací v tumorozní tkáni ca coli a koncentrací v přilehlé zdravé sliznici a gradient mezi koncentrací v tumorozní tkáni a plazmě.

Indukci TP po ozáření experimentálních nádorů (gliomů) na zvířatech analyzoval Blanquicett (7) a to na úrovni transkriptů. V korelaci s předchozími nálezy Sawady je patrné zvýšení koncentrace TP mRNA po dávce 8,5 Gy. Zvýšení dosahuje průměrně 10 násobku (maximálně až 70 násobku bazální hladiny, počíná 24 hod. po ozáření a přetrvává relativně dlouhou dobu – průměrně 20 dní. V uvedených experimentech vzniká několik kontroverzí:

- Vlivem ozáření narůstá koncentrace i dalších proteinů ze skupiny cytokinů. Na úrovni proteinů byl prokázán nárůst TNF- α se stejným časovým průběhem jako TP. Na úrovni transkriptů je po ozáření prokázán nárůst mRNA pro dalších 11 cytokinů včetně IFN- γ a IL-1 α . (Překvapivě při analýze mRNA tento experiment neprokazuje vzestup TNF- α mRNA.)
- U kontrolní skupiny ozářených zvířat, ale s odstíněním nádoru, je od 10. – 15. dne též patrný až 60 násobný nárůst TP mRNA.
- Přetrvávání zvýšené hladiny TPmRNA v ozářených nádorech je nápadně dlouhé.

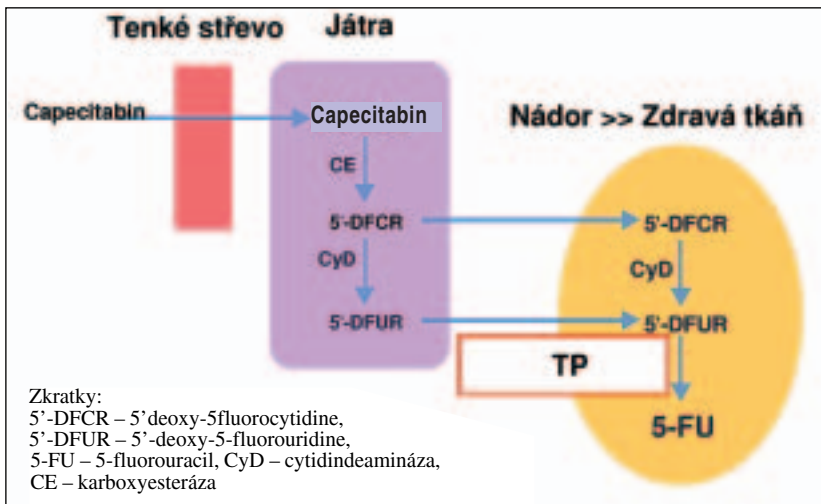
Obr. 1. Metabolismus 5-FU.



Zkratky v obr. 1:

DPD – dihydropyrimidindehydrogenáza, 5-FU – 5-fluorouracil, TP – thymidinfosforyláza, 5-FUR – 5-fluorouridin, 5-FUdR – 5-fluorodeoxyuridin, FUMP – fluorouridinmonofosfát, 5-FUTP – 5-fluorouridintrifosfát, TK – thymidinkináza, 5-FUDP – 5-fluorouridinmonofosfát, 5-FdUMP – 5-fluorodeoxyuridinmonofosfát, dUMP – deoxyuridinmonofosfát, TS – thymidylsyntetáza, dTMP – deoxythymidinmonofosfát

Obr. 2. Metabolismus capecitabinu.



