

Γενετική Ανάλυση Παραλλαγών του γονιδίου DPYD για την εξατομίκευση της θεραπείας με 5' FU

Genetic Analysis of DPYD Gene Variants to Personalize 5' FU Therapy

ΔΙΠΛΩΜΑΤΙΚΗ ΕΡΓΑΣΙΑ

Κόντου Ελένη

ΑΜ:1817034

Πάτρα, 2023

ΤΡΙΜΕΛΗΣ ΕΞΕΤΑΣΤΙΚΗ ΕΠΙΤΡΟΠΗ

Πατρινός Γεώργιος, Επιβλέπων Καθηγητής,
Καθηγητής Φαρμακευτικής Βιοτεχνολογίας και Φαρμακογονιδιοματικής
Τμήμα Φαρμακευτικής, Πανεπιστήμιο Πατρών

Μπαλατσός Νικάλαος, Συνεπιβλέπων Καθηγητής,
Επίκουρος Καθηγητής Βιοχημείας
Τμήμα Βιοχημείας και Βιοτεχνολογίας, Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας

Ψαρρά Άννα-Μαρία Μέλος τριμελούς επιτροπής,
Αναπληρώτρια Καθηγήτρια Βιοχημείας
Τμήμα Βιοχημείας και Βιοτεχνολογίας, Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας

ΕΥΧΑΡΙΣΤΙΕΣ

Η παρούσα προπτυχιακή διπλωματική εργασία εκπονήθηκε, σε συνεργασία με το εργαστήριο Φαρμακογονιδιωματικής και Εξατομικευμένης Ιατρικής Θεραπείας του Τμήματος Φαρμακευτικής του Πανεπιστημίου Πατρών.

Πρωτίστως, θα ήθελα να ευχαριστήσω θερμά τον επιβλέποντα Καθηγητή κ. Πατρινό Γεώργιο που με εμπιστεύτηκε, μου ανέθεσε την παρούσα εργασία και μου προσέφερε τις πολύτιμες συμβουλές του.

Επιπλέον, θα ήθελα να ευχαριστήσω τον Επίκουρο Καθηγητή Βιοχημείας κ. Μπαλατσό Νικόλαο και την Αναπληρώτρια Καθηγήτρια κα. Ψαρρά Άννα Μαρία, οι οποίοι αποδέχτηκαν την πρόταση να συμμετέχουν στην τριμελή επιτροπή.

Ιδιαίτερως, θα ήθελα να ευχαριστήσω την υποψήφια διδάκτορα Τσιρώνη Άννα, που ανέλαβε την εργαστηριακή μου εκπαίδευση, καθώς και την παρακολούθηση της πειραματικής μου πορείας, αλλά και της συγγραφής. Η στήριξη της αποτέλεσε κομβικό παράγοντα στην εκπόνηση της εργασίας μου και πλέον, είμαι στην ευχάριστη θέση να την θεωρώ φίλη μου.

Τα μέλη του εργαστηρίου προσέφεραν πολύτιμες συμβουλές και την απαραίτητη βοήθεια, όποτε αυτή χρειάστηκε. Ευχαριστώ όλους θερμά.

Βάσια, χωρίς εσένα αυτή η πτυχιακή δεν θα ήταν το ίδιο ευχάριστη. Ευχαριστώ πάρα πολύ για την ψυχολογική, αλλά και για την επιστημονική βοήθεια που ανελλιπώς μου παρείχες.

Τέλος, στους γονείς μου και στον αδερφό μου, οφείλω ένα μεγάλο ευχαριστώ, διότι με την ακατάπαυστη στήριξή τους κατάφερα και ολοκλήρωσα τις σπουδές μου.

Εύχομαι να είναι περήφανοι για μένα.

ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Η φθοριοουρακίλη είναι ένα αντικαρκινικό φάρμακο, που ανήκει στην κατηγορία των αντιμεταβολιτών. Χρησιμοποιείται για πάνω από 60 χρόνια στην θεραπεία όγκων συμπαγών οργάνων και κυρίως, στον γαστρικό και ορθοκολικό καρκίνο. Λόγω των σοβαρών ανεπιθύμητων ενεργειών που εμφανίζει, κρίνεται σημαντικός ο καθορισμός της καταλληλότερης δοσολογίας για κάθε ασθενή ξεχωριστά. Η ετερογένεια που παρουσιάζεται σε σχέση με την απόκριση σε μία φαρμακευτική αγωγή μεταξύ των ατόμων, μπορεί να αιτιολογηθεί από την ύπαρξη γενετικών παραλλαγών σε γονίδια που συμμετέχουν στη μεταφορά και στο μεταβολισμό του φαρμάκου.

Διάφοροι μονονουκλεοτιδικοί πολυμορφισμοί του γονιδίου *DPYD* έχουν μελετηθεί ως ενδεχόμενοι φαρμακογονιδιωματικοί δείκτες, στο πεδίο της αντικαρκινικής αγωγής και της απόκρισης των ασθενών σε αυτή. Μέχρι στιγμής, τέσσερις είναι οι πολυμορφισμοί στο γονίδιο αυτό που μελετώνται εκτενέστερα. Στην παρούσα εργασία, εστιάζουμε σε δύο εξ αυτών, τον rs3918290 (*DPYD**2A) και τον rs55886062 (*DPYD**13) , καθώς εκείνοι φαίνεται να έχουν την σοβαρότερη επίπτωση στην ενεργότητα του ενζύμου καταβολισμού της φθοριοουρακίλης.

Στην εργασία παρουσιάζονται πρωτόκολλα απομόνωσης και ενίσχυσης περιοχών, που φέρουν αυτούς τους πολυμορφισμούς, καθώς και πρωτόκολλα γονοτύπησης για έλεγχο παρουσίας ή μη της παραλλαγής. Τα πρωτόκολλα δοκιμάστηκαν σε 30 δείγματα Ελλήνων ασθενών με ψυχιατρικά νοσήματα. Αυτές οι δοκιμές, μπορούν να εφαρμοστούν σε κάθε ασθενή, που πρόκειται να ακολουθήσει θεραπευτικό σχήμα με φθοριοουρακίλη και αν εμφανίζει κάποιον από τους δύο αυτούς πολυμορφισμούς, αυτό ακολούθως μπορεί να αξιοποιηθεί για την προσαρμογή της δόσης που θα λάβει, με στόχο την ελαχιστοποίηση της τοξικότητας.

Γίνεται επομένως κατανοητό, πως οι φαρμακογονιδιωματικές προσεγγίσεις, που βασίζονται την ανάλυση του γονότυπου, σχετικά με την μεταφορά και τον μεταβολισμό της φθοριοουρακίλης, καθίσταται πολύ σημαντικές σε κλινικές πρακτικές, όπου λαμβάνονται αποφάσεις, καθοριστικές για την πορεία της υγείας του ασθενούς.

ABSTRACT

Fluorouracil is an anticancer drug, belonging to the class of antimetabolites. It has been administered for over 60 years in the treatment of solid tumors and mainly, gastric, and colorectal cancer. Because of the serious side effects it exhibits, it is important to determine the most appropriate dosage for each individual. The heterogeneity shown in relation to the response to a medication between individuals can be explained by the existence of genetic variations in genes involved in the transport and metabolism of the drug.

In particular, various single nucleotide polymorphisms of the gene *DPYD* have been studied, as potential pharmacogenomic markers, in the field of anticancer treatment and patients' response to it. So far, the most important polymorphisms have been shown to be four. In the present work, we focus on two of them, rs3918290 (*DPYD**2A) and rs55886062 (*DPYD**13), as they seem to have the most serious effect on the activity of the fluorouracil catabolism enzyme.

Below, we display protocols for isolating and amplifying regions carrying these polymorphisms, as well as genotyping protocols, to evaluate the presence or absence of the variant. The protocols were tested on 30 samples of Greek patients with psychiatric diseases. These tests can be applied to any patient who is going to follow a treatment regimen with fluorouracil and can then be used to adjust the dose they will receive, with the aim of minimizing serious toxicities that each patient will experience.

It is therefore understandable, that pharmacogenomic approaches, based on the analysis of the genotype, regarding the transport and metabolism of fluorouracil, becomes very

important in clinical practices, where decisions are made, decisive for the course of the patient's health.

Περιεχόμενα

Κεφάλαιο 1: ΕΙΣΑΓΩΓΗ	9
1.1 ΚΑΡΚΙΝΟΣ	9
Ορθοκολικός καρκίνος	10
Γαστρικός καρκίνος	15
Αντικαρκινικά φάρμακα	17
1.2 ΦΘΟΡΙΟΟΥΡΑΚΙΑΗ (5-FLUOROURACIL, 5-FU)	18
Μηχανισμός δράσης της 5-FU	19
Προφάρμακα της 5-FU	22
Φαρμακοκινητική	23
Αντίσταση στην 5-FU	24
Ενδείξεις	25
Δοσολογία και τρόπος χορήγησης	26
Ανεπιθύμητες ενέργειες	27
1.3 ΓΟΝΙΔΙΟ <i>DPYD</i>	28
Μονονουκλεοτιδικοί Πολυμορφισμοί (SNPs)	29
Ο πολυμορφισμός <i>DPYD</i> *2A	32
Ο πολυμορφισμός <i>DPYD</i> *13	34
1.4 ΦΑΡΜΑΚΟΓΟΝΙΔΙΩΜΑΤΙΚΗ ΚΑΙ ΕΞΑΤΟΜΙΚΕΥΜΕΝΗ ΘΕΡΑΠΕΙΑ	35
Προσαρμογή δόσης σε φορείς των παραλλαγών του <i>DPYD</i>	36
Κεφάλαιο 2: ΣΚΟΠΟΣ	38
Κεφάλαιο 3: ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ	39
3.1 ΑΠΟΜΟΝΩΣΗ DNA	39
Πρωτόκολλο οργανικής απομόνωσης	39
3.2 ΠΟΣΟΤΙΚΟΣ ΚΑΙ ΠΟΙΟΤΙΚΟΣ ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟΣ ΑΠΟΜΟΝΩΜΕΝΟΥ DNA	42
Διαδικασία φωτομέτρησης	43
3.3 ΣΧΕΔΙΑΣΜΟΣ ΕΚΚΙΝΗΤΩΝ	43
3.4 ΑΛΥΣΙΔΩΤΗ ΑΝΤΙΔΡΑΣΗ ΠΟΛΥΜΕΡΑΣΗΣ (PCR)	45
Αρχή της μεθόδου	45
3.5 ΗΛΕΚΤΡΟΦΟΡΗΣΗ ΤΩΝ ΠΡΟΪΟΝΤΩΝ ΤΩΝ PCR	47
Πρωτόκολλο παρασκευής πηκτώματος αгарόζης με περιεκτικότητα 1,5% w/v	48
Πρωτόκολλο φόρτωσης των δειγμάτων στο πήκτωμα και ηλεκτροφόρηση	49
3.6 ΠΟΛΥΜΟΡΦΙΣΜΟΣ ΜΗΚΟΥΣ ΘΡΑΥΣΜΑΤΟΣ ΠΕΡΙΟΡΙΣΜΟΥ (PCR-RFLP)	50
Κεφάλαιο 4: ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ	52
4.1 ΕΝΙΣΧΥΣΗ ΝΟΥΚΛΕΟΤΙΔΙΚΩΝ ΤΜΗΜΑΤΩΝ ΤΟΥ <i>DPYD</i>	52
Πρωτόκολλο PCR	52

PCR rs3918290	55
PCR rs55886062	56
4.2 ΓΟΝΟΤΥΠΗΣΗ ΕΝΙΣΧΥΜΕΝΩΝ ΠΡΟΪΟΝΤΩΝ	57
Πρωτόκολλα κατάτμησης των rs3918290 και rs55886062	58
Πέψη με στόχο τον πολυμορφισμό rs3918290	59
Πέψη με στόχο τον πολυμορφισμό rs55886062	61
Κεφάλαιο 5: ΣΥΖΗΤΗΣΗ.....	62
ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ.....	68

