

Artykuły przeglądowe • Review articles**Farmakogenetyka – znaczenie w chemioterapii raka jelita grubego**

Mariusz Panczyk, Marek Mirowski

W ostatnich latach, ze względu na wzrastającą liczbę nowych leków przeciwnowotworowych, zwiększyły się znacznie możliwości terapeutyczne. Wybór terapii zależy od stopnia zaawansowania choroby i specyficznych czynników charakterystycznych dla każdego pacjenta. Obecnie klinicyści mają możliwość skorzystania z osiągnięć farmakogenetyki, która pozwala na przewidywanie efektywności i toksyczności stosowanej terapii. Specyficzne dla danej osoby markery toksyczności i odpowiedzi na chemioterapię pozwalają na bardziej zindywidualizowane prowadzenie terapii oraz bardziej zoptymalizowane leczenie kilkoma chemioterapeutykami przy zachowaniu bezpiecznego dla pacjenta poziomu toksyczności. Genetyczny polimorfizm w genach kodujących enzymy szlaków metabolicznych leków przeciwnowotworowych może wpływać na biodostępność i ryzyko wystąpienia działań toksycznych podczas leczenia raka jelita grubego. Zastosowanie w terapii przeciwciał monoklonalnych, takich jak: cetuksymab i bewacyzumab, może dawać pozytywne efekty, ale tylko w określonej grupie pacjentów. Ponadto możliwość stosowania markerów postępu choroby (markery prognostyczne), jak i markerów efektywności terapii pozwala na monitorowanie przebiegu leczenia.

Pharmacogenetics - significance in chemotherapy of colorectal cancer

In the last decade new anticancer agents have been developed and the therapeutic options have improved. The choice of the treatment regimen depends on the stage of disease and specific factors which are characteristic for every patient. Nowadays there are some possibilities for applying the pharmacogenetic profile in order to predict the efficacy of the applied drug and its toxicity. Specific markers for the estimation of drug response and toxicity in an individual patient allow to conduct individualized therapy and to use more optimized treatment methods with the combined use of chemotherapeutics which are estimated to have a safe level of toxicity. The polymorphism of genes which encode enzymes of the metabolic pathway of anticancer agents may influence the bioavailability and the risk of toxic action during colorectal cancer chemotherapy. The therapeutic application of humanized, monoclonal antibodies like cetuximab and bevacizumab may have a positive effect but only in a selected patient group. Similarly, the possible use of markers of disease progression (prognostic markers) as well as markers of the efficacy of allow to monitor the treatment course.

Słowa kluczowe: farmakogenetyka, indywidualizacja terapii, rak jelita grubego**Key words:** pharmacogenetics, individualization of therapy, colorectal cancer**Wprowadzenie**

Rak jelita grubego stanowi jedną z głównych przyczyn zgonów z powodu nowotworów na świecie. Pomimo uzyskania znacznej poprawy u niektórych pacjentów po zastosowaniu terapii nowymi lekami, takimi jak irinotekan czy cetuksymab, w znacznej grupie chorych obserwuje się działania niepożądane przy równoczesnej niskiej sku-

teczności leczenia. Podczas, gdy leczenie chirurgiczne jest we wczesnych fazach choroby leczeniem z wyboru, to chemioterapia i stosowanie leków ukierunkowanych molekularnie mogą zapewnić znaczną poprawę również w grupie pacjentów z bardziej zaawansowanymi stadiami nowotworu. Wskazanie do leczenia uzupełniającego, ustalenie i wybór schematu dawkowania dla pacjentów w zaawansowanych stadiach choroby napotyka wiele trudności. Dostępne leki stosowane w chemioterapii raka jelita grubego charakteryzują się wąskim indeksem terapeutycznym. Uzyskanie pożądanego efektu terapeutycznego wiąże się z koniecznością podawania możliwie wysokiej dawki, która jest związana z możliwie najniższym ryzykiem wystąpienia poważnych działań niepożądanych. Obecnie dobre wyniki leczenia można uzyskać dzięki wytypowaniu pacjentów szczególnie podatnych na efektywną chemioterapię. Przy ocenie pacjenta należy

Pracownia Biologii Molekularnej i Farmakogenomiki
Zakład Biochemii Farmaceutycznej
Wydział Farmaceutyczny
Uniwersytet Medyczny w Łodzi
ul. Muszyńskiego 1

Praca finansowana ze środków Komitetu Badań Naukowych (P05F 02628), jako grant promotorski oraz z badań statutowych UM w Łodzi (503-3015-2)

brać pod uwagę kilka czynników: interakcje międzylekowe, stopień histologicznego zróżnicowania guza, wiek, płeć oraz stopień zaawansowania choroby. Natomiast genetycznie uwarunkowana zmienność w zakresie chemiowrażliwości wiąże się z występowaniem różnych wariantów genetycznych w ludzkim genomie. Znanych jest kilka rodzajów polimorfizmu, wśród nich najważniejsze to: SNP (polimorfizm pojedynczych nukleotydów – *single nucleotide polymorphism*), D/I (polimorfizm delacja/insercja) oraz VNTR (polimorfizm zmiennej liczby tandemowych powtórzeń – *variable number of tandem repeats*). Obserwowane w ciągu kilkunastu ostatnich lat przyspieszenie w badaniach farmakogenetycznych przyczyniło się do lepszego zrozumienia indywidualnych różnic w toksyczności i skuteczności farmakoterapii. Niniejszy przegląd przedstawia najnowsze dane o farmakogenetycznych markerach, mogących wpływać na zwiększenie skuteczności terapii raka jelita grubego takimi cytostatykami jak: 5-fluorouracyl (5-FU), irinotekan (CPT-11) czy oksaliplatylna. Poruszone zostaną również problemy skuteczności terapii celowanej nowymi lekami, takimi jak przeciwciała monoklonalne: cetuksymab i bewacyzumab.

