

A DIHIDROPIRIMIDIN-DEHIDROGENÁZ (DPD) ENZIM AKTIVITÁSÁNAK MEGHATÁROZÁSA C-14 JELZETT 5-FLUOROURACILLAL (5-FU)



**Kapuvári Bence, Kovács Judit, Mile Viktória,
Kőhalmy-Peebles Krisztina**

Országos Onkológiai Intézet, Biokémiai Osztály



XLVIII. Sugárvédelmi Továbbképző Tanfolyam
Gyula, 2023. április 18-20.

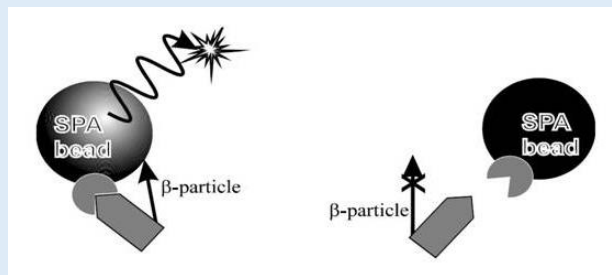
Biokémiai Osztály *in vitro* Izotóp Laboratórium

I. típusú, III. sugárvédelmi kategóriájú és „D” fizikai védelmi szintű
in vitro Izotópdiaosztikai Laboratórium



β -labor Felügyelt terület

- ❖ β^- -sugárzó izotópok alkalmazása
- ❖ **C-14**, H-3
- ❖ Folyadék szcintillációs mérési módszerek (pl: H-3-GnRH származékok vizsgálata)
- ❖ **HPLC-radiokémiai detektor szilárd szcintillátorral**
- ❖ Scintillation proximity assays



γ -labor Ellenőrzött terület

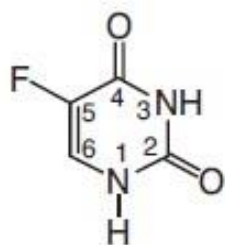
- ❖ γ -sugárzó izotópok alkalmazása
- ❖ főleg I-125 jelzett radioimmuno- (RIA) és immunoradiometriai assay (IRMA) módszerek
- ❖ Y-90: radio-immun terápiai szerek (pl.: Zevalin) tisztaság vizsgálata (TLC)
- ❖ Radionukliddal jelzett gyógyszerjelölt molekulák egérben történő biodisztribúciójának részletes vizsgálata (pl.: [I-125]Tyr⁵-GnRH származékok vizsgálata)

A Biokémiai Osztály 2022. évi izotópos labordiagnosztikai tevékenysége

Izotópos vizsgálat neve	Célja
Tireoglobulin (HTG)	Pajzsmirigy diszfunkciók (főként tumoros megbetegedések) laboratóriumi diagnosztikája és a betegek követése
Tireoglobulin elleni antitest (anti-HTG)	
Thyreoidea-peroxidáz elleni antitest (anti-TPO)	
Kalcitonin (ICT)	
TSH receptor elleni antitest (TRAK)	
Totál tesztoszteron (TE)	Teljes szexuál szteroid hormon profil meghatározása hormonfüggő daganatok diagnosztikája és a terápia követése
Ösztron (E1)	
Ösztron-szulfát (E1-S)	
Ösztradiol (E2) (ultraszenzitív kit)	
Progeszteron (PROG)	
Androszténdion (AD)	
Dehidroepiandroszteron (DHEA)	
DHEA-szulfát (DHEA-S)	
Szexuál hormonkötő globulin (SHBG)	Szénhidrát anyagcsere
C-peptid (CPD)	
Chromogranin A	Neuroendokrin daganatok
Dihidropirimidin dehidrogenáz szérum szintjének meghatározása (DPD)	5-FU anyagcsere vizsgálata

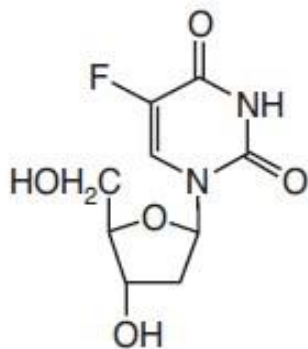
5-FU és társai (pirimidin metabolitok)

- Az 5-FU-t 1956-ban szabadalmaztatták és 1962-től használják a daganat terápiában.
- Sejtosztódást gátló kemoterápiás szer (prodrug). DNS, RNS károsítás; U→T gátlás.
- Elsősorban gastrointestinalis tumorok kezelésénél használják, de alkalmazzák fej-nyaki- és emlő daganatos betegeknél is.
- Sugárterápia előtt a daganat sugárérzékenyítésére is használják.