Κεφάλαιο 1: ΕΙΣΑΓΩΓΗ

1.1 ΚΑΡΚΙΝΟΣ

Ως καρκίνος, ορίζεται η νόσος, κατά την οποία, σωματικά κύτταρα αρχίζουν να πολλαπλασιάζονται ανεξέλεγκτα, λόγω συσσώρευσης μεταλλαγών, δημιουργώντας όγκους. Στη συνέχεια, μερικά από αυτά τα κύτταρα μεταναστεύουν σε άλλα μέρη του σώματος, μέσω μιας διαδικασίας που ονομάζεται μετάσταση, όπου δημιουργούν εκ νέου όγκους. Τα καρκινικά κύτταρα μπορεί να βρίσκονται οπουδήποτε στο σώμα, το οποίο αποτελείται από τρισεκατομμύρια κύτταρα.¹

Φυσιολογικά και όταν αυτό είναι απαραίτητο, τα κύτταρα αναπτύσσονται και πολλαπλασιάζονται, μέσω μιας ελεγχόμενης διαδικασίας που ονομάζεται κυτταρική διαίρεση. Όταν τα κύτταρα γερνούν, οδηγούνται σε προγραμματισμένο κυτταρικό θάνατο ή κυτταρική απόπτωση και άλλα νέα κύτταρα παίρνουν την θέση τους. Υπό ορισμένες συνθήκες, η απόπτωση εμποδίζεται και τα κύτταρα αναπτύσσονται, πολλαπλασιάζονται ανεξέλεγκτα, διαφοροποιούνται μη φυσιολογικά και σχηματίζουν τους καρκινικούς όγκους.²

Στις βιομηχανικές χώρες, ο καρκίνος αποτελεί την δεύτερη σε σειρά συχνότερη αιτία θανάτου, ενώ κατέχει την τέταρτη θέση στις αναπτυσσόμενες χώρες. Στους άνδρες οι βασικές περιοχές ανάπτυξης καρκίνου είναι οι πνεύμονες και ο προστάτης, ενώ στις γυναίκες οι πνεύμονες και το στήθος. Ειδικότερα για την ορθοκολική περιοχή, η ανάπτυξη καρκίνου παρατηρείται στα δύο φύλα με παρόμοια συχνότητα.

Σύμφωνα με τον Παγκόσμιο Οργανισμό Υγείας (ΠΟΥ), στην πλειονότητα των χωρών το 2015 ο καρκίνος ήταν η πρώτη ή η δεύτερη συχνότερη αιτία θανάτου πριν από τα 70 έτη.³ Νέα περιστατικά καρκίνου και θάνατοι που σχετίζονται με τον καρκίνο

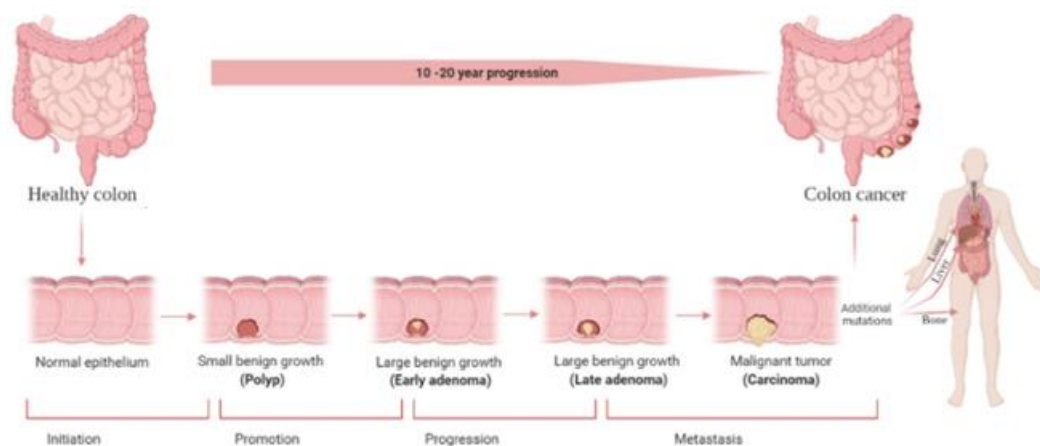
αναμένεται να φτάσουν τα 21,4 και τα 13,2 εκατομμύρια, αντίστοιχα, κάθε χρόνο, έως και το 2030.⁴ Σύμφωνα με την τελευταία αναφορά της GLOBOCAN, υπήρξαν παγκοσμίως περίπου 19.292 εκατομμύρια νέες περιπτώσεις καρκίνου και σχεδόν 9.958 εκατομμύρια θάνατοι από καρκίνο το 2020. Ο καρκίνος του στομάχου και του παχέος εντέρου φάνηκε να είναι από τους συχνότερα εμφανιζόμενους, με 1.089 και 1.931 περιπτώσεις αντίστοιχα. Άλλοι συχνά διαγνωσμένοι τύποι καρκίνου μεταξύ άλλων ήταν του μαστού γυναικών, του πνεύμονα και του προστάτη.⁵

Ορθοκολικός καρκίνος

Ο ορθοκολικός καρκίνος είναι ένας τύπος καρκίνου που επηρεάζει το κόλον και τον ορθό. Στην πλειοψηφία του, ξεκινά ως μικρές, μη καρκινικές (καλοήθειες) συστάδες κυττάρων που ονομάζονται αδενωματώδεις πολύποδες, οι οποίοι με την πάροδο του χρόνου εξελίσσονται τελικά κακοήθειες (καρκινικοί). Στην κλινική πρακτική και την έρευνα, ο καρκίνος του παχέος εντέρου (επηρεάζει το κόλον/Colon Cancer, CC) και ο καρκίνος του ορθού (το τελικό τμήμα του παχέος εντέρου /Rectal Cancer, RC) αναφέρονται ενιαία ως CRC (Colorectal Cancer).

Ο CC αφορά το 72% όλων των CRC, ενώ ο RC το υπόλοιπο 28%, αν και η συχνότητα εμφάνισης του CRC αναφέρεται και στους δύο καρκινικούς τύπους.⁶ Ο CRC ορίζεται ως ο μετασχηματισμός του επιθηλίου του παχέος εντέρου ή του ορθού σε μια προκαρκινική κατάσταση και, τελικώς, σε ένα διηθητικό αδenoκαρκίνωμα, το οποίο μπορεί να εξαπλωθεί σε διαφορετικά όργανα, ακόμη και απομακρυσμένα, και να προκαλέσει μεταστατικές βλάβες (Εικόνα 1). Το ήπαρ είναι το όργανο που προσβάλλεται πιο συχνά από μεταστατικό καρκίνο προερχόμενο από το παχύ έντερο και ακολουθούν οι καρκίνοι πνεύμονα και οστών. Η διαδικασία ανάπτυξης του καρκίνου προκαλείται από σταδιακή συσσώρευση γενετικών μεταλλαγών, είτε

σωματικών (επίκτητες μεταλλάξεις) είτε βλαστικής σειράς (κληρονομικές μεταλλάξεις), είτε και των δύο σε συνδυασμό, σε μια περίοδο από 10 έως 20 χρόνων συνήθως.⁷



Εικόνα 1 Τα 4 στάδια στην ανάπτυξη του CRC: έναρξη, προώθηση, εξέλιξη και μετάσταση. (Προσαρμογή από: ⁸)

Μεταξύ των συχνότερα εμφανιζόμενων συμπτωμάτων είναι η παρουσία αίματος στα κόπρανα, το οποίο αποτελεί μάλιστα ειδικό σύμπτωμα του CRC (32,8%). Έπειτα ακολουθούν οι αλλαγές στις συνήθειες του εντέρου (28,9%), η ναυτία (22,0%), το κοιλιακό άλγος (16,3%), η μειωμένη όρεξη και κατ' επέκταση η απώλεια βάρους, η κόπωση και ο πυρετός.⁹

Ο CRC ταξινομείται με διάφορα κριτήρια. Δηλαδή σύμφωνα με τον ιστολογικό τύπο που προσβάλλει, τη θέση στην οποία αναπτύσσεται στο έντερο και τα μοριακά μονοπάτια που εμπλέκονται.¹⁰ Υπάρχουν διάφοροι ιστολογικοί τύποι του CRC που έχουν αναφερθεί όπως ο βλεννώδης ή ο δίκην σφαγιστήρος δακτυλίου. Άλλοι σπανιότεροι τύποι αφορούν μυελώδη καρκινώματα, καρκινώματα εκ πλακώδων κυττάρων, αδеноπλακώδη και αδιαφοροποίητα καρκινώματα.¹¹ Η συντριπτική πλειοψηφία των CRC, δηλαδή το >90% παγκοσμίως, είναι τα αδеноκαρκινώματα. Τα τελευταία, είναι κακοήθεις όγκοι που προέρχονται από δομές ή επιθηλιακά κύτταρα του βλεννογόνου των ορθοκολικών αδένων.¹⁰

Το βλεννώδες αδενοκαρκίνωμα είναι ο δεύτερος πιο συχνός τύπος ορθοκολικού καρκίνου και χαρακτηρίζεται από την παρουσία βλεννογόνου εξωκυτταρικά. Αυτός ο τύπος CRC αντιπροσωπεύει το 5-20% των περιστατικών σε παγκόσμιο επίπεδο.¹² Ο CRC μπορεί επίσης να ταξινομηθεί σύμφωνα με την θέση που αναπτύσσεται κατά μήκος του παχέος εντέρου. Έτσι, χωρίζεται στο μέσο ή εγγύς κόλον και στο οπίσθιο ή περιφερικό κόλον. Ο καρκίνος του περιφερικού παχέος εντέρου παρουσιάζει συνήθως ευνοϊκότερη έκβαση σε σχέση με τον εγγύς.¹³

Η ταξινόμηση του CRC σύμφωνα με τα μοριακά μονοπάτια που εμπλέκονται κρίνεται όλο και πιο σημαντική. Ο CRC αναπτύσσεται λόγω μεταλλαγών σε ογκογονίδια, ογκοκατασταλτικά γονίδια, αλλά και γονίδια που εμπλέκονται με μηχανισμούς επιδιόρθωσης του γονιδιώματος. Η γενετική, αλλά και η επιγενετική αστάθεια (η δεύτερη αναφέρεται σε κληρονομικές τροποποιήσεις του φαινοτύπου, που δεν περιλαμβάνουν αλλαγές στην αλληλουχία του γονιδιώματος) διαδραματίζουν κομβικό ρόλο στην ανάπτυξη του όγκου. Οι μηχανισμοί που εμπλέκονται περιλαμβάνουν, κυρίως, τρεις μοριακές οδούς:

1) Χρωμοσωμική αστάθεια (Chromosomal instability-CIN). Θεωρείται η πιο κοινή μοριακή οδός και αφορά το 80-85% όλων των CRC. Σχετίζεται με μια ανισορροπία στον αριθμό των χρωμοσωμάτων των καρκινικών κυττάρων, η οποία τελικά οδηγεί σε απώλεια ετεροζυγωτίας. Μπορεί να αφορά βλάβες σε μηχανισμούς επιδιόρθωσης, τελομερών και διαχωρισμού χρωμοσωμάτων. Οι μεταλλαγές λαμβάνουν χώρα σε ογκοκατασταλτικά γονίδια και ογκογονίδια όπως τα *APC*, *KRAS*, *PIK3CA*, *TGF-β* και *TP53*.

2) Αστάθεια μικροδορυφόρων (Microsatellite instability-MSI). Είναι η δεύτερη πιο κοινή μοριακή οδός και αφορά μεταλλαγές σε γονίδια επιδιόρθωσης DNA όπως τα *PMS1*, *PMS2*, *MLH1*, *MSH2*, *MSH6*. Οι μικροδορυφόροι (MS) είναι περιοχές

σύντομων διαδοχικών επαναλαμβανόμενων βάσεων (1 ως 6 ζεύγη) σε κωδικές, αλλά και μη κωδικές περιοχές και αντιπροσωπεύουν περίπου το 3% του συνολικού ανθρώπινου γονιδιώματος. Όταν οι μηχανισμοί επιδιόρθωσης δεν λειτουργούν σωστά το μήκος τους μεταβάλλεται.