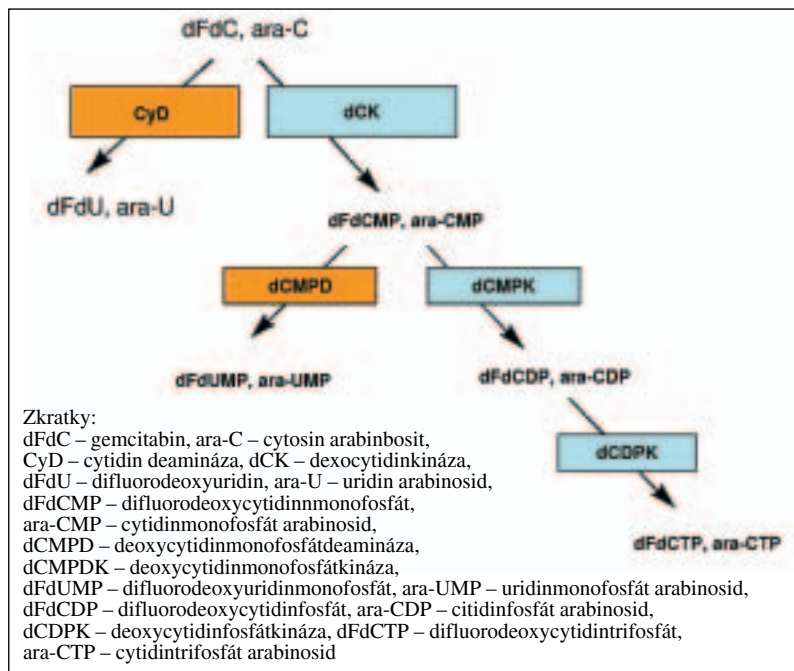
Zkratky:
5'-DFCR – 5'-deoxy-5-fluorocytidine,
5'-DFUR – 5'-deoxy-5-fluorouridine,
5-FU – 5-fluorouracil, CyD – cytidindeamináza,
CE – karboxyesteráza

S ohledem na známou indukci TNF- α a IFN- γ lze připustit nepřímou indukci TP ionizujícím zářením prostřednictvím cytokinů. Bez ohledu na mechanismus indukce TP je pravděpodobná zvýšená aktivace capecitabinu a fluorouracilu do účinných forem v ozářené tkáni, pravděpodobně s určitou selektivitou ve tkáni nádorové.

Dihydropyrimidindehydrogenáza (DPD)

Reference o vývoji DPD v ozářované tkáni jsou raritní. Blanquicett et al. (7) stanovil hladiny DPD mRNA u experimentálních nádorů (gliomů) na zvířatech. Nezjišťuje žádnou změnu vlivem radiace. Na kulturách buněk He-La jsme od 7. hodiny po radiaci identifikovali nárůst DPD mRNA do dvojnásobku bazálních hodnot (8) Pro predikci účinnosti 5-FU a capecitabinu je reprezentativním faktorem poměr TP/DPD. Ten byl stanoven v různých nádorových tkáních bez před-

Obr. 3. Metabolismus gemcitabinu a ara-C.



chozí expozice jakékoliv chemoterapii nebo ozařování metodou určení proteinů (9). U nádorů mammy, kolorekta, ledvin a esofagu je evidentně poměr TP/DPD vyšší než 1, minimálně 1,5. (poměr enzymatických aktivit v $\mu\text{g}/\text{mg}$ proteinu). V ojedinělém, uvedeném experimentu poměr TP/DPD narůstá po ozáření na 60-70 násobné hodnoty (7). Tento nárůst predikuje zvýšení efektu capecitabinu a 5-FU., resp. synergii s ionizujícím zářením (10). Variabilita poměru TP/DPD při stanovení v klinice mezi jednotlivými nemocnými je významná, což je dáno zejm. variabilitou v koncentraci DPD. Variabilita mezi nemocnými dokonce mnohokrát převyšuje variabilitu mezi jednotlivými nádorovými typy. To snižuje význam určení TP/DPD poměru pro potenciální predikci podle nádorových typů. Minimum referencí o vývoji DPD a TP/DPD poměru po radiaci zatím neumožňuje odhadnout vývoj katabolismu 5-FU a capecitabinu při evidentně zvýšeném anabolismu.

Thymidylsyntetáza (TS)

TS je předmětem výzkumu již téměř 2 desetiletí. Jako cílová struktura více účinných látek byla sledována exprese TS genu a hladiny enzymu v různých tkáních včetně nádorových. Expres TS a její význam byla zkoumána zejména jako prognostikátor u nádorů kolorekta a prediktor senzitivity na léčbu fluorovanými pyrimidiny a raltitrexedem. Dosud publikované nálezy jsou kontroverzní (zvýšená exprese = negativní prognostikátor a pozitivní prediktor pro 5-FU), nevedou k jednoznačným závěrům a širě problematiky prognózy a predikce TS přesahuje rámec tohoto přehledu. V návaznosti na ionizující záření je z více referencí patrná následující závislost:

- Opakovaně byla prokázána indukce TS zářením a to již od dávek 2 Gy, všechny dosavadní publikované experimenty byly vedeny in vitro nebo na experimentálních nádorech u zvířat.
- Expres TS prokázala negativní prediktivní hodnotu pro efekty záření i kombinované chemoradioterapie (zvýšená exprese koreluje s nižší radiosenzitivitou) (11).
- Jakkoliv alterovaná hladina TS (včetně změn po ozáření) nerezultuje pouze do změn v metabolismu DNA. TS má zřejmě několik dalších efektorových mechanismů, kupř. regulaci systému p53 (12).