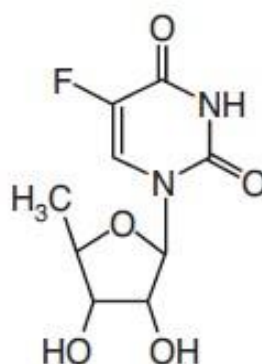
5-FU

5-fluorouracil



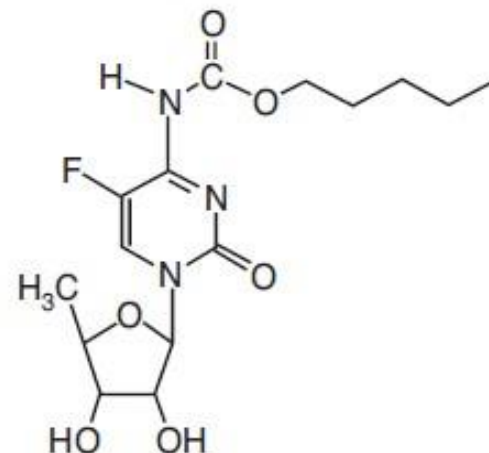
5-FdUrd

5-fluoro-2'-
deoxyuridine



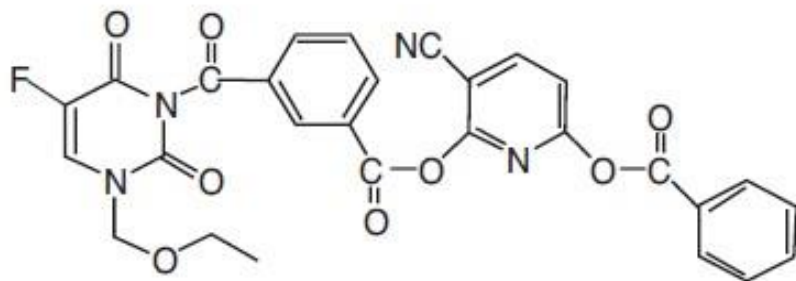
5'd5-FUrd

5'-deoxy-5-fluorouridine



CAP

capecitabine



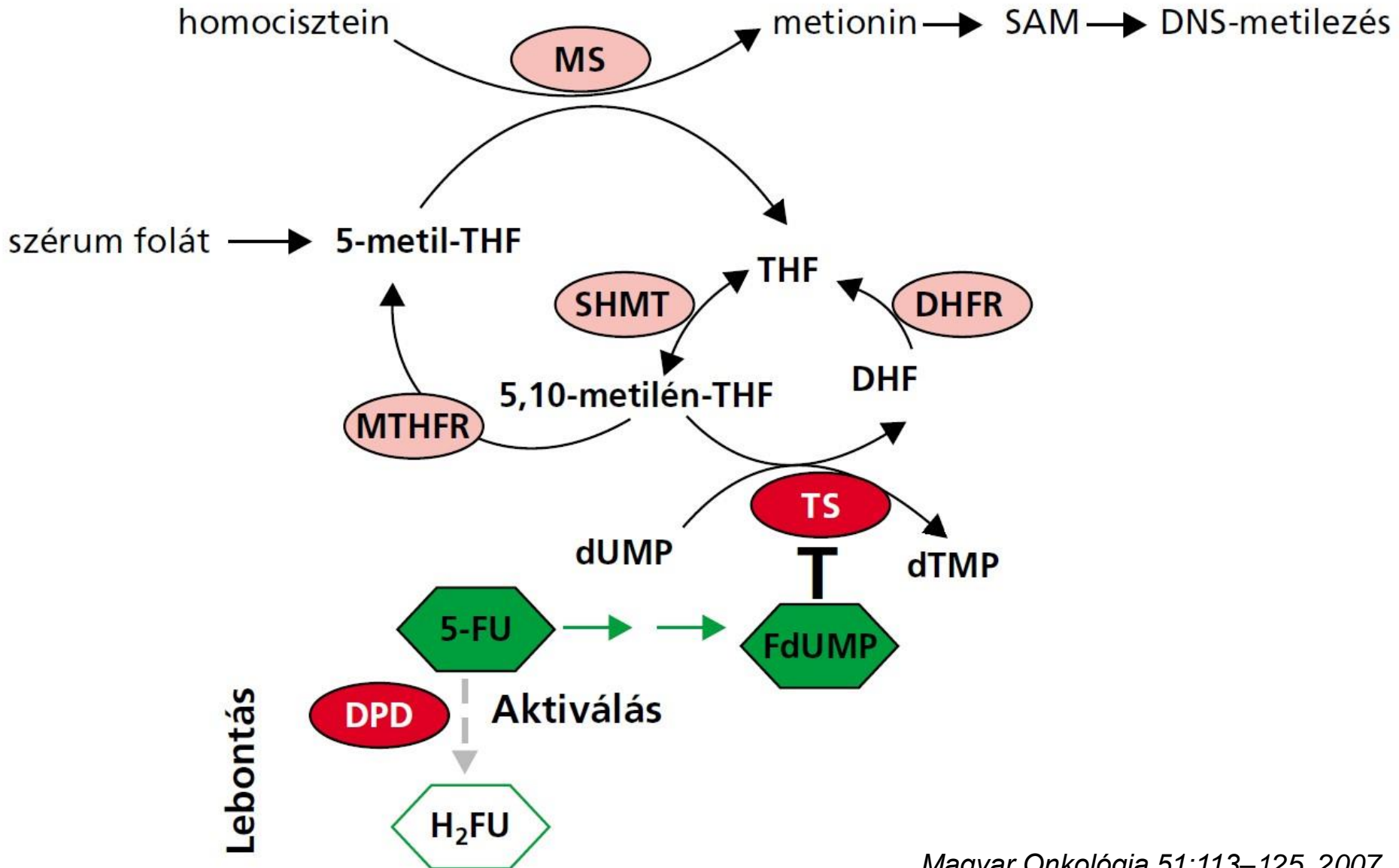
BOF-A2 emitefur



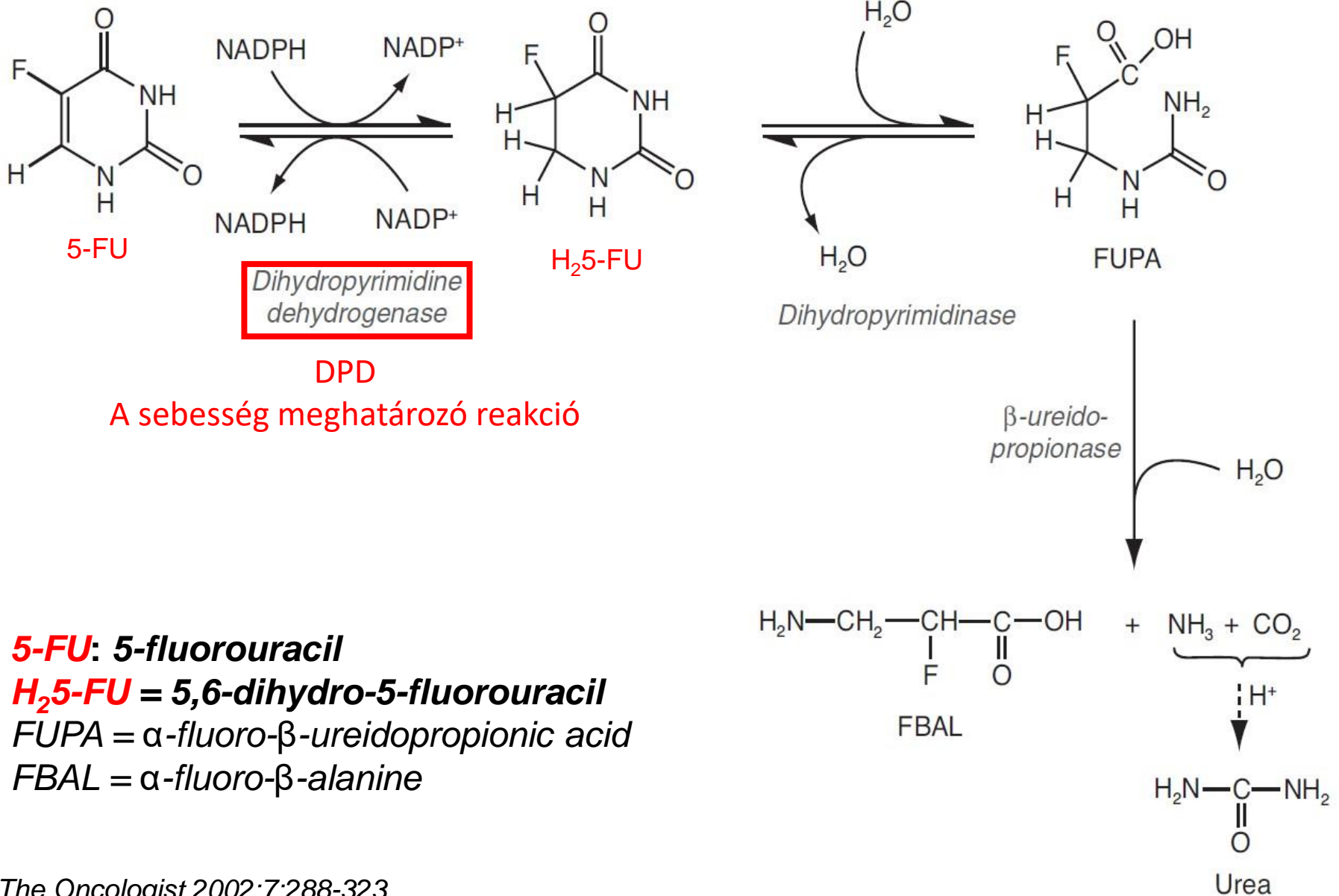
FTO

ftorafur

Az 5-fluoruracil metabolizmusában és hatásában szerepet játszó legfontosabb pirimidin- és folátanyagcsere-enzimek



Az 5-fluorouracil katabolizmusa



5-FU: 5-fluorouracil

H₂5-FU = 5,6-dihydro-5-fluorouracil

FUPA = α-fluoro-β-ureidopropionic acid

FBAL = α-fluoro-β-alanine

FONTOS GYÓGYSZERBIZTONSÁGI INFORMÁCIÓ

OGYÉI jóváhagyás dátuma: 2020. 05. 07. (<https://ogyei.gov.hu>)

Az 5-fluorouracilt (i.v.), kapecitabint, illetve tegafurt tartalmazó készítmények: a DPD-deficiencia kezelést megelőző szűrése a súlyos toxicitás fokozott kockázatának kitett betegek azonosítása érdekében

A DPD az 5-FU biodegradációjának sebesség-meghatározó enzime. A DPD aktivitása nagymértékű variabilitást mutat. Az enzim hiánya súlyos, néhány esetben akár halálos toxicitást is okozhat. Ugyan a **DPD enzim teljes hiánya** (familiáris pyrimidinaemia) nagyon ritka veleszületett autoszómás recesszíven öröklődő genetikai betegség (a kaukázusi rasszhoz tartozó populáció 0,01–0,5%-ánál fordul elő); ugyanakkor a nem szelektált **daganatos betegpopulációk 3%-át*** és a kaukázusi rasszhoz tartozó teljes populáció 3–9%-át érinti **részleges DPD hiány**.