3) CIMP (cytosine preceding guanine (CpG) island methylator phenotype pathways). Οι νησίδες CpG είναι σύντομες αλληλουχίες στους υποκινητές των γονιδίων και φέρουν μεγαλύτερη περιεκτικότητα κυτοσίνης και γουανίνης (CG) και τελικά δινοουκλεοτιδίων CpG. Ένας όγκος CIMP χαρακτηρίζεται από υψηλή μεθυλίωση (επιγενετική αλλαγή) των υποκινητών των ογκογονιδίων στις νησίδες CpG με αποτέλεσμα τη σίγαση ογκοκατασταλτικών γονιδίων και επομένως απώλεια έκφρασης της πρωτεΐνης.¹⁴

Οι μεταλλάξεις επηρεάζουν κυρίως το μονοπάτι σηματοδότησης Wnt/β-κατενίνης, τους υποδοχείς κινάσης τυροσίνης και το μονοπάτι σηματοδότησης TGF-β. Άλλα γονίδια που σχετίζονται με τον CRC αφορούν σημεία ελέγχου κυτταρικού κύκλου και μονοπάτια απόπτωσης. Τέλος, έχει αναφερθεί ότι γονίδια σχετικά με το μονοπάτι σηματοδότησης Hedgehog μπορεί επίσης να επηρεαστούν στον CRC.⁶

Ο CRC χαρακτηρίζεται από ετερογένεια και υπάρχει ποικιλία παραγόντων κινδύνου που οδηγούν στην ανάπτυξή του. Τόσο γενετικοί όσο και περιβαλλοντικοί παράγοντες διαδραματίζουν κρίσιμο ρόλο στην αιτιολογία του CRC και αυξάνουν το ρίσκο εμφάνισης. Οι κληρονομικοί παράγοντες είναι μία κατηγορία παραγόντων κινδύνου που δεν μπορεί να ελεγχθεί. Αρκετά είναι τα κληρονομικά σύνδρομα αυξάνουν την πιθανότητα εμφάνισης CRC. Στα πιο κοινά περιλαμβάνονται η οικογενής πολυποδίαση (FAP) και το Σύνδρομο Lynch (LS) ή αλλιώς κληρονομικός μη πολυποδιασικός ορθοκολικός καρκίνος (HNPCC). Περίπου το 5% όλων των περιπτώσεων CRC οφείλεται σε αυτά τα δύο κληρονομικά σύνδρομα.

Το προσωπικό και οικογενειακό ιστορικό ασθενών με ορθοκολικό καρκίνο και η παρουσία αδενωματώδων πολυπόδων συνδέονται επίσης με υψηλό κίνδυνο ανάπτυξης CRC. Επιπλέον, αυξημένο κίνδυνο παρουσιάζουν άτομα με ιστορικό φλεγμονώδους νόσου του εντέρου όπως η ελκώδης κολίτιδα και η νόσος του Crohn.¹⁰

Υπάρχουν διαφορές στην έκβαση του CRC που μπορεί να εξαρτώνται από την εθνικότητα ή τη φυλή. Για παράδειγμα, στις ΗΠΑ, τόσο οι Αφροαμερικανοί όσο και οι ιθαγενείς Αμερικανοί παρουσιάζουν μεγαλύτερο κίνδυνο εμφάνισης CRC και παράλληλα χαμηλότερη πιθανότητα επιβίωσης σε σύγκριση με τους λευκούς Αμερικανούς και τους Ισπανόφωνους.^{8,15} Επιπλέον, ο κίνδυνος είναι ελαφρώς χαμηλότερος στις γυναίκες σε σύγκριση με τους άνδρες, οι οποίοι έχουν 1,5 φορές υψηλότερο κίνδυνο ανεξαρτήτως ηλικίας και έθνους. Η ηλικία αποτελεί επίσης έναν παράγοντα που δεν μπορεί να ελεγχθεί. Πάνω από το 90% των περιστατικών του ορθοκολικού καρκίνου εμφανίζονται σε άτομα ηλικίας άνω των 50 ετών και το ποσοστό επίπτωσης φαίνεται να είναι πάνω από 50 φορές υψηλότερο σε ασθενείς ηλικίας 60-79 ετών συγκριτικά με άτομα κάτω των 40 ετών.¹⁰ Οι συννοσηρότητες που αυξάνουν το ρίσκο περιλαμβάνουν σακχαρώδη διαβήτη, κυστική ίνωση, χολοκυστεκτομή, άτομα που νόσησαν από καρκίνο κατά την παιδική ηλικία και υποβλήθηκαν σε ακτινοβολία, ανοσοκατεσταλμένοι ασθενείς μετά από μεταμόσχευση νεφρού και άλλα.¹⁰

Οι περιβαλλοντικοί παράγοντες και ο τρόπος ζωής επηρεάζουν επίσης την ανάπτυξη ορθοκολικού καρκίνου. Η κακή ιατρική περίθαλψη που οφείλεται στη χαμηλή κοινωνικοοικονομική κατάσταση, οι διατροφικές επιλογές που περιλαμβάνουν υψηλή κατανάλωση κόκκινου και επεξεργασμένου κρέατος, οι δίαιτες χαμηλής περιεκτικότητας σε φυτικές ίνες, φρούτα και λαχανικά, η μειωμένη σωματική άσκηση,

η παχυσαρκία, το κάπνισμα και η μεγάλη κατανάλωση αλκοόλ έχουν φανεί ότι αυξάνουν το ρίσκο εμφάνισης CRC.¹⁶

Η έγκαιρη διάγνωση, η ασφάλεια και η αποτελεσματικότητα των διαθέσιμων θεραπευτικών επιλογών, είναι ένας πολύ βασικός παράγοντας για τη βελτίωση της έκβασης της υγείας των ασθενών.¹⁷ Αρκετές περιπτώσεις καρκίνου μπορεί να είναι ιάσιμες εάν εντοπιστούν σε πρώιμο στάδιο και πριν να αναπτυχθούν μεταστάσεις. Οι κλασικοί τρόποι θεραπείας των καρκίνων είναι η χειρουργική επέμβαση, η χημειοθεραπεία και η ακτινοβολία, ή συνδυασμός αυτών για νόσο προχωρημένου σταδίου. Η επιλογή της θεραπείας καθορίζεται από χαρακτηριστικά όπως η θέση και το μέγεθος του, η έκταση της μετάστασης εάν υπάρχει, αλλά και η κατάσταση της υγείας του ασθενούς.¹⁸

Γαστρικός καρκίνος

Ο γαστρικός καρκίνος ή καρκίνος του στομάχου αποτελεί τον πέμπτο πιο συχνά διαγνωσμένο καρκίνο στον κόσμο, με μόλις 1 εκατομμύριο νέους ασθενείς ετησίως. Σε όλες τις χώρες η πιθανότητα εμφάνισης καρκίνου του στομάχου είναι συχνότερη στους άνδρες απ' ό τι στις γυναίκες. Αυτό το γεγονός μπορεί να οφείλεται στην προστατευτική δράση των οιστρογόνων, τα οποία πιθανόν να μειώνουν τον κίνδυνο ανάπτυξης στις γυναίκες, όπως επίσης η καθυστερημένη εμμηνόπαυση και η αυξημένη γονιμότητα. Αυξημένη πιθανότητα μπορεί να παρατηρηθεί λόγω χορήγησης φαρμάκων με αντι-οιστρογονικές και οιστρογονικές φαρμακολογικές επιδράσεις, όπως για παράδειγμα η ταμοξιφαίνη. Μετά την εμμηνόπαυση, ο καρκίνος του στομάχου παρουσιάζει παρόμοια συχνότητα στις γυναίκες με αυτή των ανδρών, αλλά με περίοδο καθυστέρησης 10 έως 15 ετών³.

Υπολογίζεται ότι έως και το 10% των ατόμων με γαστρικό καρκίνο εντοπίζεται στην οικογένεια τους τουλάχιστον ένα επιπλέον περιστατικό. Σε αντίθεση, μόνο το 1-3% (περίπου 33.000 ετησίως) είναι κληρονομικοί. Το γαστρικό καρκίνωμα διακρίνεται σε δύο κατηγορίες ανάλογα με τον ιστό και την παθολογία: μικτό ή απροσδιόριστο και αδενοκαρκίνωμα, το οποίο αντιπροσωπεύει περίπου το 85% του συνόλου του καρκίνου του στομάχου. Το αδενοκαρκίνωμα με τη σειρά του μπορεί να ταξινομηθεί σε εντερικό (καλά διαφοροποιημένο) και διάχυτο (κακώς διαφοροποιημένο).¹⁹

Μεταξύ των καρκινικών συνδρόμων, περιγράφονται τρία κληρονομικά σύνδρομα γαστρικού καρκίνου: Κληρονομικός Διάχυτος Γαστρικός Καρκίνος (Hereditary Diffuse Gastric Cancer-HDGC), Οικογενής Γαστρικός Καρκίνος του Εντέρου (Familial Intestinal Gastric Cancer-FIGC), γαστρικό αδενοκαρκίνωμα και εγγύς πολύποδας του στομάχου (Gastric adenocarcinoma and proximal polyposis of the stomach-GAPPS). Επιπλέον, άλλα σύνδρομα που μπορεί να εμφανίζουν και γαστρικό καρκίνο, είναι τα Li Fraumeni, Οικογενής Αδενωματώδης Πολύποδας, Σύνδρομο Lynch ή Peutz-Jeghers.

Η συχνότητα εμφάνισής του διαφέρει γεωγραφικά, με τα μεγαλύτερα ποσοστά να εμφανίζονται στην Κεντρική και Ανατολική Ασία και την Λατινική Αμερική. Όσον αφορά τη θνητότητα, αποτελεί τον τρίτο πιο συχνό θανατηφόρο καρκίνο σε άνδρες. Ο περιορισμός και η σωστή αντιμετώπιση των μολύνσεων από το βακτήριο *Helicobacter pylori* (*H.pylori*) έχει οδηγήσει στη μείωση των περιστατικών τα τελευταία 50 έτη κυρίως λόγω αλλαγών που έχουν προκύψει στη συντήρηση των τροφίμων καθώς επίσης και την αύξηση της κατανάλωσης φρέσκων φρούτων και λαχανικών.²⁰

Οι κύριοι γενετικοί παράγοντες κινδύνου φαίνεται να σχετίζονται με μεταλλάξεις στα γονίδια *CDH1* και *GSTM-1*.²¹ Ο κληρονομικός διάχυτος γαστρικός καρκίνος (HDGC) είναι μια σπάνια κακοήθεια που κληρονομείται με αυτοσωμικό επικρατή τρόπο και

αφορά παθολογικές μεταλλαγές στα γονίδια *CDH1* και *CTNNA1* που κωδικοποιούν τα μόρια προσκόλλησης E-καδερίνη και α-κατενίνη, αντίστοιχα. Το σύνδρομο HDGC, αν και σπάνιο, είναι εξαιρετικά διεισδυτικό και μπορεί να παρουσιαστεί ως ανίατη ασθένεια. Έχουν γίνει αρκετές αναφορές, που συσχετίζουν τις μεταλλαγές του συνδρόμου HDGC, με αυξημένο κίνδυνο ανάπτυξης καρκίνου του παχέος εντέρου. Στους περιβαλλοντικούς παράγοντες συγκαταλέγονται η λοίμωξη από το ελικοβακτήριο του πυλωρού (*H. Pylori*) αποτελώντας τον κύριο παράγοντα κινδύνου με μελέτες να υποδεικνύουν έως και το 80% των περιστατικών να οφείλονται στο συγκεκριμένο, όπως επίσης το χαμηλό κοινωνικοοικονομικό προφίλ, το κάπνισμα, η εκτεταμένη κατανάλωση αλκοόλ και οι διατροφικές συνήθειες.²²

Τα συμπτώματα μπορεί να περιλαμβάνουν, μεταξύ άλλων, ανεξήγητη απώλεια βάρους και όρεξης, ναυτία και έμετο, που μπορεί να περιέχει αίμα, κοιλιακό πόνο και αίμα στα κόπρανα. Η διάγνωση του γαστρικού καρκίνου πραγματοποιείται συνήθως μέσω ενός συνδυασμού εξετάσεων, όπως η βιοψία, η ενδοσκόπηση και απεικονιστικές μέθοδοι όπως η αξονική τομογραφία ή η ακτινογραφία. Οι θεραπευτικές προσεγγίσεις περιλαμβάνουν χειρουργική επέμβαση και αφαίρεση του όγκου, χημειοθεραπεία και ακτινοθεραπεία. Η επιλογή θα καθοριστεί από το στάδιο του καρκίνου αλλά και την κατάσταση της υγείας του ασθενούς. Η πρόληψη είναι πολύ σημαντική για αυτό ο τακτικός έλεγχος για έγκαιρη ανίχνευση και η επιλογή ενός υγιούς τρόπου ζωής είναι επιτακτική ανάγκη.²³

Αντικαρκινικά φάρμακα

Ο αριθμός των αντικαρκινικών ή αντινεοπλασματικών ή κυτταροστατικών φαρμάκων που χρησιμοποιούνται τα τελευταία χρόνια έχει αυξηθεί σημαντικά. Οι τρόποι χορήγησης αυτών των φαρμάκων ποικίλλουν. Κάποια χορηγούνται ενδοφλέβια ή

ενδομυϊκά, άλλα από το στόμα και πιο σπάνια ενδοαρτηριακά ή ενδοραχιαία. Μερικές φορές, σε περιπτώσεις δερματικών παθήσεων, χορηγούνται και τοπικά.