– V rámci poradační reparační reakce navažují zvýšené hladiny na urychlení folátového metabolismu, který je vlivem záření alterován (resp. molekuly folátů jsou degradovány kyslíkovými radikály na pterin a paraaminobenzoylglutamovou kyselinu). Alterace folátového metabolismu může být nepřímým spouštěcím mechanismem indukce TS (13).

Všechny reference zahrnující alteraci TS vlivem ionizujícího záření popisují zvýšení. Dynamika zvýšení je podobná jako u předchozích metabolických enzymů. Koncentrace TS stoupá od 24 hod. po ozáření a zvýšení přetrvává až do 120 hod. Kvantifikace je obtížná vlivem obtížné srovnatelných metodik stanovení enzymů, zvýšení dosahuje cca 200% (14). Vlastní výsledky u He-La buněk prokazují zvýšení TS-mRNA od 8. hodiny po ozáření dávkou 2 Gy (8).

Z hlediska chemoradioterapie je vývoj hladin TS poměrně kontroverzním jevem. Jakkoliv prokázané zvýšení koncentrace cílové molekuly TS, pravděpodobně přináší zvýšení efektu účinné látky (fluorovaného pyrimidinu nebo raltitrexedu). Naproti tomu z hlediska účinnosti ionizujícího záření se zvýšená exprese TS prokázala jako negativní prediktivní faktor a blokáda TS specifickým inhibitorem (Thymitaq) (15) zvyšuje účinnost záření. Navíc je pravděpodobné, že zvýšení efektu blokátoru TS (pyrimidinu nebo raltitrexedu) se nebude manifestovat pouze formou blokády DNA metabolismu, ale pravděpodobně i jinými cestami, kupř. modulací systému p53.

Thymidinkináza (TK)

Indukce TK byla verifikována Boothmanem et al. před více jak 10 lety (4). V rámci nomenklatury XIP byla označena jako „XIP-11“. Indukce TK-mRNA dosahovala 6 násobku bazálních hladin s relativně rychlým nástupem – maximum po 3 hod. od ozáření. Indukce TK mRNA byla intenzivnější v nádorových buňkách (melanom –,U1-Mel“) než v buňkách nenádorových. Maximum indukce bylo dosaženo po jednotlivé dávce 5 Gy. Při dávkách nad 6 Gy je patrný útlum TK, resp. úbytek TK mRNA.

Tatáž pracovní skupina verifikovala i nárůst proteinu TK (16). I u proteinu je patrný rozdíl mezi nádorovou a nenádorovou buňkou, kde jsou hladiny proteinu nižší. Při stanovení aktivity TK po radiaci je v pokusu na nádorových a nenádorových tkáních myši (ascitický nádorový exudát, slezina, thymus,) patrné zvýšení po malých dávkách záření, při dávkách nad 1 Gy se aktivity snižuje v intervalu 12 hodin (17, 18). Jde zřejmě o posttranslační inhibici fosforylací při zvýšení intracelulárního poolu deoxythymidintrifosfátu (dTTP). U He-La buněk ozařovaných dávkou 2 Gy jsme verifikovali časné zvýšení TKmRNA, během první hodiny po radiaci. Nárůst je dvouvrcholový, další zvýšení nastává od 6. hodiny po ozáření (8). Podobná kinetika byla popsána i u t-PA (tissue plasminogen activator – XIP 6), kde odráží stabilizaci mRNA v prvním vrcholu a indukovanou transkripci ve 2. vrcholu (4). I když indukce TK může mít význam pro kinetiku fluorovaných pyrimidinů, tzn. význam pro účinnost chemoradiace, další reference nejsou dostupné, zřejmě proto, že významnější postavení v metabolismu pyrimidinů mají TP, DPD a TS.