- ✓ **A részleges vagy teljes dihidropirimidin-dehidrogenáz (DPD)-hiányban szenvedő betegeknél fokozott a súlyos toxicitás kialakulásának kockázata fluoropirimidin (5-FU, kapecitabin, tegafur) kezelés során.**
- ✓ **Ajánlott fenotípus- és/vagy genotípus-meghatározást végezni a fluoropirimidin-kezelés megkezdése előtt.**
- ✓ **Igazolt teljes DPD-hiányban szenvedő betegeknél ellenjavallt az 5-FU-t, kapecitabint vagy tegafurt tartalmazó gyógyszerekkel történő kezelés.**
- ✓ **Azonosított, részleges DPD-hiányban szenvedő betegeknél mérlegelendő alacsonyabb kezdő dózis alkalmazása.**
- ✓ **Folyamatos 5-fluorouracil infúzióval kezelt betegeknél a klinikai kimenetelt javíthatja a fluorouracil terápiás gyógyszer-szint-monitorozása (TDM).**

FONTOS GYÓGYSZERBIZTONSÁGI INFORMÁCIÓ

OGYÉI jóváhagyás dátuma: 2020. 05. 07. (<https://logyei.gov.hu>)

A DPD-aktivitás vizsgálata a kezelés előtt (1)

Az optimális vizsgálati módszertan körüli bizonytalanságok ellenére ajánlott a kezelés előtt DPD-hiányra irányuló vizsgálatot végezni az olyan betegek azonosítása érdekében, akiknél fennállhat a súlyos toxicitás kockázata.

Mind a DPD-t kódoló gén (DPYD) genotípus-meghatározása, mind pedig az uracil vérplazma szintjének mérése útján történő fenotípus-meghatározás elfogadott módszer.

Figyelembe kell venni a DPD genotípus- és fenotípus-meghatározásra vonatkozó nemzeti irányelveket is.