5-fluorouracyl (5-FU)

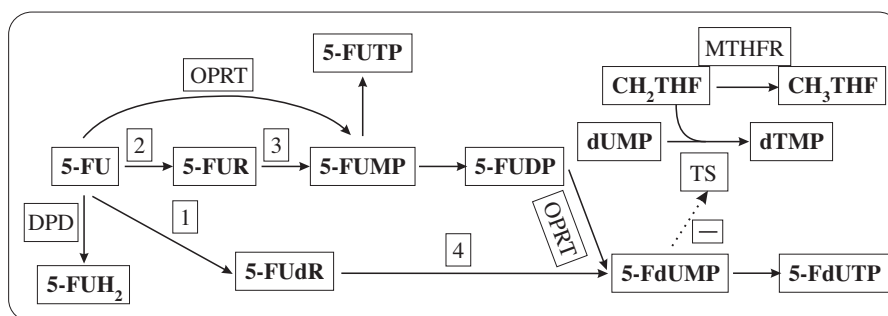
5-FU jest analogiem pirymidyny, stosowanym od wielu lat w leczeniu nowotworów jelita grubego, piersi oraz głowy i szyi. W połączeniu z leukoworyną (LV) stanowi złoty standard w leczeniu II i III stadium raka jelita grubego. W bardziej zaawansowanych stadiach stosuje się poza kombinacją 5-FU/LV dodatkowo irinotekan lub oksaliplatylnę, co znacznie podnosi skuteczność terapii [1, 2]. Generalnie terapia 5-FU jest dobrze znoszona przez pacjentów, a ograniczenia w możliwości stosowania dużych dawek wiążą się z występowaniem reakcji toksycznych: nudności, wymioty, biegunki, mielo-, kardio- i neurotoksyczność.

Syntaza tymidylowa (TS)

Enzym TS katalizuje wewnątrzkomórkową konwersję dezoksyurydyny do dezoksytymidyny, która jest podstawowym źródłem tymidyny w komórce. Aktywny metabolit 5-FU, 5-FdUMP (monofosforan 5-fluoro-2'-dezoksyurydyny) wiąże się z TS, tworząc wolnodysocjujący kompleks (Ryc. 1) [3]. Ekspresja genu *TS* jest czynnikiem predykcynym i prognostycznym w raku jelita grubego [4]. Wykazano istnienie funkcjonalnego polimorfizmu w regionie 5' genu *TS*. Zmienna liczba tandemowych powtórzeń w tym regionie (polimorfizm VNTR) wiąże się z poziomem ekspresji tego genu. Pacjenci chorzy na raka jelita grubego, u których w regionie 5' występują trzy powtórzenia w sekwencji tandemowej (*TS3R*), mają 2,6-krotnie wyższy poziom ekspresji TS, w porównaniu z osobami z dwoma powtórzeniami (*TS2R*) w tej sekwencji. Zależność taka ma bezpośrednie przełożenie na skuteczność terapii 5-FU i czas przeżycia pacjenta, gdyż niski poziom TS u osób z dwoma powtórzeniami wiąże się ze zmniejszeniem skuteczności terapii tym cytostatykiem [5]. Ponadto opisano dodatkowy polimorfizm typu SNP w regionie 5' genu *TS*. Zamiana G→C przyczynia się do utraty miejsca wiązania czynnika transkrypcyjnego USF-1 (*upstream stimulatory factor 1*), co z kolei wywołuje spadek poziomu ekspresji *TS*. Wykazano, że powyższy SNP odpowiada za przejście wariantu *TS3R* w wariant *TS2R*, związany z obniżoną ekspresją *TS*. Dlatego też badanie obu polimorfizmów może posłużyć do przewidywania wyników leczenia 5-FU w raku jelita grubego [6].

Dehydrogenaza dihydropirymidynowa (DPD)

Enzym DPD odpowiada za katabolizm 80-90% dawki 5-FU do 5-FUH₂ (5-fluoro-5,6-dihydrouracyl) w wątrobie (Ryc. 1) [7]. Opisano ponad 15 polimorfizmów genu *DPD*, prowadzących do spadku jego aktywności. W białej populacji kaukaskiej 3-5% osobników ujawnia obniżo-



Ryc. 1. Mechanizm działania i szlak metaboliczny 5-fluorouracylu

5-FU (5-fluorouracyl), 5-FUdR (5-fluoro-2'-dezoksyurydyna), 5-FUR (5-fluorourydyna), 5-FUMP (monofosforan 5-fluorourudyny), 5-FUDP (difosforan 5-fluorourudyny), 5-FUTP (trifosforan 5-fluorourudyny), 5-FdUMP (monofosforan 5-fluoro-2'-dezoksyurydyny), 5-FdUTP (trifosforan 5-fluoro-2'-dezoksyurydyny), 5-FUH₂ (5-fluoro-5,6-dihydrouracyl), dUMP (monofosforan dezoksyurydyny), dTMP (monofosforan dezoksytymidyny), CH₂THF (5,10-metylenotetrahydrofolian), CH₃THF (5-metylotetrahydrofolian), TS (syntaza tymidylowa), DPD (dehydrogenaza dihydropirymidynowa), OPRT (fosforybozylotransferaza orotanowa), MTHFR (reduktaza metylenotetrahydrofolianowa), 1 (fosforylaza tymidynowa), 2 (fosforylaza urydynowa), 3 (kinaza urydynowa), 4 (kinaza tymidynowa)

nią aktywność DPD [8]. Ze stosunkowo małą częstością (około 1,3%) jest obserwowany polimorfizm SNP, polegający na zamianie G→A w intronie 14 genu *DPD*, co skutkuje powstaniem w procesie cięcia i składania jego dodatkowego wariantu mRNA. Powstające białko o skróconej sekwencji aminokwasowej jest pozbawiane funkcji enzymatycznej [9]. Ograniczona w ten sposób aktywność DPD, przyczynia się do wzrostu ilości niezmetabolizowanej dawki 5-FU, a tym samym do znacznego wzrostu toksyczności terapii (mielosupresja 4 stopnia oraz poważna neurotoksyczność) [10]. Równie rzadko występującym SNP jest polimorfizm T85C w eksonie 2, którego konsekwencją jest zmiana w sekwencji aminokwasowej DPD (C29R) [11]. Jednakże wpływ tej zmiany na aktywność enzymatyczną DPD nie jest jeszcze do końca wyjaśniony. Inne polimorfizmy występujące zarówno w regionie promotorowym oraz w sekwencji kodującej *DPD* jak dotąd nie zostały szczegółowo przebadane.

Fosforybozylotransferaza orotanowa (OPRT)

Enzym OPRT katalizuje redukcję FUDP (difosforan 5-fluorourydyny) do aktywnego metabolitu FdUMP, będącego inhibitorem TS (Ryc. 1). Ostatnie badania sugerują, że istnieje związek pomiędzy poziomem OPRT, a wrażliwością na terapię 5-FU [12]. Funkcjonalny SNP A213G genu *OPRT* może przyczyniać się do wzrostu aktywności enzymu. Obecność allele A w eksonie 3 wiąże się ze wzrostem toksyczności terapii 5-FU u pacjentów chorych na raka jelita grubego [13].