Deoxycytidinkináza (dCK)

dCK, je známá jako enzym aktivující pyrimidinová nukleosidová analoga gemcitabinu a cytosin arabinosid a též purinová analoga jako chlordeoxyadenosin. V různých referencích byla popsána jeho aktivace při narušení syntézy DNA z různých

příčin (aphidicolin, cytostatika – kupř. etoposid) (19,20). Navíc aktivita dCK je nezávislá na fázi buněčného cyklu, resp. kromě S fáze si zachovává i ve fázích ostatních včetně G0. Na aktivitě dCK přirozeně závisí i rychlost aktivace Ara-C a gemcitabinu do účinných forem, dCK se uplatňuje jako prediktivní faktor efektu těchto látek (21). Vzestup aktivity dCK resp. nárůst koncentrace proteinu na 5 násobek původní hodnoty byl prokázán na kulturách experimentálních nádorů colon po jednotlivých dávkách záření do 7,5 Gy současně s nárůstem aktivity TK (22). Recentní práce Csapa et al. prokazuje vzestup aktivity dCK na kulturách lymfocytů. Vzestup enzymatické aktivity dCK na 3-4 násobné hodnoty je patrný po krátkém časovém intervalu – 15-30 min. po ozáření dávkami 0,5 – 4 Gy. Při stanovení koncentrace proteinu dCK není patrný žádný vzestup (23). Krátký časový interval od ozáření a absence nárůstu proteinu nasvědčuje posttranslační aktivaci, nikoliv de novo syntéze. Ta zřejmě nastává v delším časovém intervalu, který v uvedené referenci nebyl zkoumán, pravděpodobně po 6 hod. a déle. V rámci časně aktivace se dCK se zřejmě aktivuje proteinkinázou Cα (24) a časná aktivace je pravděpodobně součástí procesu spouštěného po poškození DNA stresovými kinázami (γ-PAK a ATM kináza) (25). Pro přesnější určení syntézy dCK (nikoliv aktivace) bude nezbytné i stanovení transkriptu – dCK mRNA. Reference popisující transkript v závislosti na ozáření nejsou k dispozici.

Deoxycytidindifosfátkináza, deoxycytidinmonofosfátkináza (dCMPK, dCDPK)

Těmito enzymy jsou pyrimidinová analoga Ara-C a dFdC dále aktivována do účinné formy.

Reference popisující tyto enzymy jsou raritní. Současně řešená problematika spočívá v identifikaci mechanismů fosforylace deoxycytidinmonofosfátu (dCMP). Mechanismus fosforylace cestou dCMPK a dCDPK zřejmě není jediný (26). Otázky postavení dCMPK a dCDPK v reakci na záření nebyly řešeny.

Deoxycytidin monofosfát deamináza (dCMPD)

Deaminace monofosfátového metabolitu gemcitabinu (dFdC), tzn. gemcitabin-monofosfátu (dFdCMP) prostřednictvím dCMPD může být majoritní cestou eliminace. Trifosfátový metabolit, dFdCTP, působí jako blokátor dCMPD. Tímto mechanismem autopotenciace se prodlužuje poločas účinných forem resp. metabolitů gemcitabinu. Vývoj dCMPD v kontextu poradiační reakce není známý, k dispozici je minimum referencí. Byla popsána transientní indukce dCMPD v buněčných liniích CHO-K1 po UV ozáření s relevantním nárůstem metabolitu dUMP (27). Hladiny dCMPD mRNA po ozáření nebyly zkoumány.

Z hlediska potenciální kombinace nukleosidových analog Ara-C a gemcitabinu se zářením má význam určení poradiačního vývoje dCMPD v kontextu stanovení poměru anabolismu a katabolismu. Přínosné by bylo stanovení poměru dCK/dCMPD a poměru dCMPK/dCMPD.

Možnosti využití poradiačních změn

Z uvedeného přehledu je patrné, že v rámci poradiační reakce po dávkách v řádu jednotlivých Gy se aktivuje metabolismus DNA a indukují resp. aktivují nukleosidy metabolizující enzymy. Tím se potvrzuje původní Blackstockův koncept chemoradiace s „potenciací chemoterapie zářením“. Zájem o problematiku stoupá s nástupem prekursoru 5-FU – capecitabinu, kde je otázka rychlosti a intenzity aktivace zásadní. U většiny metabolických enzymů byla otázka indukce v ozařované tkáni alespoň iniciálně zkoumána. Přestože je zatím obtížné dát z dostupných referencí jakékoli pevné závěry, jsou patrné některé obecné charakteristiky.