A genotípus meghatározása

A súlyos toxicitás fokozott kockázatával négyféle DPYD genotípus-variánst (c.1905+1G>A, c.1679T>G, c.2846A>T és c.1236G>A/HapB3) hoztak összefüggésbe. Egyéb ritka DPYD genotípus-variánsok is összefügghetnek a súlyos toxicitás fokozott kockázatával.

Könnyen fals pozitív eredményt kaphatunk, mivel csak az enzimfehérje esetleges jelenlétét, illetve hiányát mutatják ki és nem veszik figyelembe az enzimaktivitást.

A DPD-aktivitás vizsgálata a kezelés előtt (2)

A fenotípus meghatározása

A DPD-hiány a kezelés előtti emelkedett uracil-plazmaszintekkel jár együtt. Ha az uracil vérszintje ≥ 16 ng/ml és < 150 ng/ml értéket mutat, az részleges DPD-hiányt jelez, míg a ≥ 150 ng/ml érték teljes DPDhiányt tükröz.

Terápiás gyógyszerszint-monitorozás (TDM) 5-FU-lal (iv.) kezelt betegeknél

Az előzetes DPD-vizsgálat kiegészítéseként a fluorouracil terápiás gyógyszerszint-monitorozása javíthatja a folyamatos intravénás 5-FU-lal kezelt betegeknél a klinikai kimenetelt. A kívánt AUC-célértéknek elvileg 20 és 30 mg \times óra/l között kell lennie.

Sajnos a DPD enzim aktivitásának radioenzimológiai meghatározása nincs a OGYÉI ajánlásban.

β -labor (felügyelt terület)

Az OOI Biokémiai Osztályának *in vitro* Izotópdiagnosztikai Laboratóriumában az 5-FU és egyéb pirimidin antimetabolitok kezelésben részesülő daganatos betegek lymphocyta DPD aktivitását határoztuk meg radioenzimológiai módszerrel a kezelés előtt és a kezelés folyamán.



A DPD radioenzimológiai meghatározása

- 1) **Perifériás mononukleáris sejtek (limfociták) szeparálása:** A betegektől levett 10 ml (15% EDTA „lila cső”) alvadásgátlót tartalmazó teljes vérmintából Ficoll-gradiensben történt a perifériás mononukleáris sejtek szeparálása. A sejtszámot Bürker-kamrában történt számolással határoztuk meg és a sejteket további feldolgozásig folyékony nitrogénben tároltuk.
- 2) **DPD radioenzimológiai meghatározása: (Naguib és mtsai ; Biochemical Pharmacology, Vol. 38, No. 9, pp. 1471-1480, 1989.)**
 - a) **A sejtek feltárása** folyékony nitrogénben történő fagyasztással és 25°C-on való felolvasztással (3x30 sec) történt. A feltárt sejteket 30 percig centrifugáltuk 20 000 g-n. A DPD enzim meghatározását a citoszolból végeztük.
 - b) **Az enzimreakció:** Az enzimet tartalmazó citoszolt inkubáltuk [6-¹⁴C]5-Fluorouracillal NADPH-val, és egyéb kofaktorokkal (NAD, MgCl₂, nikotinamid, DTT) kálium-foszfát pufferben (20 mM, pH=7,6) 37 °C-on, **0 illetve 40 percig**. Az inkubáció befejezése után a reakciót jéghideg 96%-os etanollal állítottuk le.
 - c) **Az enzimreakció kiértékelése:** A DPD enzim hatására keletkezett katabolitot [6-¹⁴C]-H₂5-FU-t (dihidro-5-fluorouracil) és a maradék [6-¹⁴C]-5-FU-t folyadékromatográfiás (HPLC) módszerrel választottuk szét. A detektálás radiokémiai detektorral történt. A DPD enzim aktivitás értékét H₂5-FU mennyiségében adtuk meg **pmol/perc/1 millió limfocita** egységben.

Radioaktív sugárforrás:

[6-¹⁴C]5-Fluorouracil 1,85 MBq (etanolt tartalmazó vizes oldat (1:1))

Fajlagos aktivitás: 1,98 GBq/mmol

Radioaktív koncentráció: 3,7 MBq/cm³

Izinta kereskedelmi Kft. (Moravek Biochemicals, Inc.)

[6-¹⁴C]5-Fluorouracil szubsztrát minőség ellenőrzése Wallac MicroBeta[®] TriLux, 1450-024 folyadék szcintillációs mérőműszerrel