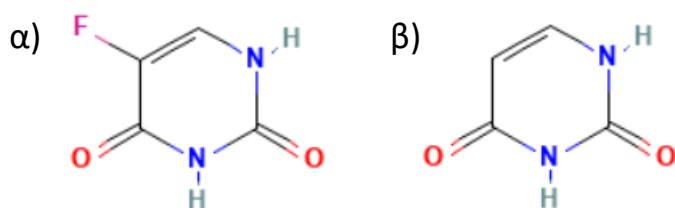
Τα αντικαρκινικά φάρμακα, ως προς τον μηχανισμό δράσης, συνήθως στοχεύουν είτε σε επαγωγή της κυτταρικής απόπτωσης, είτε στην παρεμπόδιση της κυτταρικής διαίρεσης. Συνήθως, δρουν σε όλα τα κύτταρα του οργανισμού και όχι μόνο στα κύτταρα του όγκου, με αποτέλεσμα την εμφάνιση τοξικότητας. Λόγω λοιπόν της ευρείας δράσης τους, οι ανεπιθύμητες ενέργειες είναι πολλές και αφορούν σχεδόν όλα τα όργανα του σώματος. Αιμορραγία και λοιμώξεις προκαλούνται συχνά από τη δράση αυτών των φαρμάκων και αποτελούν αιτίες νοσηρότητας και μερικές φορές ακόμη και θανάτου.

Πλέον, τα αντικαρκινικά φάρμακα χορηγούνται κυρίως συνδυαστικά, έτσι ώστε να παραταθεί η ανάπτυξη αντοχής από τα καρκινικά κύτταρα και να επιτευχθεί αθροιστική δράση, χωρίς να αυξηθεί υπέρμετρα η τοξικότητα. Οι αντιμεταβολίτες είναι μία κατηγορία αντικαρκινικών φαρμάκων που θα μας απασχολήσουν στην παρούσα εργασία. Στην κατηγορία αυτή περιέχονται ανάλογα του φυλλικού οξέος ή των πουρινών ή των πυριμιδινών. Συγκεκριμένα θα ασχοληθούμε με την φθοριοουρακίλη, η οποία είναι ένα χημικό ανάλογο μιας πυριμιδίνης, της ουρακίλης.²³

1.2 ΦΘΟΡΙΟΟΥΡΑΚΙΛΗ (5-FLUOROURACIL, 5-FU)

Οι αντιμεταβολίτες είναι μία κατηγορία αντικαρκινικών φαρμάκων, που είτε αναστέλλουν βασικά βιοσυνθετικά μονοπάτια, είτε ενσωματώνονται σε μακρομόρια, όπως το DNA και το RNA και εμποδίζουν τη φυσιολογική λειτουργία τους. Οι αντιμεταβολίτες μοιάζουν δομικά με τους φυσικούς μεταβολίτες που απαιτούνται για την φυσιολογική λειτουργία των κυττάρων. Η 5-φθοριοουρακίλη ή 5-FU είναι μία

φθοριοπυριμιδίνη που δρα ως αντιμεταβολίτης και με τους δύο παραπάνω μηχανισμούς (Εικόνα 2).²⁴



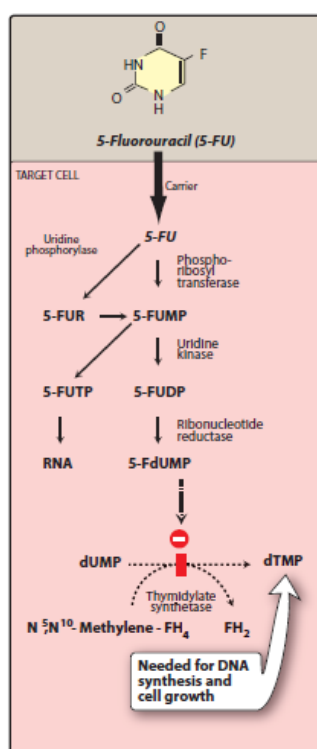
Εικόνα 2 Απεικόνιση χημικής δομής της α) 5-FU και της β) ουρακίλης, (Πηγή: pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound)

Οι φθοριοπυριμιδίνες είναι μία οικογένεια χημικών ουσιών. Αναπτύχθηκαν τη δεκαετία του 1950 μετά από παρατήρηση ηπατοκυτταρικών καρκινωμάτων (Hepatocellular Carcinoma-HCC) αρουραίων, που φάνηκε να χρησιμοποιούν την ουρακίλη -μία από τις τέσσερις βάσεις του RNA- πιο γρήγορα συγκριτικά με τους φυσιολογικούς ιστούς, υποδεικνύοντας ότι ο μεταβολισμός της ουρακίλης ήταν πιθανός στόχος για χημειοθεραπεία με αντιμεταβολίτη. Η 5-FU χρησιμοποιήθηκε ως θεραπεία για πρώτη φορά το 1962 και πλέον βρίσκεται στον κατάλογο βασικών φαρμάκων του Παγκόσμιου Οργανισμού Υγείας. Άλλες φθοριοπυριμιδίνες είναι η καπεσιταβίνη και η τεγκαφούρη.²

Μηχανισμός δράσης της 5-FU

Ο μηχανισμός της κυτταροτοξικότητας της 5-FU έχει αποδοθεί στην εσφαλμένη ενσωμάτωση των φθοριονουκλεοτιδίων στο RNA και το DNA, αλλά και στην αναστολή του νουκλεοτιδικού ενζύμου συνθάσης του θυμιδικού (Thymidylate synthase-TS)(Εικόνα 4).

Τα καρκινικά κύτταρα, ως γνωστόν, αναπτύσσονται ταχέως και ανεξέλεγκτα, άρα απαιτείται η σύνθεση μεγάλων ποσοτήτων DNA, άρα και θυμιδικού (πρόδρομη ένωση της θυμίνης). Η 5-FU μετατρέπεται στην δραστική της μορφή, *in vivo*, σε 5-φθοριοδεοξουριδυλικό (F-dUMP). Έπειτα, η F-dUMP προσδένεται στο ένζυμο TS και αναστέλλει τη δράση του. Φυσιολογικά, ο ρόλος του TS αφορά στην σύνθεση της θυμίνης, ανάλογο της ουρακίλης στο DNA. Στο τελικό βήμα της βιοσύνθεσής της, το δεοξουριδυλικό οξύ (ή μονοφωσφορική δεοξουριδίνη/dUMP) μεθυλιώνεται από το TS προς θυμιδικό οξύ (ή μονοφωσφορική δεοξυθυμιδίνη dTMP) (Εικόνα 3).



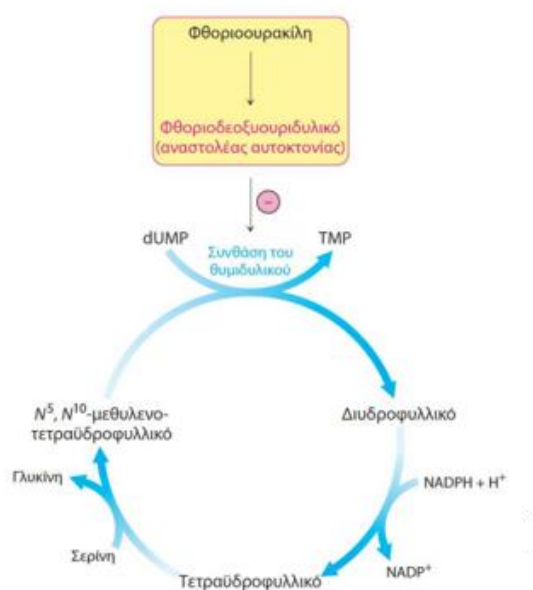
Εικόνα 3 Μηχανισμός κυτταροτοξικής δράσης της 5-FU. Η 5-FU μετατρέπεται σε 5- μονοφωσφορική φθοριοδεοξουριδίνη (5-FdUMP), και ανταγωνίζεται την θέση πρόσδεσης της μονοφωσφορική δεοξουριδίνης (dUMP) στο ένζυμο σύνθεση του θυμιδικού. (5-FUR=5-φθοριοουριδίνη, 5-FUTP=τριφωσφορική 5-φθοριοουριδίνη, 5-FUMP= μονοφωσφορική 5-φθοριοουριδίνη, 5-FUDP= διφωσφορική 5-φθοριοουριδίνη, dTMP= μονοφωσφορική δεοξυθυμιδίνη) ²⁵

Όπως φαίνεται και στην Εικόνα 3, η 5-FU φέρει στον 5'άνθρακα (C-5) του ουρακιλικού δακτυλίου ένα μόριο φθορίου, αντί για ένα μόριο υδρογόνου. Η παρουσία

φθορίου αργότερα στο F-dUMP παρεμποδίζει την μετατροπή του προς θυμιδυλικό και επομένως ματαιώνεται η σύνθεση του DNA, εφόσον από το κύτταρο απουσιάζει η θυμίνη.⁴

Επιπλέον, η 5-FU πέρα από την άμεση ανασταλτική της δράση μπορεί να σχηματίσει ομοιοπολικούς δεσμούς με τις βάσεις του DNA, όταν τα αποθέματα θυμίνης στο κύτταρο μειωθούν σημαντικά. Με τη μεσολάβηση της DNA πολυμεράσης, η dUTP και η 5-F-dUTP μπορούν επίσης να ενσωματωθούν στο γονιδίωμα και έτσι προκύπτουν ζεύγη βάσεων όπως U/A, 5-FU/A ή ακόμα και 5-FU/G. Οι βλάβες στο DNA που αφορούν μόρια ουρακίλης αναγνωρίζονται και αφαιρούνται από επιδιορθωτικά ένζυμα (όπως hUNG2, hSMUG2 και hTDG) που οδηγούν σε σφάλματα στο DNA και επίσπευση του κυτταρικού θανάτου.²⁶

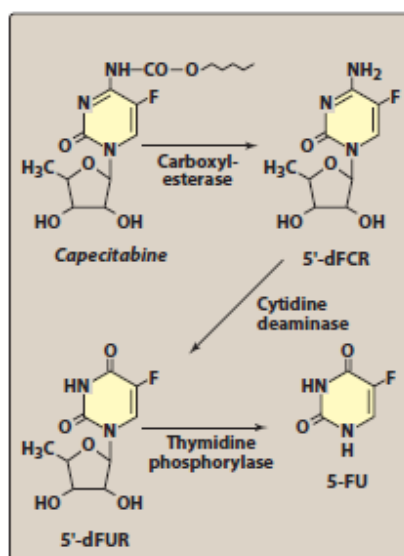
Τέλος, η μακροχρόνια λήψη μεγάλων δόσεων της 5-FU έχει ως αποτέλεσμα την ενσωμάτωση της, αντί της ουρακίλης, στο RNA. Αυτό καθιστά τα RNA μη λειτουργικά και τελικά οδηγεί στην παρεμπόδιση της πρωτεϊνοσύνθεσης.⁴



Εικόνα 4 Καταλυτικός κύκλος συνθάσης του θυμιδυλικού. (Πηγή:⁴)