– U enzymů, kde byla zkoumána hladina proteinu, dlouhý časový interval od ozáření – cca 12–24 hod. a zvýšené intracelulární hladiny přetrvávají několik dní.

- Pouze u některých enzymů byla prokázána zvýšená hladina transkriptu, která přirozeně předchází vzestupu proteinu a určuje dobu nástupu poradiační reakce. Doba do nárůstu transkripce je od jednotlivých hodin do 24 hod.
- Možné jsou mechanismy nepřímé indukce metabolických enzymů. Skupina radiací indukovaných proteinů pod původním názvem XIP zahrnuje rozsáhlé spektrum látek včetně cytokinů, které potenciálně indukují metabolické enzymy.
- U některých metabolických enzymů může transkripci a syntéze předcházet posttranslační aktivace, která simuluje urychlení poradiační reakce v řádu hodin.
- Jsou patrné významné rozdíly v indukcii a aktivitě metabolických enzymů mezi jednotlivými tkáněmi, indukce je vyšší ve tkáních nádorových, což je základem určité selektivity cytostatického efektu. Dosavadní nálezy jsou převážně z experimentálních nádorů na zvířatech nebo z tkáňových kultur. Práce stanovující indukci metabolických enzymů in vivo u nemocných s nádorovým onemocněním jsou ojedinělé.

Charakteristika a popis metodik, kterými byly stanoveny proteiny a transkripty v různých experimentech přesahují rámec přehledového sdělení. Je evidentní, že použití různých metodik stanovení proteinů (enzymová imunoassay, HPLC, Western blotting, analýza aktivity enzymů aj.) neumožňuje kvantitativní srovnání mezi jednotlivými experimenty. V analýze mRNA jsou pravidelně aplikovány metodiky RT-PCR. Výsledky různých experimentů také nejsou srovnatelné. Na otázku srovnatelnosti výsledků narážíme i ve vlastních výsledcích. Při hodnocení poradiační reakce je problematická volba referenčního „housekeeping“ genu. Řada z běžně používaných referenčních genů se přepisuje v rámci poradiační reakce současně s geny zkoumanými, kupř. běžně užívaný gen GAPDH (glyceraldehydfosfátdehydrogenáza) (28). Metodiky výběru referenčních „housekeeping“ genů jsou pospány (29).

Praktický výstup?

Indukce metabolických enzymů v rámci poradiační reakce je zkoumána v době, kdy je široce používána chemoradioterapie na základě empirie resp. dosažených příznivých výsledků.

Obecné závěry z výzkumu metabolických enzymů v poradiační reakci mohou ovlivnit časování („timing“) chemoradiačních schemat. Teoreticky je možné časovat aplikaci chemoterapie do doby maximálně intenzivního metabolismu resp. aktivace. Nicméně vzhledem k výše uvedeným dlouhodobým reakcím (několikadenní zvýšení hladin anabolických enzymů) a charakteristice metabolismu užívaných látek, zejm. capecitabinu, jsou zřejmě ideální v současné době již zavedená schemata aplikace fluorouracilu v kontinuální infuzi nebo capecitabinu v kontinuální redukované dávce po celou dobu ozařování. U dalších nukleosidových analog, kupř. gemcitabinu nebo ara-C a inhibitorů TS, raltitrexedu, dosud chemoradiační schemata vyvinuta nebyla.

Další přínos potenciálně představuje stanovení poměru indukce anabolických a katabolických enzymů, TP/DPD nebo dCK/dCMPD. V obecné rovině stanovení poměru může informovat o možnosti vzájemné potenciace nebo naopak o subaditivním efektu. Dosavadní reference potvrzují u poměru TP/DPD možnost potenciace. Popsaná velká variabilita DPD mezi jednotlivci ale připoštlí teoretickou možnost obrácení poměru. Identifikace těchto případů by vyžadovala individuální zhodnocení poradiační reakce metabolických enzymů jako prediktivní test. Individuální hodnocení je jednoznačně mimo současné možnosti.

Samostatnou oblast v rámci TP/DPF poměru představuje identifikace jedinců s genetickou deficiencí DPD. V těchto případech se poměr posouvá do hodnot predikujících těžké, případně letální nežádoucí efekty. Běžná dávka 5-FU nebo capecitabinu udržuje v těchto případech hladiny adekvátní předávkování. Individuální identifikace DPD deficiencie je realizovatelná popsávanými metodikami (30, 31).