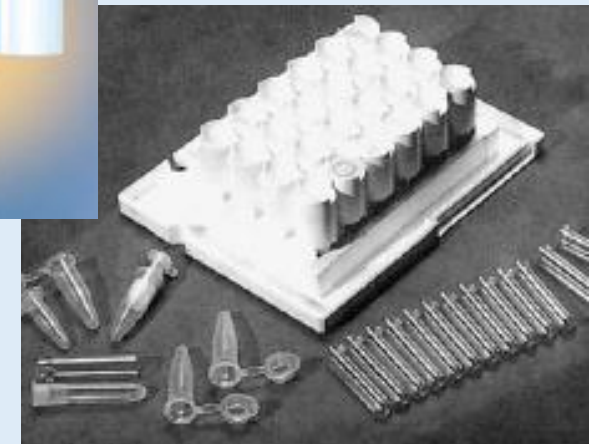
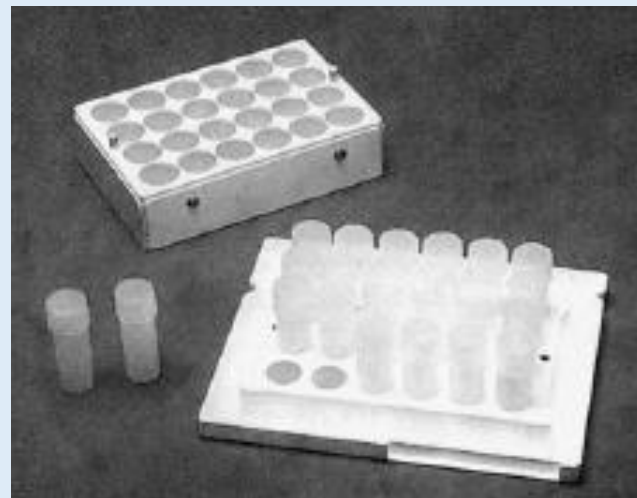
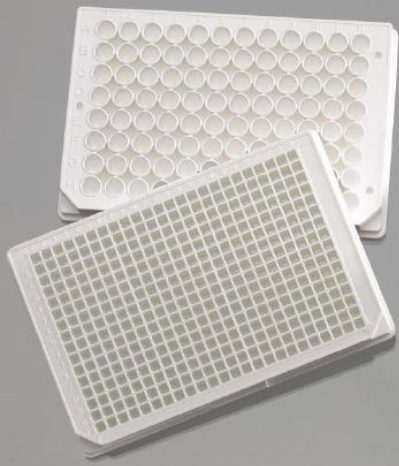
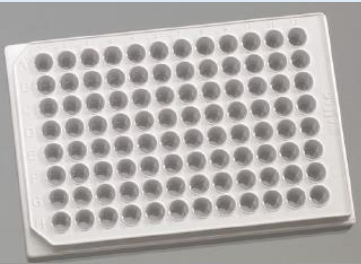
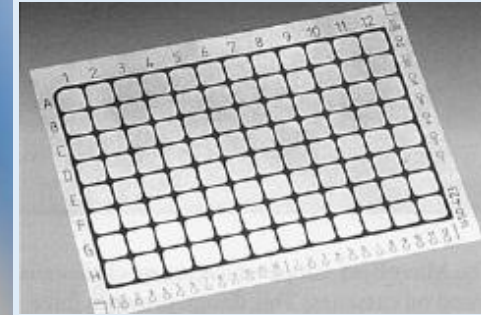
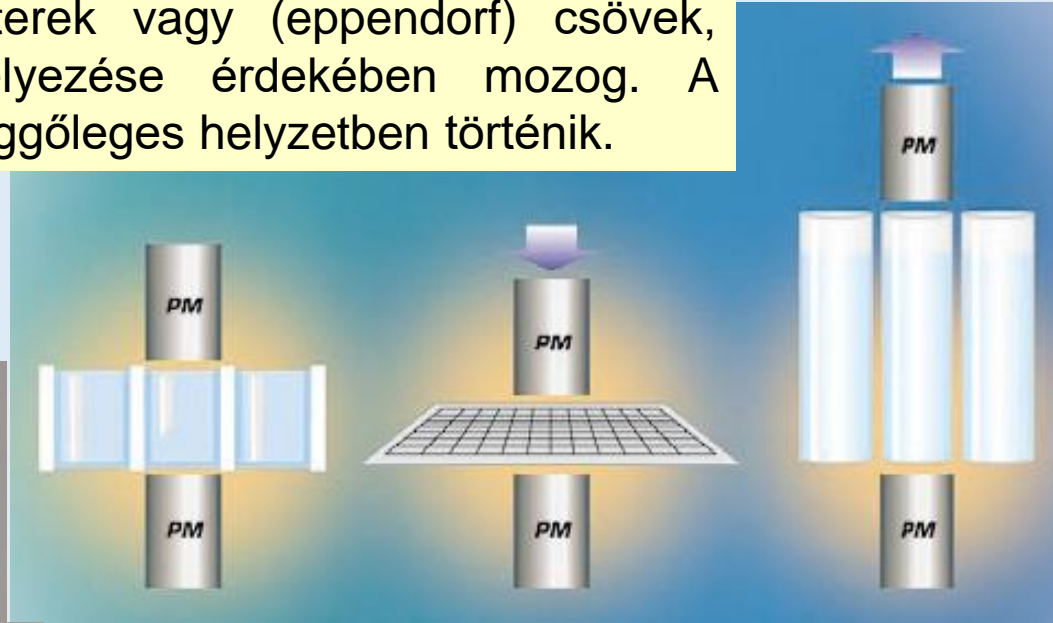
[6-¹⁴C]5-Fluorouracil törzsoldatból hígított aliquotokat két aktivitás-koncentráció tartományban ellenőrizzük:

- 1) 100.000 cpm → 130.000 dpm
- 2) 250.000 cpm → 350.000 dpm



A Wallac MicroBeta® TriLux flexibilitása

A MicroBeta® TriLux felső detektora a lemezek, filterek vagy (eppendorf) csövek, vial-ok elhelyezése érdekében mozog. A mérés így függőleges helyzetben történik.



A MicroBeta TriLux® alkalmazható ^3H , ^{14}C , ^{32}P , ^{33}P , ^{35}S , ^{51}Cr , ^{125}I radioizotópok mérésére



Thermo Scientific™ Hypersil™ ODS C18 Columns



Oszlop típus	Előtét oszlop	Analitikai oszlop
Átmérő	4 mm	4.6 mm
Hossz	10 mm	250 mm
Max. nyomás	5800 psi (400 bar)	5800 psi (400 bar)
Részecske méret	5 µm	5 µm
pH	2 to 8	2 to 8
Álló fázis	C18	C18
Katalógus szám	30105-014001	30105-254630



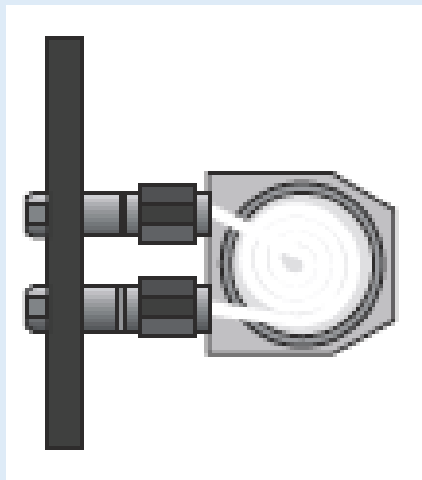
Előtét oszlop alkalmazása:

Nem poláris, közepesen poláris, lipofil vegyületek, például trigliceridek szétválasztása, minta előtisztítása

FLOWSTAR² LB 514

Radiokémiai detektor HPLC rendszerekhez

Ittrium üveg, szilárd szcintillátoros átfolyós cella:



- Nagyon vékony teflon vagy „Halar” tömlőből áll, amely finom szcintillátor szemcsékkel (70-90 µm) van feltöltve.
- A szilárd szcintillációs részecskék kezeletlen vagy felületkezelt ittrium üveg formában is kaphatók, hogy minimalizálják a ragadós analitok memóriahatását.
- Térfogata: 400 µL (150 µL)



Teszt cella GLP-hez:



- Zárt üvegkapilláris
- Szilárd, szervesetlen szcintillátor
- Aktivitás: 2,25 kBq (60,9 nCi)
- Referencia érték: 77619 cpm

**Speciális HPLC program:
RadioStar v 5.0.12.6**

Eluens: Gradiens nincs

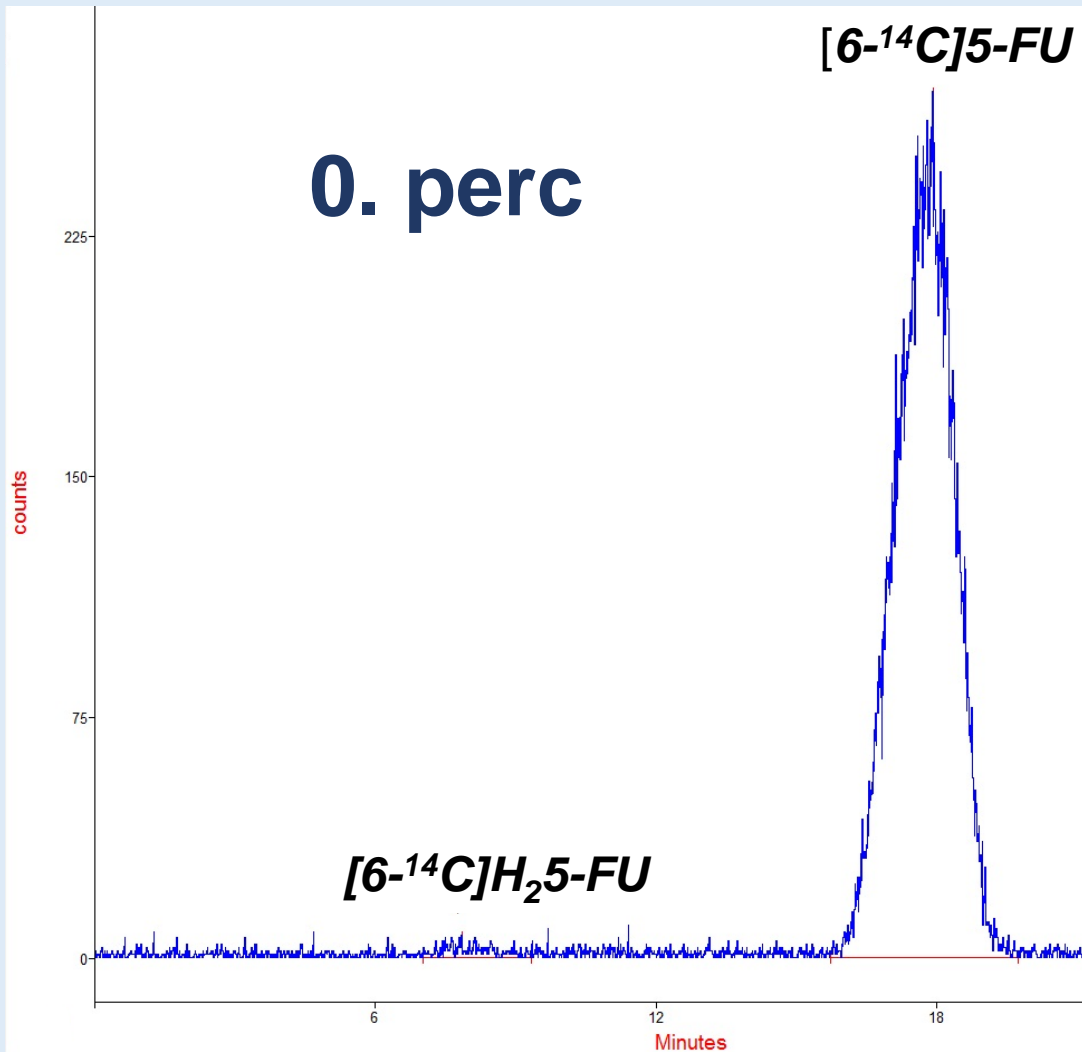
A oldat: Tetra-n-butil-ammónium-hidrogén-szulfát (pH: 7,8)

B oldat: KH_2PO_4 (pH: 7,8)