Reduktaza metylenotetrahydrofolianowa (MTHFR)

Ludzki gen *MTHFR* koduje enzym odpowiedzialny za przemianę CH_2THF (5,10-metylenotetrahydrofolianu) do CH_3THF (5-metylotetrahydrofolianu). Enzym ten bezpośrednio odpowiada za regulację przepływu folianów niezbędnych do syntezy kwasów nukleinowych. TS tworzy potrójny kompleks w skład którego wchodzi obok 5-FdUMP, CH_2THF pełniący rolę kofaktora (Ryc. 1). Nieodpowiedni poziom CH_2THF przyczynia się do spadku efektywności terapii 5-FU, dlatego też leczenie uzupełniane jest podawaniem kwasu foliowego (LV), będącego prekursorem CH_2THF [14].

Polimorfizm w genie *MTHFR* A1298C przyczynia się do spadku aktywności enzymatycznej MTHFR, co prowadzi do kumulacji CH_2THF . Ponadto opisano inny polimorfizm w pozycji C677T, który występuje ze znaczną częstością w populacji kaukaskiej (częstość TT_{677} wynosi 10%). Pacjenci posiadający allele T_{677} lub genotyp TT_{677} są bardziej narażeni na wystąpienie mielosupresji podczas terapii 5-FU, w porównaniu z nosicielami genotypu CC_{677} . Obniżenie aktywności MTHFR może zwiększać poziom folianu, co nasila inhibicję TS przez FdUMP; przyczynia się to do wzrostu ryzyka wystąpienia poważnego uszkodzenia szpiku kostnego (leukopenia 4 stopnia). Oznaczanie powyższych polimorfizmów *MTHFR*

może prowadzić do wzrostu efektywności terapii 5-FU oraz pozwoli uniknąć niekorzystnych działań toksycznych stosowanego leku [15].

Irinotekan (CPT-11)

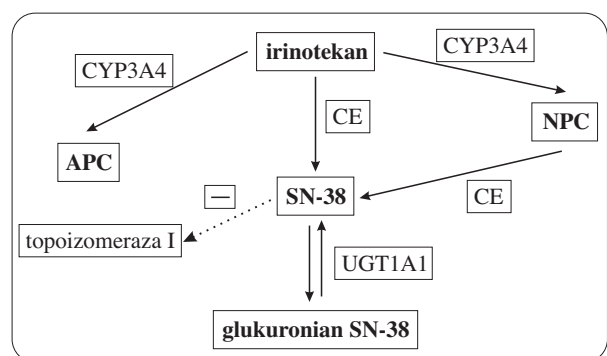
CPT-11 jest półsyntetycznym analogiem naturalnego alkaloidu kamptotecyny, będącym skutecznym cystostatykiem w leczeniu zaawansowanych stadiów raka jelita grubego w połączeniu ze schematem 5-FU/LV [2]. Najczęstszą przyczyną ograniczenia w stosowaniu maksymalnych dawek jest pojawiająca się neutropenia (3 i 4 stopnia) oraz odległe w czasie ciężkie biegunki. W zależności od schematu dawkowania z różną częstością mogą występować działania niepożądane po zastosowaniu CPT-11, ale zwykle dotyczy to blisko 1/3 wszystkich pacjentów [16].

Karboksyloesteraza (CE)

CPT-11 jest metabolizowany do postaci aktywnej SN-38 (7-etylo-10-hydroksykamptotecyna) przy udziale karboksyloesterazy. SN-38 odpowiada za aktywność farmakologiczną irinotekanu, który jest inhibitorem topoizomerazy I (Ryc. 2) [17]. Topoizomeraza uczestniczy w procesie replikacji i transkrypcji DNA, zapobiegając naprężeniom, jakie powstają w trakcie rozplatania nici DNA. Ostatnio zidentyfikowano 9 wariantów allelicznych w genie *CE*, które tworzą strukturę haplotypową (warianty genetyczne współdziedziczone, genetycznie sprzężone). Być może niektóre spośród tych haplotypów są ważnymi czynnikami odpowiedzialnymi za modyfikację toksykologicznego profilu irinotekanu [18].

Glukuronylotransferaza-UDP (UGT)

Wątrobowy UGT1A1 jest głównym enzymem uczestniczącym w metabolizmie CPT-11. Inaktywuje on czynny metabolit SN-38 poprzez jego sprzęgnięcie z kwasem glukuronowym (Ryc. 2). Jednakże aktywność UGT1A1 może być znacząco zmniejszona w wyniku zmian polimorficznych w genie *UGT1A1*. Opisano wpływ polimorfizmu VNTR w regionie promotorowym tego genu na



Ryc. 2. Mechanizm działania i szlak metaboliczny irinotekanu

APC (7-etylo-10-[4-N-(5-aminopentanowy kwas)-1-piperidyno]karbonyloksykamptotecyna), NPC (7-etylo-10-(4-amino-1-piperidyno)karbonyloksykamptotecyna), SN-38 (7-etylo-10-hydroksykamptotecyna), CE (karboksyloesteraza), UGT1A1 (glukuronylotransferaza-UDP1A1)

zmniejszenie aktywności UGT1A1. Obecność siedmiu powtórzeń dinukleotydowego tandemu (TA)₇TAA (allel *UGT1A1**28) prowadzi do obniżenia poziomu transkrypcji genu *UGT1A1*, a tym samym zmniejsza się aktywność wątrobowej UGT1A1 [19]. Skutkuje to 7-krotnym wzrostem częstości występowania u nosicieli allele *UGT1A1**28 toksyczności 3 i 4 stopnia, w porównaniu z osobami posiadającymi dwa allele dzikie (TA)₆TAA (homozygoty dzikie) [20]. Ponadto wśród pacjentów, u których obserwowano silne reakcje toksyczne po podaniu CPT-11, opisano również obecność polimorfizmu T3263G, zlokalizowanego w części odpowiedzialnej za modulowanie transkrypcji *UGT1A1* (miejsce wiązania czynników transkrypcyjnych, związanych z indukcyjnym wpływem fenobarbitalu na transkrypcję) [21]. Dodatkowo w sekwencji kodującej *UGT1A1* opisano polimorfizm C686A (allel *UGT1A1**27), którego obecność notuje się u pacjentów z poważnymi reakcjami toksycznymi [22]. W grupie enzymów klasy UGT w wątrobie stwierdzono również obecność enzymu UGT1A7 oraz UGT1A9, które są zaangażowane w proces sprzęgania SN-38 [23]. W genie *UGT1A9* opisano polimorfizm G766A (ekson 1), który skutkuje zmianą w sekwencji aminokwasowej enzymu (D256N). Zmniejszeniu ulega efektywność sprzęgania SN-38 z glukuronianem poniżej 5%, w porównaniu z osobnikami będącymi nosicielami genotypu GG₇₆₆ [24]. Wszystkie powyżej opisane zmiany polimorficzne mogą być włączone do farmakogenetycznej analizy toksyczności i efektywności terapii CPT-11.