Závěr

Mechanismus poradiační reakce zahrnuje indukci a aktivaci řady enzymů a cytokinů včetně enzymů metabolizujících nukleosidy. Na jeho základě lze popsat mechanismus vzájemné potenciace chemoterapie a záření a potvrdit koncept zvýšené dostupnosti resp. zvýšeného anabolismu některých cytotatik ze skupiny nukleosidových analog, zejm. fluorovaných pyrimidinů v ozářené tkáni. Anabolismus nukleosidových analog zřejmě převažuje nad katabolismem. Intenzivnější indukce

enzymů v nádorové tkáni může být podkladem pro určitou selektivitu cytostatického efektu. Indukce enzymů je dlouhodobá, přetrvává dny a podporuje současně užívaná schemata kontinuálního podání analog. Přínosem by mohlo být individuální zhodnocení mechanismu poradiační reakce a využití jako prediktoru efektu cytostatika.

Práce je součástí grantového úkolu IGA MZČR č. NC 7372 – 2/2003.

Literatura

1. Blackstock A.W., Kwok L., Gill M. et al. Tumor retention of 5-fluorouracil following irradiation observed using fluorine-19 nuclear magnetic resonance spectroscopy. *Int. J. Radiat. Oncol., Biol. Phys.* 1993, 30: 164
2. Boothman D.A., Bouvard I., Hughes E.N. Identification and characterization of X-ray induced proteins in Human Cells. *Cancer Res.* 1989, 49: 2871-8
3. Leskov K.S., Criswell T., Sheri A., Li J. et al. When X-ray-inducible proteins meet DNA double strand break repair. *Sem. Radiat. Oncol.* 2001, 11: 352-372
4. Boothman D.A., Meyers M., Fukunaga N., Lee S.W. Isolation of x-ray inducible transcripts from radioresistant human melanoma cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 1993, 90: 7200-7204
5. Sawada N., Ishikawa T., Sekiguchi F., Tahala Y. et al. X-ray irradiation induces thymidine phosphorylase and enhances the efficacy of capecitabine (Xeloda) in human cancer xenografts. *Clin. Cancer Res.* 1999, 5: 2948-2953
6. Schueller J., Cassidy J., Dumont E., Ross B. Preferential activation of capecitabine in tumor following oral administration to colorectal cancer patients. *Cancer Chemother. Pharmacol.* 2000, 45: 291-297
7. Blanquicett C., Gillespie Y., Nabors L.B., Miller C.R. et al. Induction of thymidine phosphorylase in both irradiated and shielded, contralateral human U87MG glioma xenografts: Implications for a dual modality treatment using capecitabine and irradiation. *Molecular Cancer Therapeutics* 2002, 1: 1139-1145
8. Vitek P., Taltyov O., Hozák P., Frencl L. et al. Radiation induced transcripts – TS, TK, TP and DPD mRNA 0-8 hrs. after common doses of radiation, a potential basis for an appropriate timing of chemoradiotherapy. *Radiotherapy & Oncology* 2004, 73 (Suppl. 1); S 368
9. Mori K., Hasegawa M., Nishida M., Toma H. et al. Expression levels of thymidine phosphorylase and dihydropyrimidine dehydrogenase in various human tumor tissues. *Int. J. of Oncology* 2000, 17: 33-38
10. Hoque M.O., Kawamata H., Nakashiro K.I., Omotehara F. et al. Dihydropyrimidine dehydrogenase mRNA level correlates with the response to 5-fluorouracil-based chemo-immuno-radiation therapy in human oral squamous cell cancer. *Int. J. Oncol.* 2001, 19: 953-8
11. Okonkwo A., Musumuri S., Talamonti M., Benson A. et al. Molecular markers and prediction of response to chemoradiation in rectal cancer. *Oncol. Rep.* 2001, 8: 497-500
12. Ju J., Pedersen-Lane J., Maley F., Chu E. Regulation of p53 expression by thymidylate synthase. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 1999, 96: 3769-3774
13. Pogozelski W.K., Xapsos M.A., Blakely W.F. Quantitative assessment of the contribution of clustered damage to DNA double strand breaks induced by 60 Co gamma rays and fission neutrons. *Radiat. Res.* 1999, 151: 442-448