Προφάρμακα της 5-FU

Η καπεσιταβίνη είναι ένα προφάρμακο, το οποίο χρησιμοποιείται κυρίως στη θεραπεία του καρκίνου του παχέος εντέρου και του μεταστατικού καρκίνου του μαστού. Εισέρχεται στα καρκινικά κύτταρα και μετατρέπεται μέσω μιας σειράς ενζυμικών αντιδράσεων, η τελευταία από τις οποίες είναι η υδρόλυση, προς 5-FU. Αναλυτικότερα, το στάδιο της υδρόλυσης, καταλύεται από ένα ένζυμο, που ονομάζεται φωσφορυλάση της θυμιδίνης. Έτσι, η κυτταροτοξική δράση της καπεσιταβίνης είναι ίδια με εκείνη της 5-FU και ομοίως, καταλήγει να μετατρέπεται σε φθορο-β-αλανίνη και αυτή. Η καπεσιταβίνη πριν μετατραπεί σε 5-FU είναι μη τοξική. Για αυτό το λόγο, μπορεί να χορηγηθεί σε μορφή δισκίων, σε αντίθεση με την 5-FU που συνήθως χορηγείται σε ενέσιμη μορφή. Η τεγκαφούρη αποτελεί, επίσης, ένα άλλο προφάρμακο της 5-FU, το οποίο μετατρέπεται από το προϊόν του γονιδίου *CYP2A6* σε ένα ασταθές ενδιάμεσο, την 5-υδροξυ-τεγκαφούρη, η οποία διασπάται αυθόρμητα προς 5-FU. Τα δύο αυτά προφάρμακα παρουσιάζουν 70%-80% βιοδιαθεσιμότητα μετά από του στόματος χορήγηση (Εικόνα 5).^{25,27}

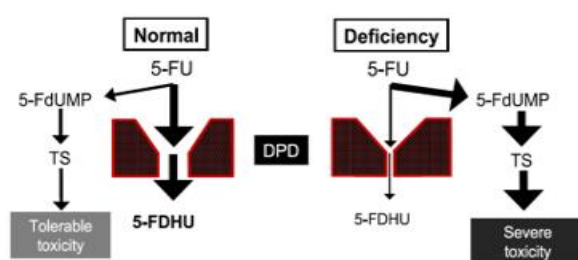


Εικόνα 5 Μεταβολικό μονοπάτι της καπεσιταβίνης (5-dFCR = 5-δεοξύ-5-φθοριοκυτιδίνη, 5-dFUR = 5-δεοξύ-5-φθοριοουριδίνη). (Πηγή:²⁵)

Φαρμακοκινητική

Λόγω της σοβαρής τοξικότητάς του στο γαστρεντερικό σωλήνα, η 5-FU χορηγείται στο στάδιο IV της νόσου, ή σε περίπτωση καρκίνου του δέρματος, τοπικά. Το φάρμακο διεισδύει καλά σε όλους τους ιστούς, συμπεριλαμβανομένου του Κεντρικού Νευρικού Συστήματος (ΚΝΣ). Η αύξηση της χορηγούμενης δόσης της 5-FU προκαλεί αντίστοιχη αύξηση της κυτταροτοξικής της δράσης, συνεπώς και του αριθμού των κυττάρων, που οδηγούνται στο θάνατο, κάτι που δεν συμβαίνει γενικά στην κατηγορία των αντιμεταβολιτών.³

Η 5-FU μεταβολίζεται ταχέως στο ήπαρ, τους πνεύμονες και τους νεφρούς. Έως και το 90% της χορηγούμενης δόσης 5-FU μετατρέπεται φυσιολογικά στο ήπαρ προς το ανενεργό προϊόν της, την φθοριοδιυδροουρακίλη (FDHU), λόγω της ενζυμικής μετατροπής από την αφυδρογονάση της διυδροπυριμιδίνης (DPD) (Εικόνα 6) και απομακρύνεται από τον οργανισμό, τελικά, μέσω των ούρων ως φθορο-β-αλανίνη.^{27,28} Η δόση της 5-FU σε περίπτωση μειωμένης ηπατικής λειτουργίας πρέπει να προσαρμόζεται.²⁵



Εικόνα 6 Μεταβολική πορεία παρουσία και απουσία του καταβολικού ενζύμου (DPD) της 5-FU. (Πηγή: https://www.goldenhelix.org/images/presentations/3rd_UPGx_Personalized_Medicine_Toulouse/Erika_Cecchin_GoldenHelixDayToulouse.pdf)

Προκειμένου να επιβραδυνθεί η αποικοδόμηση της 5-FU και να ενισχυθεί ο ρυθμός απόκρισης του οργανισμού στο φάρμακο, μπορεί να χορηγηθεί παράλληλα ουρακίλη.²⁹ Υψηλά επίπεδα του ενζύμου DPD, μπορεί να αυξήσουν τον ρυθμό καταβολισμού της 5-FU και επομένως να μειώσουν τη βιοδιαθεσιμότητα του φαρμάκου. Ανεπάρκεια ενζύμων στο μονοπάτι καταβολισμού της 5-FU πιθανότατα να προκαλέσουν σοβαρή ή ακόμη και θανατηφόρα τοξικότητα. Τα επίπεδα του DPD διαφέρουν από άτομο σε άτομο, μπορεί έως και έξι φορές στο γενικό πληθυσμό. Για αυτό, η δραστηριότητα του DPD ενός ατόμου χρειάζεται να εξετάζεται και η δοσολογία να προσαρμόζεται αναλόγως.²⁵ Πολλές παραλλαγές του γονιδίου *DPYD* έχουν συσχετιστεί με εμφάνιση τοξικότητας. Από την αξιολόγηση ασθενών, σε μία αναδρομική μετανάλυση, οι οποίοι παρουσίασαν υψηλή τοξικότητα κατά τη διάρκεια της αγωγής με 5-FU, παρατηρήθηκε μειωμένη ενεργότητα του προϊόντος του *DPYD* στο 39%-61%.²⁷ Επιπλέον, κάποιες παραλλαγές στα γονίδια *DPYS* (χρωμόσωμα 8q22) και *UPBI* (χρωμόσωμα 22q11), που κωδικοποιούν τα προϊόντα DHP και βUP αντίστοιχα και εμπλέκονται στον καταβολισμό των φθοριοπυριμιδινών, έχει φανεί να συσχετίζονται με αυξημένη τοξικότητα.^{30 31}

Αντίσταση στην 5-FU

Τα κύτταρα παρουσιάζουν αντίσταση στο φάρμακο εάν χάσουν ικανότητα μετατροπής της 5-FU στην δραστική της μορφή 5-FdUMP ή όταν έχει τροποποιηθεί η λειτουργία ή έχουν αυξηθεί τα επίπεδα της συνθάσης του θυμιδικού.²⁵ Η αντίσταση μπορεί επίσης να οφείλεται σε αλλαγές που σχετίζονται με μεταφορείς της 5-FU, συμπεριλαμβανομένου και των *ABCG2*, *ABCC3*, *ABCC4* και *ABCC5*.³² Σε ένα *in vitro* σύστημα, η έκφραση του *SLC22A7* συσχετίστηκε με την μεταφορά της 5-FU.³³

Επιπλέον, η έκφραση του *SLC29A1* εμπλέκεται στην αντίσταση/ευαισθησία στην 5-FU.³⁴

Ενδείξεις

Η αγωγή με 5-FU ενδείκνυται σε ενήλικα άτομα, με σκοπό την θεραπεία διάφορων τύπων καρκίνου. Η 5-FU χρησιμοποιείται κυρίως για θεραπεία συμπαγών όγκων που αναπτύσσονται αργά, για παράδειγμα, παχέος εντέρου, καρκινώματα του μαστού, των ωοθηκών, του παγκρέατος και του στομάχου.^{25,29}

Στον καρκίνο του στομάχου συνιστάται περιεγχειρητική αγωγή με 5-FU, συνήθως 6 κύκλων, αλλά αυτό καθορίζεται κυρίως από την αποτελεσματικότητα της θεραπείας αλλά και την ανεκτικότητα του οργανισμού. Η 5-FU, επίσης, χρησιμοποιείται και για την θεραπεία του καρκίνου του παχέος εντέρου. Συχνά, συνδυάζεται με άλλα αντικαρκινικά φάρμακα, όπως την οξαλιπλατίνη (FOLFOX). Ο αριθμός των κύκλων της θεραπείας καθορίζεται και πάλι από την κλινική εικόνα κάθε ασθενούς. Η 5-FU σε συνδυασμό με άλλους χημειοθεραπευτικούς παράγοντες, βελτιώνει τα ποσοστά απόκρισης και την επιβίωση σε καρκίνους του μαστού, του εγκεφάλου και του τραχήλου. Στον καρκίνο του παχέος εντέρου η 5-FU είχε τη μεγαλύτερη επίδραση.²

Επιπλέον, η φθόριοκυτοσίνη (5-FC) είναι ένας συνθετικός αντιμεταβολίτης πυριμιδίνης που χρησιμοποιείται συχνά σε συνδυασμό με την αμφοτερικίνη Β. Η αμφοτερικίνη Β αυξάνει τη διαπερατότητα των κυττάρων, επιτρέποντας περισσότερα μόρια 5-FC να διεισδύουν στο κύτταρο. Αυτός ο συνδυασμός φαρμάκων χορηγείται για τη θεραπεία μυκητιάσεων και μηνιγγίτιδας που προκαλείται από τους *C.neoformans* και *C.albicans*. Η 5-FC εισέρχεται στο κύτταρο του μύκητα μέσω μιας ειδικής περμεάσης κυτοσίνης, ενός ενζύμου που δεν υπάρχει στα κύτταρα των θηλαστικών. Η 5-FC μετατρέπεται στη συνέχεια σε μια σειρά ενώσεων,

συμπεριλαμβανομένης της 5-FU, οι οποίες διαταράσσουν τη σύνθεση νουκλεϊκών οξέων και πρωτεϊνών.²⁵

Δοσολογία και τρόπος χορήγησης

Η χημειοθεραπεία γίνεται συνήθως είτε σε εξωτερικό ιατρείο, είτε με νοσηλεία μίας ημέρας σε νοσοκομείο. Πιο σπάνια, σε περιπτώσεις πολυήμερων θεραπευτικών σχημάτων απαιτείται εισαγωγή. Η χορήγηση της φθοριοουρακίλης γίνεται με έγχυση σε φλέβα ή σε αρτηρία. Μερικές φορές απαιτείται διακοπή ή αναβολή της αγωγής λόγω εμφάνισης σοβαρών ανεπιθύμητων ενεργειών. Σε κάθε περίπτωση, επιβάλλεται η αποφυγή έκθεσης των ατόμων σε υπεριώδη ακτινοβολία, καθώς υπάρχει σοβαρός κίνδυνος επιδείνωσης και αύξησης των παρενεργειών.

Στο ενδεχόμενο που η χορήγηση γίνει ενδοφλεβίως, θα πρέπει να αποφεύγεται η διαφυγή εκτός φλέβας (εξαγγείωση). Σύμφωνα με τον οργανισμό Ευρωπαϊκής Δημόσιας Έκθεσης Αξιολόγησης (EPAR) υπάρχουν δύο πιθανά σχήματα για την ενδοφλέβια χορήγηση. Στο πρώτο, η δοσολογία που λαμβάνει ο ασθενής είναι 12,5mg ανά κιλό σωματικού βάρους, κάθε 24 ώρες και για διάρκεια 3-5 ημερών, αναλόγως με το πότε θα αρχίσουν να παρουσιάζονται σημάδια τοξικότητας. Η μέγιστη ημερήσια ποσότητα που επιτρέπεται να λάβει ένας ασθενής είναι 800mg. Μετά το πέρας 4 εβδομάδων, ο ασθενής επαναλαμβάνει την θεραπεία. Το δεύτερο σχήμα προτείνει χορήγηση άπαξ εβδομαδιαίως 15 mg ανά κιλό σωματικού βάρους συνήθως για 6 εβδομάδες (εξαρτάται από την ανοχή του οργανισμού). Ακολουθεί δόση συντήρησης μία φορά την εβδομάδα 10-15 mg ανά κιλό σωματικού βάρους. Η ποσότητα που λαμβάνει ο ασθενής εβδομαδιαίως δεν πρέπει να ξεπερνάει το 1g.

Σε περίπτωση που η χορήγηση γίνεται ενδοαρτηριακά, η δόση κυμαίνεται από 5 έως 7,5 mg ανά κιλό σωματικού βάρους την ημέρα. Η έγχυση γίνεται στάγδην συνεχώς για ένα 24ωρο, όμως χρειάζεται να λαμβάνεται υπόψη ότι το διάλυμα έχει διάρκεια ζωής 8 ωρών. Όταν η 5-FU χορηγείται συνδυαστικά με άλλα φάρμακα, η δόση μειώνεται, ενώ δόση του φαρμάκου μειώνεται κατά 50% έπειτα από επινεφριδεκτομή ή έπειτα από νεφρική ή ηπατική ή μυελική ανεπάρκεια.