Oksaliplatyna

Oksaliplatyna jest cytostatykiem III generacji, będącym pochodną stosowanej od wielu lat w terapii przeciwnowotworowej cisplatyny, ale charakteryzującym się lepszym od niej indeksem terapeutycznym [25]. Jego mechanizm działania opiera się na zdolności tworzenia adduktów z DNA, co zaburza proces jego replikacji. Jednakże skuteczność terapeutyczna oksaliplatyny może być ograniczona w wyniku wzrostu tolerancji komórki na obecność adduktów DNA oraz znacznego wzrostu aktywności systemów naprawy DNA. Wpływ na skuteczność terapii oksaliplatyną ma funkcjonowanie genów rodziny *ERCC* (*excision repair cross-complementing gene family*) [26] oraz aktywność transferazy S-glutationowej GSTP1 [27].

Rodzina genów *ERCC*

W raku jelita grubego istnieje odwrotna zależność między poziomem ekspresji genów *ERCC* (*ERCC1* i *ERCC2*) a skutecznością terapii oksaliplatyną [26]. Geny *ERCC* są częścią głównego systemu naprawy DNA w komórkach nowotworowych zwanego NER (*nucleotide excision repair*), który odpowiada za usuwanie dużych zmian strukturalnych w DNA, wywołanych obecnością adduktów tworzonych przez oksaliplatynę [28].

Głównym członkiem rodziny *ERCC* jest gen *ERCC1*, kodujący silnie konserwatywne białko zaangażowane w szlak naprawy NER [29]. Wykazano, że niski

poziom ekspresji *ERCC1* wiąże się z wydłużeniem czasu przeżycia pacjentów chorych na zaawansowanego raka jelita grubego, leczonych schematem 5-FU/oksaliplatyna, a będących opornymi na terapię pierwszego rzutu. Ponadto niski poziom ekspresji zarówno *ERCC1* jak i *TS* również wiązał się z wydłużeniem czasu przeżycia takich pacjentów [26]. W grupie pacjentów leczonych schematem 5-FU/oksaliplatyna w kodonie 118 oznaczono cichy polimorfizm SNP (C→T), który ma wpływ na poziom mRNA *ERCC1*. Osoby posiadające allel C mają niższy poziom mRNA w porównaniu z pozostałą grupą chorych. Nie jest jednak do końca jasne, jak cichy polimorfizm wpływa na proces transkrypcji *ERCC1*. Dalszych badań wymaga również oznaczenie wpływu tego polimorfizmu na czas przeżycia pacjentów chorych na raka jelita grubego, poddanych leczeniu tym schematem [30].

Gen *ERCC2* (zwany też *XPD*) koduje helikazę, która współtworzy czynnik transkrypcyjny TFIIH i należy również do białek zaangażowanych w szlak naprawy NER [31]. W kodonie 751 opisano SNP (A→C), którego konsekwencją jest zamiana lizyny na glutaminę w sekwencji aminokwasowej białka XPD (K751Q) [32]. Lepszą odpowiedź na terapię kombinowaną 5-FU/oksaliplatyna obserwowano u homozygot dzikich (KK₇₅₁), w porównaniu z heterozygotami (KQ₇₅₁) i homozygotami zmutowanymi (QQ₇₅₁) [33]. Jednakże molekularny mechanizm tej zależności nie został dostatecznie wyjaśniony. Nieznany jest również wpływ pozostałych czynników zaangażowanych w szlak naprawy NER na skuteczność terapii oksaliplatyną.

Transferaza S-glutationowa (GSTP1)

Izoenzym GSTP1 (GST π) należy do rodziny transferaz S-glutationowych (GSTs), zaangażowanych w proces sprzęgania aktywnych elektrofilów z trójpeptydem glutationem (GSH). Pełni on rolę protekcyjną, chroni komórkę przed szkodliwym wpływem różnych reaktywnych związków, w tym metabolitów I fazy biotransformacji leków [34]. Wzrost ekspresji genu *GSTP1* w komórce nowotworowej prowadzi do zwiększenia oporności na leczenie niektórymi cytostatykami, w tym na oksaliplatynę i cisplatynę [35]. W sekwencji kodującej *GSTP1* opisano polimorfizm A313G, skutkujący zamianą izoleucyny na walinę w sekwencji aminokwasowej (Ile105Val). Zamiana taka powoduje zmniejszenie aktywności GSTP1 poprzez osłabienie wiązania substratu z centrum aktywnym enzymu [36]. W retrospektywnej analizie przeprowadzonej u pacjentów leczonych schematem 5-FU/oksaliplatyna wykazano, że osoby będące homozygotami zmutowanymi (GG₃₁₃) odznaczały się dłuższym czasem przeżycia, w porównaniu z pacjentami z genotypem AG₃₁₃ oraz AA₃₁₃. Wyniki te pokrywają się z przewidywaniami, że obniżenie aktywności GSTP1 (GG₃₁₃) przyczynia się do wzrostu skuteczności terapii oksaliplatyną [37].

Przeciwciała monoklonalne (cetuksymab, bewacyzumab)

Terapia celowana z zastosowaniem przeciwciał monoklonalnych jest z powodzeniem stosowana w terapii raka jelita grubego, szczególnie w bardziej zaawansowanych stadiach choroby. Uzyskano poprawę czasu przeżycia pacjentów poprzez zastosowanie leków dla których celem terapeutycznym jest receptor naskórkowego czynnika wzrostu EGFR (*epidermal growth factor receptor*) oraz naczyniowy czynnik wzrostu VEGF (*vascular endothelial growth factor*) [38]. Obecnie nie ma danych na temat ewentualnych wariantów polimorficznych i ich wpływu na toksyczność i/lub skuteczność terapii bewacyzumabem. Sporo jest natomiast doniesień na temat wpływu determinantów genetycznych na terapię cetuksymabem, który jest rekombinowanym humanizowanym (ludzkie/mysie) chimerycznym przeciwciałem monoklonalnym, łączącym się specyficznie z EGFR [39]. Do innych leków, które są obecnie w fazie badań klinicznych, a których ewentualne zastosowanie w terapii celowanej raka jelita grubego jest badane, należy: panitumumab i matuzumab (przeciwciała monoklonalne skierowane przeciwko EGFR), edrecolomab (mysie monoklonalne przeciwciało skierowane przeciwko EpCAM, *epithelial cell adhesion molecule*) [40].