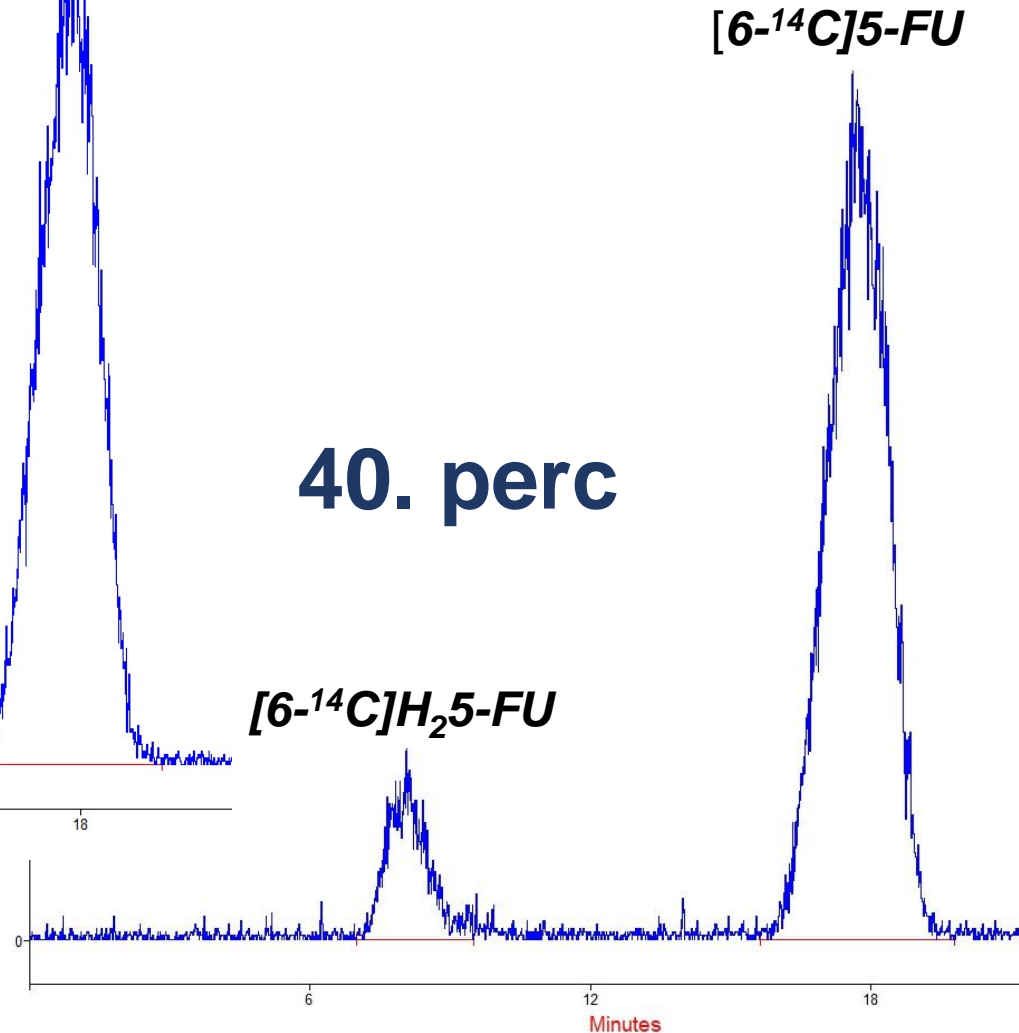
A oldat: B oldat = 1:1 (V_A/V_B)

Áramlási sebesség: 0,5 mL/perc

0. perc



40. perc



[6-¹⁴C]5-FU

- 0. perc
- 40. perc

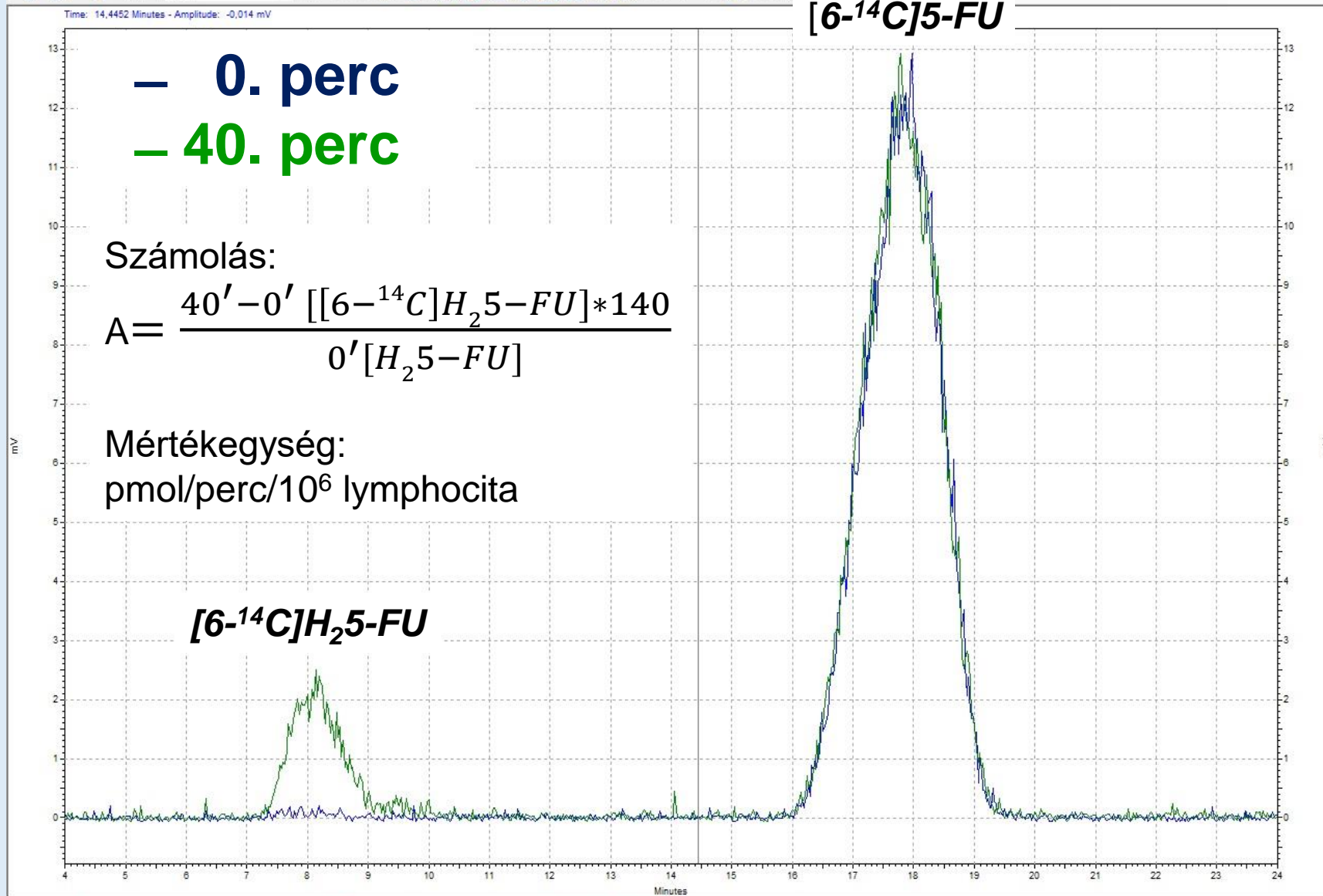
Számolás:

$$A = \frac{40' - 0' \text{ [[6-}^{14}\text{C]H}_2\text{5-FU]} * 140}{0' \text{ [H}_2\text{5-FU]}}$$

Mértékegység:

pmol/perc/10⁶ lymphocita

[6-¹⁴C]H₂5-FU



Klinikai Értékelés

≥ 10 pmol/perc/ 1 millió lymphocita esetén a kezelés hatására amúgy is kialakuló mellékhatásokon és azok súlyosságán kívül más nem várható.