Ανεπιθύμητες ενέργειες

Η αντίδραση κάθε οργανισμού που υπόκειται σε αντικαρκινική αγωγή διαφέρει. Κάποιοι άνθρωποι παρουσιάζουν αρκετές ανεπιθύμητες ενέργειες, ενώ άλλοι ελάχιστες. Ωστόσο δεν υπάρχει η δυνατότητα πρόβλεψής τους σε κάθε άτομο ξεχωριστά. Οι συνήθεις ανεπιθύμητες ενέργειες που συνοδεύουν την αγωγή με φθόριοουρακίλη είναι η ανορεξία, η ναυτία και οι έμετοι, που συνήθως παρουσιάζονται τις πρώτες ημέρες της θεραπείας. Σε άλλες περιπτώσεις εμφανίζονται στοματίτιδα, οισοφαγίτιδα, αιμορραγία, διάρροια ή γαστρεντερικές εξελκώσεις, οι οποίες αποτελούν ενδείξεις για διακοπή της αγωγής. Επίσης παρατηρείται μυελοτοξικότητα, η οποία μπορεί να εκδηλωθεί ως αναιμία (χαμηλές τιμές αιματοκρίτη και άρα αίσθημα κόπωσης και αδυναμίας), λευκοπενία ή ουδετεροπενία (χαμηλές τιμές λευκών αιμοσφαιρίων και άρα ευαισθησία σε λοιμώξεις) και θρομβοπενία (χαμηλές τιμές αιμοπεταλίων και άρα προδιάθεση αιμορραγίας). Η εμφάνιση αλωπεκίας δεν επηρεάζει σε επίπεδο οργανισμού, αλλά αφορά περισσότερο τη ψυχολογία του ασθενούς. Άλλες ανεπιθύμητες ενέργειες είναι η δερματίτιδα, η μελάγχρωση και η φωτοευαισθησία. Πιο σπάνια, προκαλείται οξύ παρεγκεφαλιδικό σύνδρομο και ηπατίτιδα. Αν η 5-FU έρθει σε επαφή με τους βλεννογόνους, μπορεί να προκαλέσει τοπικό ερεθισμό. Τέλος, όσον

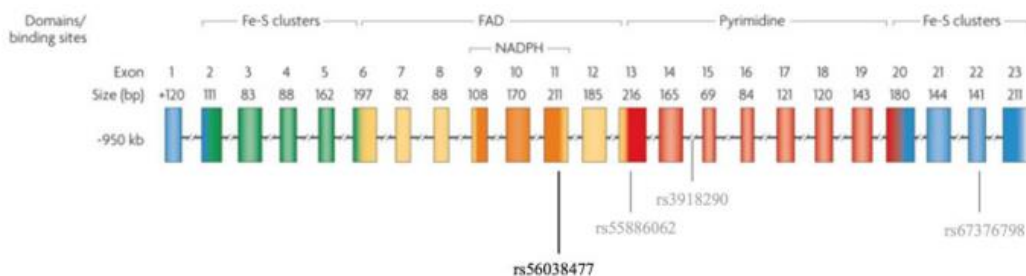
αφορά το καρδιαγγειακό σύστημα η φθοριοουρακίλη σπάνια οδηγεί σε καρδιακές αρρυθμίες, προκάρδια άλγη και συγκοπτικές κρίσεις.^{28,35,36}

Οι ανεπιθύμητες ενέργειες μερικές φορές είναι ήπιες, άλλες φορές όμως χρήζουν αντιμετώπισης, με νοσηλεία. Σοβαρές τοξικές επιδράσεις πιθανότατα να απαιτούν αναβολή της χημειοθεραπείας. Υπάρχει μία πληθώρα ισχυρών φαρμάκων που χορηγούνται, παραδείγματος χάρη τα αντιεμετικά και η κορτιζόνη. Τα φάρμακα μπορεί να δίνονται ακόμη και προληπτικά για αποφυγή εκδήλωσης σοβαρών παρενεργειών.⁵ Οι φθοριοπυριμιδίνες έχει φανεί ότι προκαλούν σοβαρή τοξικότητα στο 10% έως 40% των ασθενών που υπόκεινται σε θεραπεία ακόμη και θάνατο στο 0,2% έως 0,8% εξ' αυτών.³⁵

1.3 ΓΟΝΙΔΙΟ *DPYD*

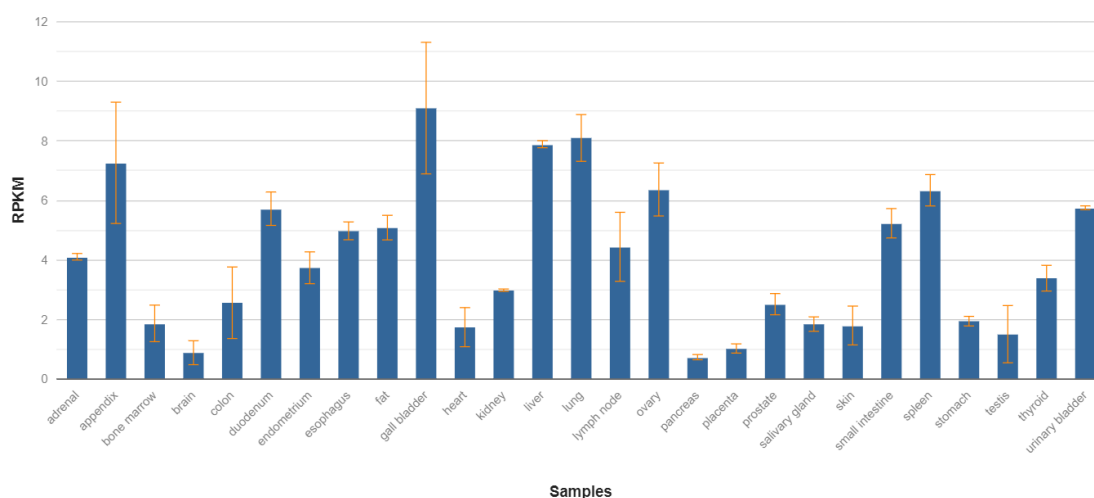
Το γονίδιο *DPYD* βρίσκεται στο κεντρομερές του χρωμοσώματος 1p22 και έχει μήκος περίπου 950 kb. Στο γονίδιο εντοπίζονται 23 εξώνια, μήκους από 69 έως 1404 νουκλεοτίδια το καθένα και συνολικά 4.399 νουκλεοτίδια, τα οποία κωδικοποιούν μία πρωτεΐνη, που ονομάζεται αφυδρογονάση της διυδροπυριμιδίνης. Πρόκειται για ένα περιοριστικό ένζυμο, το DPD, που εμπλέκεται στη ρύθμιση της κυτταρικής ανάπτυξης και διαίρεσης. Συμμετέχει στην καταβολική οδό των πυριμιδινών αλλά και στην βιοσύνθεση των αμινοξέων, μέσω του μονοπατιού της β-αλανίνης.

Σύμφωνα με την βάση δεδομένων OMIM, το ένζυμο αποτελείται από 1.205 αμινοξέα και έχει μοριακό βάρος 111kD. Η αλληλουχία του γονιδίου υποδηλώνει ότι το DPD φέρει τις εξής διακριτές δομές: μία πιθανή θέση πρόσδεσης NADPH και μία θέση πρόσδεσης FAD στο αμινοτελικό άκρο, 2 μοτίβα δέσμευσης σιδήρου/θείου και ένα κεντρικό πεπτίδιο όπου δεσμεύεται η ουρακίλη (Εικόνα 5).³⁷



Εικόνα 5 Σχηματική απεικόνιση του γονιδίου DPYD, με τους 4 σημαντικότερους πολυμορφισμούς του. (Πηγή: https://www.goldenhelix.org/images/presentations/3rd_UPGx_Personalized_Medicine_Toulouse/Erika_Cecchin_GoldenHelixDayToulouse.pdf)

Το ένζυμο παρουσιάζει καθολική έκφραση στην χοληδόχο κύστη (RPKM 9.2), στους πνεύμονες (RPKM 8.2) και σε άλλους 25 ιστούς, όπως φάνηκε από πειράματα αλληλούχισης RNA σε δείγματα ιστών από 95 ανθρώπους (Εικόνα 6).



Εικόνα 6 Επίπεδα έκφρασης του ενζύμου DPD σε 27 ιστούς σύμφωνα με το NCBI. [RPKM: Reads Per Kilobase Million, κανονικοποίηση του 'βάθους' και του μήκους του γονιδίου - αποτελέσματα από RNA-seq] Πηγή:³⁸⁾

Μονονουκλεοτιδικοί Πολυμορφισμοί (SNPs)

Οι μονονουκλεοτιδικοί πολυμορφισμοί ή αλλιώς SNPs (Single-nucleotide polymorphisms) αφορούν την υποκατάσταση μίας βάσης DNA από μία άλλη, σε ένα

τμήμα της αλληλουχία του. Φυσιολογικά, κάθε άτομο φέρει SNPs στο γονιδίωμα του. Υπάρχουν πάνω από 10 εκατομμύρια πολυμορφισμοί στο ανθρώπινο γονιδίωμα, με την πλειοψηφία αυτών να μην είναι παθολογικοί. Ωστόσο, κάποιοι έχουν αποδειχθεί να επηρεάζουν την λειτουργία ή/και την ανάπτυξη ενός οργανισμού.

Ένας γενετικός πολυμορφισμός ή ένας συνδυασμός SNPs μπορεί να είναι καθοριστικός για την προδιάθεση εκδήλωσης μιας νόσου, αλλά και για την απόκριση του εκάστοτε οργανισμού σε μία φαρμακευτική αγωγή. Διεξάγονται πολλές έρευνες σε πληθυσμιακές ομάδες με στόχο τη συσχέτιση διαφόρων πολυπαραγοντικών νόσων, όπως κάποιοι τύποι καρκίνου, με την παρουσία διαφόρων SNPs στο γονιδίωμα.³⁹

Το γονίδιο *DPYD* παρουσιάζει ετερογένεια αλλά λίγες μεταλλαγές σε αυτό έχουν συσχετιστεί με μεταβολές στη δραστικότητα του ενζύμου που κωδικοποιεί. Μερικές μεταλλαγές, οι οποίες κληρονομούνται με αυτοσωμικό υπολειπόμενο τρόπο, έχουν ως αποτέλεσμα μερική ή ολική ανεπάρκεια του ενζύμου (θυμινο-ουρακυλουρία ή οικογενής πυριμιδιναιμία) και σχετίζεται με αυξημένο κίνδυνο τοξικότητας σε ασθενείς με καρκίνο που λαμβάνουν χημειοθεραπεία με 5- φθοροουρακίλη.

Μεταξύ περίπου των 450 μονονουκλεοτιδικών πολυμορφισμών του *DPYD* που έχουν αναφερθεί στην dbSNP NCBI μέχρι σήμερα, μόνο είκοσι περίπου από αυτούς διαθέτουν λειτουργική σημασία. Τέσσερις από αυτές τις παραλλαγές θεωρούνται κλινικά σημαντικές για τις αναγνωρισμένες επιδράσεις στην πρωτεΐνη, τις αναγνωρισμένες τοξικές επιδράσεις τους και τη συχνότητα εμφάνισης στον πληθυσμό (Πίνακας 1). Πιο συγκεκριμένα, για την παρούσα εργασία, μας ενδιαφέρει η συχνότητα εμφάνισης αυτών των πολυμορφισμών στον Ευρωπαϊκό πληθυσμό, διότι τα δείγματα, που μελετήθηκαν προέρχονται από Έλληνες.