Receptor naskórkowego czynnika wzrostu EGFR

EGFR należy do rodziny erbB (zwanej HER) i posiada aktywność kinazy tyrozynowej. Aktywacja przez EGFR wewnątrzkomórkowej kaskady sygnałów prowadzi do wzrostu proliferacji komórek oraz ich migracji, a także pobudza angiogenezę z równoczesnym hamowaniem apoptozy. Cetuksymab łączy się z zewnątrzkomórkową domeną EGFR i blokuje jego aktywację [41]. Polimorfizm VNTR obserwowany w 1 intronie genu *EGFR*, polegający na zwielokrotnieniu liczby tandemowych powtórzeń pary nukleotydów (CA)_n, wiąże się ze spadkiem poziomu transkrypcji tego genu w miarę wzrostu liczby powtórzeń [42]. Jednakże badania te nie są jednoznacznie potwierdzone pod względem możliwości detekcji białka metodą immunohistochemiczną. Wskazuje się jednak na to, że immunohistochemia jest metodą subiektywną i półilościową, więc nie dającą precyzyjnych danych, które mogłyby służyć do profilowania pacjenta [43]. Natomiast poziom ekspresji *EGFR* w komórkach raka jelita grubego wpływa na prognozowanie przebiegu choroby oraz leczenie schematem 5-FU/oksaliplatyna. Progresa choroby była znacznie większa w przypadkach z genotypem (CA)₁₆/(CA)₁₆, w porównaniu z genotypami (CA)₁₆/(CA)₁₈ i (CA)₁₆/(CA)₂₀. Związek tego polimorfizmu ze skutecznością terapii oksaliplatyną można częściowo tłumaczyć działaniem synergistycznym tego cytostatyku, który może wiązać się z blokowaniem szlaku aktywacji EGFR oraz działaniem na cykl komórkowy [44]. Brak jest obecnie danych na temat wpływu tego polimorfizmu na terapię cetuksymabem. Wiadomo jednak, że mimo negatywnego wyniku badania immunohistochemicznego

u części pacjentów z rakiem jelita grubego uzyskuje się pozytywną odpowiedź na terapię cetuksymabem [45]. Do innych badanych polimorfizmów należy funkcjonalny SNP G497A, który skutkuje zmianą w sekwencji aminokwasowej w zewnątrzkomórkowej domenie receptora (Arg→Lys). U pacjentów chorych na raka odbytnicy, którzy posiadają allel G₄₉₇ oraz mniej niż 20 powtórzeń (CA)_n, występuje zwiększone ryzyko lokalnych nawrotów po zastosowaniu adiuwantowej lub neoadiuwantowej chemioradioterapii [44].

Cyklina D1 (CCND1)

Wstępne badania wśród pacjentów z zaawansowanym rakiem jelita grubego leczonych cetuksymabem wskazują na możliwy wpływ polimorfizmu genu *CCND1*, kodującego białko zaangażowane w regulację cyklu komórkowego. Cyklina D1 hamuje cykl komórkowy w fazie G1, po tym jak cetuksymab zablokuje EGFR. Częsty polimorfizm w eksonie 4 genu *CCND1* skutkuje powstaniem dwóch *splice*-wariantów. Wstępne badania pokazują jedynie na możliwy związek genotypu (heterozygoty) z wydłużeniem czasu przeżycia, jednakże pilotażowy charakter badań nie pozwała jeszcze na wysnucie jednoznacznych wniosków [46].

Markery prognostyczne i predykcyjne

Markery prognostyczne określają naturalną dynamikę i kierunek procesu nowotworowego dla indywidualnego przypadku. Natomiast markery predykcyjne pozwalają przewidywać, jakie potencjalne korzyści może przynieść pacjentowi określona strategia terapeutyczna. Logicznym jest więc postępowanie, w którym będziemy rozważać wpływ obu typów markerów na wynik leczenia.

Utrata heterozygotyczności (LOH)

W około 70% przypadków raka jelita grubego notuje się występowanie zjawiska utraty heterozygotyczności (LOH, *loss of heterozygosity*) części chromosomów 17p i/lub 18q. Istotne z punktu widzenia rozwoju tego nowotworu są geny zlokalizowane na tych utraconych fragmentach: *P53* i *DCC* (*deleted in colorectal cancer*).

Mutacje genu supresorowego *P53*, notowane w 40-60% przypadków raka jelita grubego, są uważane za potencjalne markery prognostyczne [47]. Ostatnio sugeruje się, że poziom ekspresji i obecność mutacji tego genu mogą mieć wartość predykcyjną. Badania wśród pacjentów z II i III stopniem zaawansowania choroby, poddanych resekcji chirurgicznej guza bez podawania chemioterapii uzupełniającej, wskazują, że obecność mutacji *P53* wiąże się z gorszą prognozą, podczas gdy takiej zależności nie stwierdzono wśród pacjentów z włączoną chemioterapią 5-FU [48]. W innych doświadczeniach stwierdzono, że u pacjentów w III stadium choroby, poddanych chemioterapii 5-FU i posiadających nadekspresję *P53*, nie stwierdza się znaczącego wydłużenia życia, podczas gdy u pacjentów bez nadekspresji takie korzystne wydłużenie

czasu przeżycia zaobserwowano. Jednakże nadal możliwość predykcyjnego zastosowania P53 w terapii 5-FU jest kontrowersyjna [49].

Na chromosomie 18q znajduje się gen *DCC*, którego produkt białkowy odpowiedzialny jest za zjawisko adhezji. W badaniach przeżycia pacjentów chorych na raka jelita grubego stwierdzono, że utrata 18q lub zmniejszenie ekspresji *DCC* w komórkach guza prowadzi do zmniejszenia odsetka 5-letnich przeżyć, w porównaniu z pacjentami, u których zachowały się obie kopie genu. Ponadto, zachowanie obu alleli 18q wiąże się z lepszym wynikiem leczenia 5-FU w III stadium zaawansowania choroby [50]. W pobliżu genu *DCC* zlokalizowane są dwa inne geny *DPC4* i *JV18-1*, które są zaliczane do supresorów [51]. Możliwe jest, że utrata regionu 18q, zawierającego kilka genów supresorowych, może być potencjalnym markerem prognostycznym i predykcyjnym w raku jelita grubego.