< 10 pmol/perc/ 1 millió lymphocita esetén (szürke zóna) a mellékhatások fokozódása várható → az 5-FU dózis csökkentése javasolt.

< 5 pmol/perc/ 1 millió lymphocita esetén súlyos toxicitás várható → az 5-FU kezelés felfüggesztése és más , alternatív kezelés javasolt.

Lelet

Megnevezés	Érték	M.e.	Megjegyzés	Eltérés	Referencia értékek	
Dihidropirimidin dehidrogenáz		pmol/perc/ 1 millió lymphocita			---	---
<10 pmol/perc/1 millió lymphocita esetén a mellékhatások fokozódása várható					10,00	100,00
<5 pmol/perc/1 millió lymphocita esetén súlyos toxicitás várható					10,00	100,00
DPD 2	fehérje meghatározás					
DPD 3	sejtfeltárás					
DPD 4	limfocita szeparálás					

Nem OOI betegeknek: ~ 26.500 HUF + ÁFA/lelet

Összefoglalás

A több éves tapasztalataink és a klinikus kollégák visszajelzései alapján

Hátrányok

- *In vitro* izotópdiagnosztikai labor és a hozzá kapcsolódó sugárvédelmi és egyéb követelmények szükségesek.
- Drága az izotóp készítmény.
- Viszonylag bonyolult, több lépcsős mérés, több hibalehetőség.
- Szakértelmet és szakmai tapasztalatot igényel (nem elég csak „etetni a gépet”)
- Speciális berendezések (radiokémiai detektor)

Előnyök

- ✓ Az izotópos mérési módszerekhez képest alacsony aktivitás. Elegendő vele a felügyelt területen dolgozni.
- ✓ A tényleges enzim aktivitást méri ezért nincs fals pozitív mérési eredmény.
- ✓ Érzékeny.
- ✓ Reprodukálható.
- ✓ Kiváló predikációs képesség
- ✓ A betegek követésére is alkalmas. (Főleg, ha az aktivitás a szürke zónában van.)
- ✓ A „Gold-standard mérés”

Az izotópos módszer indokoltsága vitathatatlan.



A Biokémiai Osztály dolgozói (Az előadó nélkül)



Prof. Dr. Nagy Péter
mb. osztályvezető

Prof. Dr. Patócs Attila
Balázs
mb. osztályvezető



Susztrik
Beatrix

Képiró
Éva

Akacs
Beáta

Kovács
Judit

Dr. Kőhalmy-
Peebles
Krisztina
Katalin

Mile Viktória Ph.D.

Láncz Zoltánné
Déri Margit



H-3 és C-14 izotópos üveg edények mosogatása

- ✓ A megfelelően kiürített üveg edényeket arra a célra kijelölt fedővel ellátott áztató műanyag vödörben 3 napig áztatjuk bioonos-ultrás (2 + 2 evőkanál) vízben.
- ✓ **Fontos: A H-3 és C-14 izotóppal szennyezett edényeket külön-külön feliratozott vödörben gyűjtjük!**
- ✓ Az áztatás kezdetének időpontját a fedőn feltüntetjük.
- ✓ Az áztatási idő letelte után a vödörben levő edényekre a hideg csapvizet bőven folytatjuk, majd átöblítjük.
- ✓ Öblítés után az edényeket 5 %-os Pico Kleen N dekontamináló oldatban 1 éjszakán át állni hagyjuk.
- ✓ A dekontamináló oldatból kiszedve az edényeket csapvízzel ismételten átöblítjük , majd az izotópos mosogatógép kosarába rakjuk.
- ✓ A mosogatógéppel 1 mosóporos és 3 sima vizes mosást alkalmazunk.
- ✓ A mosási fázisok lejárta után az edényeket desztillált vízzel átöblítjük (megmerítjük) és száradni hagyjuk.

Thermo Scientific™ Hypersil™ ODS C18 Columns



Column Format	Guard Cartridge, 4 Pk.
Diameter (Metric)	4 mm
For Use With	Separation of Non-Polar, Moderately Polar, Lipophilic Compounds Like Triglycerides
Length (Metric)	10 mm
Max. Pressure	5800 psi (400 bar)
Particle Size	5 µm
pH	2 to 8
Pore Size	120 Å
Surface Area	170 m ² /g
Temperature	60°C
USP Type	L1
Stationary Phase	C18
Product Line	Hypersil Classical
Packing Material	Silica
Carbon Load	10%
Column Type	Reversed Phase
Endcapped	Yes
Phase	Reversed Phase
Unit Size	Pack of 4
Catalog number	30105-014001

Column Format	Analytical Column
Diameter (Metric)	4.6 mm
Length (Metric)	250 mm
Max. Pressure	5800 psi (400 bar)
Particle Size	5 µm
pH	2 to 8
Pore Size	120 Å
Surface Area	170 m ² /g
Temperature	60°C
USP Type	L1
Stationary Phase	C18
Product Line	Hypersil Classical
Packing Material	Spherical, Fully Porous Type A Silica
Carbon Load	10%
Column Type	Reversed Phase
Endcapped	Yes
Phase	Reversed Phase
Unit Size	Each
Catalog number	30105-254630