Ονομασία Πολυμορφισμού	Συχνότητα εμφάνισης στους Ευρωπαίους	Επίδραση
c.1905+1G>A (rs3918290, γνωστό και ως <i>DPYD</i> *2A, <i>DPYD</i> :IVS14 + 1G>A)	1.6%	επιβλαβής επίδραση στη δραστηριότητα DPD
c.1679T>G (rs55886062, <i>DPYD</i> *13,p.I560S)	0,1%	επιβλαβής επίδραση στη δραστηριότητα DPD
c.2846A>T (rs67376798, p.D949V)	0.7%	μέτρια μειωμένη δραστηριότητα DPD
c.1129-5923C>G (rs75017182, HapB3)	4.7%	μέτρια μειωμένη δραστηριότητα DPD

Πίνακας 1 Οι σημαντικότεροι πολυμορφισμοί στο γονίδιο *DPYD*, η συχνότητα εμφάνισης αυτών στην πληθυσμιακή ομάδα των Ευρωπαίων και η επίδρασή τους.⁴⁰

Λαμβάνοντας υπόψη και τις τέσσερις παραλλαγές συνολικά και σύμφωνα με τις οδηγίες κατά CPIC (Clinical Pharmacogenetics Implementation Consortium), της Διεθνούς Κοινοπραξίας που ορίζει τις κατευθυντήριες γραμμές γενετικού ελέγχου ασθενών και αντίστοιχα εξατομικευμένη προσαρμογή της φαρμακευτικής δόσης για ασφαλέστερη θεραπεία, εκείνοι οι πολυμορφισμοί που προκαλούν την μεγαλύτερη επίπτωση στην δραστηριότητα του ενζύμου είναι οι *DPYD**2A και *DPYD**13, με τους οποίους πρόκειται να ασχοληθούμε στην παρούσα εργασία.⁴⁰

Το αλληλόμορφο *DPYD**1 είναι αγρίου τύπου και σχετίζεται με φυσιολογική δραστηριότητα ενζύμου. Τα ομόζυγα άτομα για το *DPYD**1 παράγουν ένα πλήρως δραστικό ένζυμο και για αυτό ονομάζονται φυσιολογικοί μεταβολιστές. Άτομα που είναι ετερόζυγα, δηλαδή φέρουν ένα αλληλόμορφο αγρίου τύπου και ένα μειωμένης δραστηριότητας, έχουν μερική ανεπάρκεια ενζύμου και ονομάζονται ενδιάμεσοι

μεταβολιστές. Οι ετεροζυγώτες εκτιμάται ότι αποτελούν το 3-5% των ατόμων και παρουσιάζουν υψηλό κίνδυνο τοξικότητας έπειτα από χημειοθεραπεία με 5-φθοροουρακίλη. Τα ομόζυγα άτομα για δύο αλληλόμορφα που φέρουν παραλλαγή έχουν ολική απουσία δραστηριότητας του ενζύμου ονομάζονται αργοί μεταβολιστές και επομένως παρουσιάζουν τον πιο υψηλό κίνδυνο τοξικότητας. Ανάλογα με τις γενετικές παραλλαγές που φέρει ένα άτομο, ταξινομείται στους παρακάτω μεταβολικούς φαινότυπους (Πίνακας 2).⁴⁰

Πιθανός μεταβολικός φαινότυπος	Βαθμός ενεργότητας	Γονότυπος
Φυσιολογικοί μεταβολιστές	2	<ul style="list-style-type: none"> Δύο αλληλόμορφα αγρίου τύπου
Ενδιάμεσοι μεταβολιστές	1 ή 1,5	<ul style="list-style-type: none"> Ένα αλληλόμορφο αγρίου τύπου και ένα ανενεργό ή μειωμένης λειτουργίας Η δυο αλληλόμορφα μειωμένης λειτουργίας
Αργοί μεταβολιστές	0 ή 0,5	<ul style="list-style-type: none"> Δύο ανενεργά αλληλόμορφα Η ένα ανενεργό και ένα μειωμένης λειτουργίας

Πίνακας 2 Πιθανοί μεταβολικοί φαινότυποι του ενζύμου DPD βάσει των γονότυπων του γονιδίου *DPYD*. (Πηγή: ⁴⁰)

Ο πολυμορφισμός *DPYD*2A*

Ανάμεσα στους διάφορους πολυμορφισμούς που έχουν εντοπισθεί σε Ευρωπαίους, ο *DPYD*2A* φαίνεται να είναι ένας πολυμορφισμός με κακή πρόγνωση για ασθενείς που τον φέρουν στο γονιδιώμά τους και υπόκεινται σε θεραπεία με 5-φθοροουρακίλη. Ο κωδικός καταχώρησης του *DPYD*2A* στην dbSNP είναι ο rs3918290. Οι άλλες ονομασίες του, IVS14+1G>A, c.1905+1G>A (ονομασία βάσει Human Genome

Variation Society), υποδηλώνουν ότι πρόκειται για μία σημειακή μεταλλαγή στο χρωμόσωμα 1, στο εσώνιο 14 του γονιδίου, συγκεκριμένα στη νουκλεοτιδική θέση 97.450.058 η οποία αποτελεί θέση ματίσματος. Παρουσία του πολυμορφισμού, δηλαδή αντικατάσταση της γουανίνης από αδενίνη (στην 3'→5' αλυσίδα) παράγεται μία πρωτεΐνη από την οποία απουσιάζει ολόκληρο το εξώνιο 14. Αυτό έχει ως αποτέλεσμα την απουσία 55 αμινοξέων από το ένζυμο, η οποία οδηγεί σε ανεπάρκεια ενζυμικής δραστηριότητας και τελικώς διαταραχή στο μεταβολικό μονοπάτι των πυριμιδινών.⁴¹

Ο *DPYD*2A* είναι ο πιο συχνά μελετημένος πολυμορφισμός του γονιδίου. Σύμφωνα με την βάση δεδομένων OMIM, πρώτη φορά παρατηρήθηκε το 1996 σε έναν Βρετανό ασθενή, ο οποίος παρουσίασε σοβαρή τοξικότητα έπειτα από αγωγή με 5-FU. Οι ερευνητές εντόπισαν ετεροζυγωτία για μια αλλαγή βάσης από γουανίνη σε αδενίνη εντός της θέσης ματίσματος των πέντε πρώτων βάσεων στο εσώνιο 14 του *DPYD*. Βρήκαν ότι αυτή η παραλλαγή είχε ως αποτέλεσμα την παράλειψη ενός εξονίου και επομένως ένα ανενεργό αλληλόμορφο *DPYD*.⁴² Το 1998, ο Vreken, δήλωσε ότι η απαλοιφή του εξονίου 14 λόγω της ίδιας μετάλλαξης είχε παρατηρηθεί σε 22 από τα 42 αλληλόμορφα ασθενών που παρουσίαζαν πλήρη ανεπάρκεια του DPD.⁴³

Ο Van Kuilenburg το 1999 μελέτησε 22 ασθενείς από 17 διαφορετικές οικογένειες και αναγνώρισε 7 ανεξάρτητους πολυμορφισμούς στο *DPYD*. Μακράν, η πιο συχνή ήταν η *DPYD*2A*, που αντιπροσώπευε το 52% των μεταλλαγμένων αλληλομόρφων, των περιστατικών που μελετήθηκαν. Δεν υπήρχαν συσχετίσεις φαινοτύπου / γονότυπου. Το 2001 διαπίστωσε ότι η συγκεκριμένη παραλλαγή ήταν υπεύθυνη για το 59% των ασθενών που παρουσίασαν βαθμό τοξικότητας ≥ 3 ενώ λάμβαναν θεραπεία με 5-FU.

Από ανάλυση δύο πληθυσμών (487 και 1200 περιστατικά ο κάθε πληθυσμός αντίστοιχα) που πραγματοποιήθηκε βρέθηκε ότι ο το 70% των ασθενών που έφεραν

τον πολυμορφισμό *DPYD**2A παρουσίασαν τοξικότητα βαθμού 1 έως 2. Αντίστοιχα, εκείνοι που εμφάνισαν τοξικότητα βαθμού 3 ή 4 αποτελούσαν το 60%. Στη δεύτερη περίπτωση τοξικότητας οι ασθενείς χρειάστηκε η διακοπή της θεραπείας με φθοριοπυριμιδίνη ή προσαρμογή της δοσολογίας.³⁷

Ο πολυμορφισμός *DPYD**13

Ο κωδικός καταχώρησης του *DPYD**2A στην dbSNP είναι ο rs55886062. Η άλλη ονομασία με την οποία συναντάται στην βιβλιογραφία είναι η c.1679 T>G και υποδηλώνει ότι στο νουκλεοτίδιο του γονιδίου με αριθμό 1679 η προγονική βάση θυμίνης έχει αντικατασταθεί με μία βάση γουανίνης, στην αλυσίδα με κατεύθυνση 3'→5'. Αυτό έχει ως αποτέλεσμα, την αλλαγή ενός καταλοίπου (μη συνώνυμη μεταλλαγή) στο ενεργό κέντρο, συγκεκριμένα στη θέση 560, από λευκίνη σε σερίνη. Έτσι, παρουσία αυτού του πολυμορφισμού επηρεάζεται η λειτουργικότητα του ενζύμου. Η συχνότητα εμφάνισης θυμίνης σε όλους τους πληθυσμούς είναι 99,96% βάσει της Genomes Aggregation Database (gnomAD). Σύμφωνα με την βάση δεδομένων dbSNP η θυμίνη συνήθως αντικαθίστανται από αδενίνη.⁴⁴

Το 2010 δημοσιεύθηκε μία μελέτη που πραγματοποιήθηκε σε 47 Ευρωπαίους ασθενείς, οι οποίοι ακολουθούσαν αγωγή φθοριοπυριμιδίνης. Οι ασθενείς εμφάνισαν πολύ νωρίς σοβαρή τοξικότητα βαθμού ίσου και άνω του 3 και παραπέμφθηκαν για έλεγχο ανεπάρκειας DPD. Ένας από τους 47 ασθενείς έφερε τον πολυμορφισμό *DPYD**13 και εμφάνισε ουδετεροπενία τέταρτου βαθμού.⁴⁵

Σε μία μελέτη του 2013, που αφορούσε το φαινοτυπικό προφίλ των παραλλαγών του *DPYD* πραγματοποιήθηκε real-time cellular analysis και in vitro μέτρηση της ενζυμικής ενεργότητας. Η δραστηριότητα του ενζύμου που προερχόταν από το γονίδιο με τον πολυμορφισμό *DPYD**13 αξιολογήθηκε σε σύγκριση με την δραστηριότητα του

αγρίου τύπου αλλά και με την καταλυτικά ανενεργή παραλλαγή *DPYD*2A*. Φάνηκε μείωση δραστηριότητας κατά 75% σε σχέση με του ενζύμου αγρίου τύπου.⁴⁶

Όλα τα παραπάνω καταδεικνύουν τόσο τη σοβαρότητα της ύπαρξης των αλληλομόρφων *DPYD*2A* και *DPYD*13*, όσο και τη ανάγκη ανίχνευσής αυτών σε ασθενείς που πρόκειται να λάβουν θεραπεία φθοριοπυριμιδινών.

1.4 ΦΑΡΜΑΚΟΓΟΝΙΔΙΩΜΑΤΙΚΗ ΚΑΙ ΕΞΑΤΟΜΙΚΕΥΜΕΝΗ ΘΕΡΑΠΕΙΑ

Η Εξατομικευμένη Ιατρική είναι ένας ταχέως αναπτυσσόμενος κλάδος που σχετίζεται με την ανάλυση του γενετικού προφίλ ενός ασθενούς και την επιλογή της κατάλληλης θεραπευτικής προσέγγισης, βάσει των γενετικών χαρακτηριστικών κάθε ατόμου. Ο κλάδος αυτός έχει σημειώσει μεγάλη εξέλιξη τα τελευταία χρόνια, λόγω της τεράστιας προόδου της μοριακής βιολογίας, της γενετικής και της τεχνολογίας.