Niestabilność mikrosatelitarna (MSI)

Niestabilność mikrosatelitarna (MSI, *microsatellite instability*) występuje powszechnie w wielu typach nowotworów i jest obserwowana w 10-14% przypadków sporadycznych raków jelita grubego. Do wystąpienia zjawiska MSI przyczyniają się mutacje zlokalizowane w genach MMR (*mismatch repair genes*), do których należą: *hMSH2*, *hMLH1* i *hMSH6*. Produkty białkowe tych genów odpo-

wiadają za naprawę uszkodzeń DNA, powstałych podczas procesu replikacji. Wśród pacjentów z II i III stopniem zaawansowania raka jelita grubego stwierdzono wydłużenie czasu przeżycia w przypadkach z wysokim MSI [52]. Dodatkowo, porównując grupę pacjentów MSI z pacjentami, u których stwierdzono stabilność mikrosatelitarną (MSS, *microsatellite stable*), ustalono, że MSI wydłuża czas wolny od choroby, ale nie przynosi korzyści w chemioterapii uzupełniającej [53]. Inne badania wskazują jednak na możliwy korzystny wpływ obecności MSI na skuteczność terapii adiuwantowej 5-FU [54].

Dane literaturowe wskazują, że w rakach jelita grubego często MSI współlistnieje z mutacją genu *TGFBR2* (*transforming growth factor beta type II receptor gene*), kodującego receptor TGFβ RII [55]. TGFβ jest wielofunkcyjnym peptydem, zaangażowanym między innymi w procesy różnicowania i wzrostu komórki. Ostatnie badania wskazują, że 61% pacjentów z III stopniem zaawansowania raka jelita grubego, którzy mają wysoki stopień MSI, są nosicielami mutacji TGFβ RII. Ponadto grupa pacjentów poddanych chemioterapii adiuwantowej 5-FU z MSI i mutacją TGFβ RII charakteryzuje się większym odsetkiem 5-letnich przeżyć, w porównaniu z pacjentami bez tej mutacji, poddanych tej samej terapii [50]. Sugeruje się, że prawidłowa funkcja TGFβ RII (brak mutacji *TGFBR2*) we wczesnej fazie rozwoju nowotworu przyczynia się do supresji choroby, gdyż może równoważyć skutki aktywacji szlaku *Ras*. Natomiast niektóre

Tab. I. Genetyczne determinanty odpowiedzi na chemioterapię w raku jelita grubego

| Cytostatyk | Nazwa genu | Determinanta genetyczna | Wpływ na terapię |
|---------------|---------------|------------------------------|-----------------------------------|
| 5-FU | <i>TS</i> | 5' TS2R (VNTR) | zmniejszenie skuteczności terapii |
| | | 5' G→C (SNP) | |
| | <i>DPD</i> | IVS14+1G→A | wzrost toksyczności terapii |
| | | T85C | ??? |
| | | <i>OPRT</i> | A213G |
| <i>MTHFR</i> | A1298C | wzrost toksyczności terapii | |
| | C677T | | |
| | <i>CE</i> | różne warianty alleliczne | ??? |
| CPT-11 | <i>UGT1A1</i> | (TA) _n TAA (VNTR) | wzrost toksyczności terapii |
| | | C686A | |
| Oksaliplatyna | <i>UGT1A9</i> | G766A | |
| | <i>ERCC1</i> | C→T kodon 118 | wydłużenie czasu przeżycia |
| | <i>ERCC2</i> | A→C kodon 751 | zmniejszenie skuteczności terapii |
| | <i>GSTP1</i> | A313G | wydłużenie czasu przeżycia |
| | <i>EGFR</i> | (CA) _n (VNTR) | zmiana skuteczności terapii |
| Cetuksymab | <i>CCND1</i> | SNP ekson 4 | wydłużenie czasu przeżycia ??? |

TS (syntaza tymidylowa), DPD (dehydrogenaza dihidropirymidynowa), OPRT (fosforybozylotransferaza orotanowa), MTHFR (reduktaza metylenotetrahydrofolianowa), CE (karboksylotransferaza), UGT (glukuroniltransferaza-UDP), ERCC (*excision repair cross-complementing gene family*), GST (transferaza S-glutationowa), EGFR (receptor naskórkowego czynnika wzrostu), CCND1 (cyklina D1)

mutacje genu *TGFBR2* mogą funkcjonować jako supresory rozwoju nowotworów w bardziej zaawansowanych stadiach choroby nowotworowej [56]. Obecnie oznaczenie MSI w kontekście jego znaczenia predykcyjnego nie jest celowe do czasu opracowania odpowiednich dużych badań klinicznych w tym zakresie.

Podsumowanie

Farmakogenetyka badająca wpływ pojedynczych genów na toksyczność i skuteczność terapii może przyczynić się do indywidualizacji terapii. Uzyskanie pozytywnych wyników leczenia jest jednak zależne od wpływów wieloczynnikowych, czyli wariantów genetycznych i poziomów ekspresji wielu genów (farmakogenomika). Dlatego też przyszłość należy do badań pozwalających na profilowanie pacjenta z użyciem narzędzi farmakogenomicznych. Polimorfizmy genów *UGT1A1* i *DPD* są bardzo dobrymi markerami toksyczności terapii CPT-11 i 5-FU. Natomiast polimorfizmy genów *GSTP1*, *ERCC* i *EGFR* mogą być potencjalnie odpowiedzialne za skuteczność terapii, jednakże ilość dostępnych danych klinicznych, potwierdzających ich praktyczne zastosowanie, jest zbyt mała (Tab. I). Tylko odpowiednio zaplanowane, duże badania kliniczne, mogą przyczynić się do wyjaśnienia wpływu poszczególnych wariantów genetycznych na farmakologię leków stosowanych w terapii przeciwnowotworowej. Możliwe jest też ustalenie odpowiednio dużego panelu markerów zarówno prognostycznych, jak i predykcyjnych, których oznaczenie pozwoliłoby na bardziej kompleksową ocenę przewidywanych korzyści z zastosowanej terapii.