14. Batra V., Kesavan V., Mistra K.P. Modulation of enzymes involved in folate dependent one-carbon metabolism by γ -radiation stress in mice. *J. Radiat. Res.* 2004, 45: 527-533
15. Kim S.H., Brown S.L., Kim J.H. The potentiation of radiation response in human colon carcinoma cells in vitro and murine lymphoma in vivo by AG 337 (Thymitaq), a novel thymidylate synthase inhibitor. *Int. J. Radiat. Oncol. Biol. Phys.* 1998, 42: 789-93
16. Boothman D.A., Davis T.W., Sahijdak W.M. Enhanced expression of thymidine kinase in human cells following ionizing radiation. *Int. J. Radiat. Oncol. Biol. Phys.* 1994, 30: 391-8
17. He Q., Skog S., Welander I., Tribukait B. X-irradiation effects on thymidine kinase (TK): II. The significance of deoxythymidine triphosphate for inhibition of TK1 activity. *Cell Prolif.* 2002, 35: 83-92
18. He Q., Skog S., Welander I., Tribukait B. X-irradiation effects on thymidine kinase (TK): I. TK1 and 2 in normal and malignant cells. *Cell Prolif.* 2002, 35: 69-81
19. Csapo Z., Sasvari-Szekely M., Spasokoukotskaja T., Talinadis I. et al. Activation of deoxycytidine kinase by inhibition of DNA synthesis in human lymphocytes. *Biochem. Pharmacol.* 2001, 61: 191-7
20. Ooi K., Okhubo T., Higashigawa M., Kawasaki H. et al. Increased deoxycytidine kinase activity by etoposide in L1210 murine leukemic cells. *Biol. Pharm. Bull.* 1996, 19: 1382-3
21. Gregore V., Rosier J.F., De Bast M., Bruniaux M. et al. Role of deoxycytidine kinase (dCK) activity in gemcitabine's radioenhancement in mice and human cells in vitro. *Radiother. Oncol.* 2002, 63: 329-338
22. Wei S., Geron-Blanc A., Petridis A., Beaumatin J. et al. Radiation induced changes in nucleotide metabolism of two colon cancer cell lines with different radiosensitivities. *Int. J. Radiat. Biol.* 1999, 75: 1005-13
23. Csapo Z., Keszler G., Safrany G., Spasokoukotskaja T. et al. Activation of deoxycytidine kinase by gamma-irradiation and inactivation by hyperosmotic shock in human lymphocytes. *Biochem. Pharmacol.* 2003, 65: 2031-2039
24. Xu Y.Z., Juany P., Plunkett W. Functional compartmentation of DTP pools. Preferential utilization of salvaged deoxycytidine for DNA repair in human lymphoblasts. *J. Biol. Chem.* 1995, 270: 631-7
25. Sasvari-Szekely M., Szabo Jr G., Strub M., Spasokoukotskaja T. et al. Discrepancies between flow cytometric analysis and [3 H]thymidine incorporation in stimulated lymphocytes. *Biochim. Biophys. Acta* 1983, 762: 452-7
26. Hsu C.H., Liou J.Y., Dutschman G.E., Cheng Y.C. Phosphorylation of cytidine-, deoxycytidine-, and their analog- monophosphates by human UMP/CMP kinase is differentially regulated by ATP and magnesium. *Mol. Pharmacol.* 2004, 18:
27. Newman C.N., Miller J.H. Mechanism of UV-induced deoxynucleoside triphosphate pool imbalance in CHO-K1 cells. *Mutat. Res.* 1985, 145, 95-101
28. Weill D., Gay F., Tovey M.G., Chouaib S. Induction of tumor necrosis factor α expression in human T lymphocytes following ionizing gamma irradiation. *Journal of Interferone and Cytokine Research* 1996, 16: 395-402
29. Blanquicett C., Johnson M.R., Heslin M., Diasio R.B. Housekeeping gene variability in normal and carcinomatous colorectal and liver tissues: Applications in pharmacogenomic gene expression studies. *Analytical Biochemistry* 2002, 303: 209-214
30. Sumi S., Kidouchi K., Kondou M., Hayashi K. et al. Possible prediction of averse reactions to fluorouracil by measurement of urinary dihydrothymine and thymine. *Int. J. Mol. Med.* 1998, 2: 477-482
31. Mattison L.K., Carpenter M., Wang Y.H., Johnson M.R. et al. Rapid identification of dihydropyrimidine dehydrogenase (DPD) deficiency by a novel uracil breath test (UBT). *Proc. ASCO* 2003, 22: Abst. 494