Prof. dr hab. n. farm. Marek Mirowski

Pracownia Biologii Molekularnej i Farmakogenomiki
Zakład Biochemii Farmaceutycznej
Wydział Farmaceutyczny
Uniwersytet Medyczny w Łodzi
ul. Muszyńskiego 1, 90-151, Łódź
mail: mpanczyk@am.edu.pl
mmirowski@pharm.am.lodz.pl

Piśmiennictwo

- de Gramont A, Figer A, Seymour M i wsp. Leucovorin and fluorouracil with or without oxaliplatin as first-line treatment in advanced colorectal cancer. *J Clin Oncol* 2000; 18: 2938-47.
- Saltz LB, Cox JV, Blanke C i wsp. Irinotecan plus fluorouracil and leucovorin for metastatic colorectal cancer. Irinotecan Study Group. *N Engl J Med* 2000; 343: 905-14.
- Danenber PV. Thymidylate synthetase – a target enzyme in cancer chemotherapy. *Biochim Biophys Acta* 1977 473: 73-92.
- Watanabe T, Wu TT, Catalano PJ i wsp. Molecular predictors of survival after adjuvant chemotherapy for colon cancer. *N Engl J Med* 2001; 344: 1196-206.
- Horie N, Aiba H, Oguro K i wsp. Functional analysis and DNA polymorphism of the tandemly repeated sequences in the 5'-terminal regulatory region of the human gene for thymidylate synthase. *Cell Struct Funct* 1995; 20: 191-7.
- Mandola MV, Stoecklacher J, Muller-Weeks S i wsp. A novel single nucleotide polymorphism within the 5' tandem repeat polymorphism of the thymidylate synthase gene abolishes USF-1 binding and alters transcriptional activity. *Cancer Res* 2003; 63: 2898-904.
- Heggie GD, Sommadossi JP, Cross DS i wsp. Clinical pharmacokinetics of 5-fluorouracil and its metabolites in plasma, urine, and bile. *Cancer Res* 1987; 47: 2203-6.
- McLeod HL, Collie-Duguid ES, Vreken P i wsp. Nomenclature for human DPYD alleles. *Pharmacogenetics* 1998; 8: 455-9.
- van Kuilenburg AB, Vreken P, Abeling NG i wsp. Genotype and phenotype in patients with dihydropyrimidine dehydrogenase deficiency. *Hum Genet* 1999; 104: 1-9.
- van Kuilenburg AB, Muller EW, Haasjes J i wsp. Lethal outcome of a patient with a complete dihydropyrimidine dehydrogenase (DPD) deficiency after administration of 5-fluorouracil: frequency of the common IVS14+1G>A mutation causing DPD deficiency. *Clin Cancer Res* 2001; 7: 1149-53.
- van Kuilenburg AB, Haasjes J, Richel DJ i wsp. Clinical implications of dihydropyrimidine dehydrogenase (DPD) deficiency in patients with severe 5-fluorouracil-associated toxicity: identification of new mutations in the DPD gene. *Clin Cancer Res* 2000; 6: 4705-12.
- Isshi K, Sakuyama T, Gen T i wsp. Predicting 5-FU sensitivity using human colorectal cancer specimens: comparison of tumor dihydropyrimidine dehydrogenase and orotate phosphoribosyl transferase activities with in vitro chemosensitivity to 5-FU. *Int J Clin Oncol* 2002; 7: 335-42.
- Ichikawa W, Takahashi T, Suto K i wsp. Orotate phosphoribosyltransferase gene polymorphism predicts toxicity in patients treated with bolus 5-fluorouracil regimen. *Clin Cancer Res* 2006; 12: 3928-34.
- Diasio RB, Johnson MR. The role of pharmacogenetics and pharmacogenomics in cancer chemotherapy with 5-fluorouracil. *Pharmacology* 2000; 61: 199-203.
- Cohen V, Panet-Raymond V, Sabbaghian N i wsp. Methylenetetrahydrofolate reductase polymorphism in advanced colorectal cancer: a novel genomic predictor of clinical response to fluoropyrimidine-based chemotherapy. *Clin Cancer Res* 2003; 9: 1611-5.
- Vanhoefer U, Harstrick A, Achterrath W i wsp. Irinotecan in the treatment of colorectal cancer: clinical overview. *J Clin Oncol*. 2001; 19: 1501-18.
- Humerickhouse R, Lohrbach K, Li L i wsp. Characterization of CPT-11 hydrolysis by human liver carboxylesterase isoforms hCE-1 and hCE-2. *Cancer Res* 2000; 60: 1189-92.
- Charasson V, Bellott R, Meynard D i wsp. Pharmacogenetics of human carboxylesterase 2, an enzyme involved in the activation of irinotecan into SN-38. *Clin Pharmacol Ther* 2004; 76: 528-35.
- Iyer L, King CD, Whittington PF i wsp. Genetic predisposition to the metabolism of irinotecan (CPT-11). Role of uridine diphosphate glucuronosyltransferase isoform 1A1 in the glucuronidation of its active metabolite (SN-38) in human liver microsomes. *J Clin Invest* 1998; 101: 847-54.
- Ando Y, Saka H, Ando M i wsp. Polymorphisms of UDP-glucuronosyltransferase gene and irinotecan toxicity: a pharmacogenetic analysis. *Cancer Res* 2000; 60: 6921-6.
- Kitagawa C, Ando M, Ando Y i wsp. Genetic polymorphism in the phenobarbital-responsive enhancer module of the UDP-glucuronosyltransferase 1A1 gene and irinotecan toxicity. *Pharmacogenet Genomics* 2005; 15: 35-41.
- Koiwai O, Yasui Y, Hasada K i wsp. Three Japanese patients with Crigler-Najjar syndrome type I carry an identical nonsense mutation in the gene for UDP-glucuronosyltransferase. *Jpn J Hum Genet* 1995; 40: 253-7.
- Gagne JF, Montminy V, Belanger P i wsp. Common human UGT1A polymorphisms and the altered metabolism of irinotecan active metabolite 7-ethyl-10-hydroxycamptothecin (SN-38). *Mol Pharmacol* 2002; 62: 608-17.
- Jinno H, Saeki M, Saito Y i wsp. Functional characterization of human UDP-glucuronosyltransferase 1A9 variant, D256N, found in Japanese cancer patients. *J Pharmacol Exp Ther* 2003; 306: 688-93.
- Boudny V, Vrana O, Gaucheron F i wsp. Biophysical analysis of DNA modified by 1,2-diaminocyclohexane platinum(II) complexes. *Nucleic Acids Res* 1992; 20: 267-72.
- Shirota Y, Stoecklacher J, Brabender J i wsp. ERCC1 and thymidylate synthase mRNA levels predict survival for colorectal cancer patients receiving combination oxaliplatin and fluorouracil chemotherapy. *J Clin Oncol* 2001; 19: 4298-304.
- Sweeney C, McClure GY, Fares MY i wsp. Association between survival after treatment for breast cancer and glutathione S-transferase P1 Ile105Val polymorphism. *Cancer Res* 2000; 60: 5621-4.
- Allen WL, Johnston PG. Have we made progress in pharmacogenomics? The implementation of molecular markers in colon cancer. *Pharmacogenomics* 2005; 6: 603-14.
- Wilson MD, Ruttan CC, Koop BF i wsp. ERCC1: a comparative genomic perspective. *Environ Mol Mutagen* 2001; 38: 209-15.

30. Park DJ, Zhang W, Stoehlmacher J i wsp. ERCC1 gene polymorphism as a predictor for clinical outcome in advanced colorectal cancer patients treated with platinum-based chemotherapy. *Clin Adv Hematol Oncol* 2003; 1: 162-6.
31. Sung P, Bailly V, Weber C i wsp. Human xeroderma pigmentosum group D gene encodes a DNA helicase. *Nature* 1993; 365: 852-5.
32. Spitz MR, Wu X, Wang Y i wsp. Modulation of nucleotide excision repair capacity by XPD polymorphisms in lung cancer patients. *Cancer Res* 2001; 61: 1354-7.
33. Park DJ, Stoehlmacher J, Zhang W i wsp. A Xeroderma pigmentosum group D gene polymorphism predicts clinical outcome to platinum-based chemotherapy in patients with advanced colorectal cancer. *Cancer Res* 2001; 61: 8654-8.
34. Boyer TD, Vessey DA, Holcomb C i wsp. Studies of the relationship between the catalytic activity and binding of non-substrate ligands by the glutathione S-transferases. *Biochem J* 1984; 217: 179-85.
35. Tsuchida S, Sato K. Glutathione transferases and cancer. *Crit Rev Biochem Mol Biol* 1992; 27: 337-84.
36. Srivastava SK, Singhal SS, Hu X i wsp. Differential catalytic efficiency of allelic variants of human glutathione S-transferase P1 in catalyzing the glutathione conjugation of thiotepa. *Arch Biochem Biophys* 1999; 366: 89-94.
37. Stoehlmacher J, Park DJ, Zhang W i wsp. Association between glutathione S-transferase P1, T1, and M1 genetic polymorphism and survival of patients with metastatic colorectal cancer. *J Natl Cancer Inst* 2002; 94: 936-42.
38. Nygren P, Sorbye H, Osterlund P i wsp. Targeted drugs in metastatic colorectal cancer with special emphasis on guidelines for the use of bevacizumab and cetuximab: an Acta Oncologica expert report. *Acta Oncol* 2005; 44: 203-17.
39. Ciardiello F, Tortora G. A novel approach in the treatment of cancer: targeting the epidermal growth factor receptor. *Clin Cancer Res* 2001; 7: 2958-70.
40. Utracka-Hutka B. Targeted therapy of colorectal cancer – state of the art. *Współczesna Onkologia* 2006; 10: 121-7.
41. Taberero J, Macarulla T, Ramos FJ i wsp. Novel targeted therapies in the treatment of gastric and esophageal cancer. *Ann Oncol* 2005; 16: 1740-8.
42. Gebhardt F, Zanker KS, Brandt B. Modulation of epidermal growth factor receptor gene transcription by a polymorphic dinucleotide repeat in intron 1. *J Biol Chem* 1999; 274: 13176-80.
43. McKay JA, Murray LJ, Curran S i wsp. Evaluation of the epidermal growth factor receptor (EGFR) in colorectal tumours and lymph node metastases. *Eur J Cancer* 2002; 38: 2258-64.
44. Zhang W, Park DJ, Lu B i wsp. Epidermal growth factor receptor gene polymorphisms predict pelvic recurrence in patients with rectal cancer treated with chemoradiation. *Clin Cancer Res* 2005; 11: 600-5.
45. Chung KY, Shia J, Kemeny NE i wsp. Cetuximab shows activity in colorectal cancer patients with tumors that do not express the epidermal growth factor receptor by immunohistochemistry. *J Clin Oncol* 2005; 23: 1803-10.
46. Zhang W, Gordon M, Press OA i wsp. Cyclin D1 and epidermal growth factor polymorphisms associated with survival in patients with advanced colorectal cancer treated with Cetuximab. *Pharmacogenet Genomics* 2006; 16: 475-83.
47. Kern SE, Fearon ER, Tersmette KW i wsp. Clinical and pathological associations with allelic loss in colorectal carcinoma [corrected]. *JAMA* 1989; 261: 3099-103.
48. Tang R, Wang JY, Fan CW i wsp. p53 is an independent pre-treatment markers for long-term survival in stage II and III colorectal cancers: an analysis of interaction between genetic markers and fluorouracil-based adjuvant therapy. *Cancer Lett* 2004; 210: 101-9.
49. Ahnen DJ, Feigl P, Quan G i wsp. Ki-ras mutation and p53 overexpression predict the clinical behavior of colorectal cancer: a Southwest Oncology Group study. *Cancer Res* 1998; 58: 1149-58.
50. Watanabe T, Wu TT, Catalano PJ i wsp. Molecular predictors of survival after adjuvant chemotherapy for colon cancer. *N Engl J Med* 2001; 344: 1196-206.
51. Papadimitrakopoulou VA, Oh Y, El-Naggar A i wsp. Presence of multiple inconspicuous deleted regions at the long arm of chromosome 18 in head and neck cancer. *Clin Cancer Res* 1998; 4: 539-44.
52. Gryfe R, Kim H, Hsieh ET i wsp. Tumor microsatellite instability and clinical outcome in young patients with colorectal cancer. *N Engl J Med* 2000; 342: 69-77.
53. Lim SB, Jeong SY, Lee MR i wsp. Prognostic significance of microsatellite instability in sporadic colorectal cancer. *Int J Colorectal Dis* 2004; 19: 533-7.
54. Ribic CM, Sargent DJ, Moore MJ i wsp. Tumor microsatellite-instability status as a predictor of benefit from fluorouracil-based adjuvant chemotherapy for colon cancer. *N Engl J Med* 2003; 349: 247-57.
55. Lu SL, Zhang WC, Akiyama Y i wsp. Genomic structure of the transforming growth factor beta type II receptor gene and its mutations in hereditary nonpolyposis colorectal cancers. *Cancer Res* 1996; 56: 4595-8.
56. Derynck R, Akhurst RJ, Balmain A. TGF-beta signaling in tumor suppression and cancer progression. *Nat Genet* 2001; 29: 117-29.

Otrzymano: 22 maja 2007 r.

Przyjęto do druku: 4 lipca 2007 r.