Η Φαρμακογονιδιωματική είναι μέρος της Εξατομικευμένης Ιατρικής και αποτελεί τη μελέτη του γονιδιώματος και του τρόπου που αυτό επηρεάζει την απόκριση ενός ατόμου σε κάποιο φάρμακο.⁴⁷ Σε αυτό το κατά τα άλλα νέο πεδίο συνδυάζεται η φαρμακολογία και η γονιδιωματική με σκοπό την σχεδίαση ασφαλών, αλλά και αποτελεσματικών θεραπευτικών σχεδίων (φάρμακο και δόση), σχετικά με την απόκριση, την έκβαση και την τοξικότητα, οι οποίες θα είναι προσαρμοσμένες κάθε φορά στις παραλλαγές των χαρακτηριστικών του RNA και του DNA του εκάστοτε ατόμου.⁴⁸ Έτσι, χάρη στη φαρμακογονιδιωματική είναι εφικτό να μειώνονται σοβαρά οι ανεπιθύμητες ενέργειες ενός φαρμάκου, με τρόπο οικονομικό και γρήγορο.⁴⁹

Η χρήση προγνωστικών γενετικών δοκιμών έχει καθιερωθεί στην εξατομικευμένη θεραπεία πολλών σύγχρονων κλινικών πεδίων όπως η ογκολογία, οι καρδιαγγειακές

παθήσεις, η κλινική ψυχιατρική και ο τομέας των μεταμοσχεύσεων.^{50,51} Παραδείγματος χάριν, η ανάλυση καρκινικού ιστού για κληρονομικές αλλά και σωματικές μεταλλάξεις αποτελεί χρήσιμο εργαλείο στα χέρια των ιατρών ώστε να καταλήξουν στο καλύτερο θεραπευτικό σχήμα για κάθε περίπτωση.⁵²

Προσαρμογή δόσης σε φορείς των παραλλαγών του *DPYD*

Η CPIC (Clinical Pharmacogenetics Implementation Consortium) είναι μία Διεθνής Κοινοπραξία που ορίζει τις κατευθυντήριες γραμμές γενετικού ελέγχου ασθενών και αντίστοιχα εξατομικευμένη προσαρμογή της φαρμακευτικής δόσης, για ασφαλέστερη θεραπεία. Χρήση προγνωστικών τεστ ανεπάρκειας DPD σε ασθενείς που λαμβάνουν 5-FU, ιδιαίτερα για τον ορθοκολικό καρκίνο, έχει αποδειχθεί ότι είναι μια οικονομικά αποδοτική στρατηγική. Πέρα από τον σοβαρό κίνδυνο τοξικότητας, ο μειωμένος μεταβολισμός της 5-FU, θα μπορούσε θεωρητικά να οδηγήσει σε ενδοκυτταρική αύξηση της συγκέντρωσης του φαρμάκου, στα κύτταρα του όγκου και επομένως αυξημένη αποτελεσματικότητα της χημειοθεραπευτικής της δράσης.

Ανάμεσα τους τέσσερις σημαντικότερους πολυμορφισμούς του γονιδίου *DPYD*, ο *DPYD*2A* και ο *DPYD*13* έχουν τις πιο επικίνδυνες επιπτώσεις στη λειτουργία του ενζύμου DPD.

Παρακάτω παρουσιάζονται οι συσχετίσεις μεταξύ του γονότυπου *DPYD* και του φαινότυπου DPD. Ο φαινότυπος βαθμολογείται με activity score γονιδιακής δραστηριότητας, *DPYD*-AS. Οι φορείς δύο μη λειτουργικών αλληλομόρφων ονομάζονται αργοί μεταβολιστές και έχουν *DPYD*-AS:0 ή 0,5. Οι φορείς ενός μη λειτουργικού ή μειωμένης λειτουργίας αλληλομόρφου είναι οι ενδιάμεσοι μεταβολιστές και έχουν *DPYD*-AS:1 ή 1,5. Τέλος, οι φυσιολογικοί μεταβολιστές, δηλαδή οι ομόζυγοι για το αγρίου τύπου αλληλόμορφο έχουν *DPYD*-AS:2.

Ασθενείς ετερόζυγοι για αλληλόμορφο μειωμένης λειτουργίας ή απώλειας λειτουργίας DPD θα πρέπει να λαμβάνουν μειωμένη αρχική δόση φθοριοπυριμιδίνης. Ειδικότερα, ασθενείς που ήταν ετερόζυγοι για τον πολυμορφισμό *DPYD**2A έλαβαν θεραπεία με 50% μειωμένη δόση και η τοξικότητα που παρουσίασαν ήταν στα αναμενόμενα όρια, παρόμοια δηλαδή με των φυσιολογικών μεταβολιστών. Οι ασθενείς με *DPYD*-AS:1,5 φάνηκε να μπορούν να ανεχθούν υψηλότερες δόσεις σε σχέση με αυτούς που είχαν *DPYD*-AS:1, συγκεκριμένα 25% μείωση της αρχικής δόσης. Εάν οι δύο πρώτοι κύκλοι θεραπείας είναι καλά ανεκτοί για να διατηρηθεί η αποτελεσματικότητα του φαρμάκου, η δόση στους επόμενους κύκλους θα μπορούσε να αυξηθεί, δεδομένου ότι ορισμένοι φορείς αλληλομόρφου απώλειας λειτουργίας ή μειωμένης ενεργότητας ενζύμου, ανέχονται τις συνηθισμένες αρχικές δόσεις 5-FU. Αντίστοιχα, εάν η δόση δεν είναι ανεκτή θα πρέπει να μειωθεί. Σε αργούς μεταβολιστές *DPYD* (με *DPYD*-AS: 0.5 ή 0) συνιστάται ανεπιφύλακτα να αποφεύγεται η χημειοθεραπεία με βάση την 5-FU. Παρόλα αυτά, αν δεν υπάρχουν άλλες εναλλακτικές θεραπείες, το σχήμα με 5-FU θα μπορούσε να χορηγηθεί σε πολύ μειωμένη δόση (μείωση κατά 75% της αρχικής) και συνεχή παρακολούθηση της κατάστασης της υγείας του ασθενούς, δεδομένου ότι υπάρχουν αναφορές επιτυχούς χορήγησης αρκετά μειωμένης δόσης 5-FU σε αργούς μεταβολιστές (Πίνακας 3).^{27,40}

Αλληλόμορφα	Ποσοστό μείωσης της αρχικής δόσης (%)
αγρίου τύπου και rs3918290	50
αγρίου τύπου και rs55886062	50
αγρίου τύπου και rs67376798	25
αγρίου τύπου και rs56038477	25

Πίνακας 3 Ποσοστό μείωσης της αρχικής δόσης φθοριοπυριμιδίνης σύμφωνα με τον γονότυπο κάθε ασθενούς

Κεφάλαιο 2: ΣΚΟΠΟΣ

Πολλά ευρήματα μελετών υποστηρίζουν πως η ανάλυση των παραλλαγών του γονιδίου *DPYD* είναι σημαντική. Πολυμορφισμοί, αυτού του γονιδίου επηρεάζουν τη δραστικότητα του ενζύμου DPD, το οποίο συμμετέχει τον καταβολισμό της 5-FU. Εντοπίζεται, λοιπόν, συσχέτιση των παραλλαγών, με την εμφάνιση σοβαρής, έως και θανατηφόρας τοξικότητας, σε ασθενείς που πρόκειται να ακολουθήσουν αντικαρκινική θεραπεία με 5-FU. Επομένως, η διενέργεια γονοτυπικών εξετάσεων για έλεγχο ανεπάρκειας του ενζύμου, κρίνεται απαραίτητη.

Η μελέτη της παρούσας πτυχιακής εργασίας έγινε σε δείγματα Ελλήνων με ψυχιατρικά νοσήματα. Σκοπός της εργασίας είναι η προτυποποίηση των πρωτοκόλλων για τη μέθοδο της αλυσιδωτής αντίδρασης πολυμεράσης, η οποία στοχεύει στην ενίσχυση νουκλεοτιδικών περιοχών, που εμπεριέχουν τον μελετώμενο, κάθε φορά πολυμορφισμό. Παρουσιάζονται δύο πρωτόκολλα ενίσχυσης, έναν για τον πολυμορφισμό *DPYD*2A* και ένα για τον *DPYD*13* και προτυποποίηση πρωτοκόλλου γονοτυπικού προσδιορισμού, με τη μέθοδο της πέψης με περιοριστικά ένζυμα, για κάθε πολυμορφισμό αντίστοιχα.

Κεφάλαιο 3: ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ

3.1 ΑΠΟΜΟΝΩΣΗ DNA

Στην παρούσα εργασία χρησιμοποιήθηκε δείγμα DNA από 30 Έλληνες ψυχιατρικούς ασθενείς. Η μελέτη έλαβε έγκριση από την Επιτροπή Ηθικής και Δεοντολογίας της Έρευνας του Πανεπιστημίου Πατρών. Από κάθε έναν, έγινε λήψη περιφερικού αίματος και τοποθέτησή του σε ειδικά σωληνάρια που περιείχαν τον αντιπηκτικό παράγοντα EDTA. Τα δείγματα αποθηκεύτηκαν στους -20°C , έως να πραγματοποιηθεί απομόνωση του γενετικού υλικού που περιείχαν.

Πρωτόκολλο οργανικής απομόνωσης

Αντιδραστήρια

- Διάλυμα RBC Lysis: 1mM EDTA (Ethylene diamine tetraacetic acid), pH 8,0
- Διάλυμα NaCl 1M
- Διάλυμα Cell Lysis (10 mM Tris-HCl, 26 mM EDTA, 0.5% Sodium dodecyl sulfate, SDS)
- Διάλυμα RNase A Sodium Acetate 3M
- Διάλυμα φαινόλης:χλωροφόρμιο:ισοαμυλική αλκοόλη (Phenol:chloroform:isoamyl alcohol) (25:24:1) (Sigma-Aldrich)
- Ισοπροπανόλη 100% v/v (Applichem PanReac)
- Αιθανόλη 70% v/v (Scharlau)
- Διάλυμα TE Buffer: 10 mM Tris-HCl, 1 mM EDTA (pH 8,0)

Στάδια

- Ανακίνηση σωληναρίων που φέρουν τα δείγματα και μεταφορά σε ειδικούς για φυγόκετρο σωλήνες (falcon) των 15ml, οι οποίοι περιέχουν 6ml RBC Lysis Solution
- Περιστροφικές κινήσεις στο falcon για πάνω από 5 φορές, έπειτα επώαση σε θερμοκρασία δωματίου για 2min και πάλι ξανά περιστροφικές κινήσεις για άλλες 5 τουλάχιστον φορές
- Φυγοκέντρηση των σωληναρίων για 10min στα 2000g, σε θερμοκρασία δωματίου
- Απομάκρυνση του υπερκειμένου (μία μικρή ποσότητα παραμένει)
- Επαναιώρηση του ιζήματος, που περιέχει λευκά αιμοσφαίρια, στην μικρή ποσότητα υπερκειμένου που έχει παραμείνει με χρήση οργάνου αναταράξεως (vortex)
- Ακολουθεί προσθήκη RBC Lysis Solution 10ml και ανακίνηση
- Φυγοκέντρηση σε θερμοκρασία δωματίου για 10min στα 2000g
- Απόρριψη υπερκειμένου με προσοχή
- Προσθήκη 1 ml διαλύματος NaCl 1M
- Ανάδευση falcon στο vortex έως ότου επαναιωρηθούν τα λευκά αιμοσφαίρια
- Προσθήκη 6ml διαλύματος Cell Lysis
- Προσθήκη 50μl διαλύματος RNAase A
- Ήπια ανάδευση στο vortex και επώαση για 60min τουλάχιστον στους 37°C (λύση των λευκών και αποδιάταξη του RNA)
- Προσθήκη 1ml διαλύματος Sodium Acetate 3M και ήπια ανάδευση στο vortex
- Προσθήκη στο falcon 1 ml Phenol:chloroform:isoamyl alcohol αναλογίας 25:24:1

- Ανάδευση για πάνω από 10sec στο vortex (με ενδιάμεσες διακοπές για ανακίνηση του falcon)
- Φυγοκέντρωση σε θερμοκρασία δωματίου για 5min στα 1500g
- Προσθήκη 5ml ισοπροπανόλης 100% σε νέο falcon και προσθήκη σε αυτό του υπερκειμένου της φυγοκέντρωσης του προηγούμενο βήματος
- Αργή ανακίνηση του falcon για 25 φορές, με σκοπό την συμπύκνωση του DNA. Αν η συμπύκνωση δεν είναι ορατή με γυμνό μάτι απαιτείται επώαση στους 4°C για 18h
- Φυγοκέντρωση στα 2000g σε θερμοκρασία δωματίου για 5min
- Προσεκτική απομάκρυνση του υπερκειμένου
- Ακολουθεί η προσθήκη 10 ml αιθανόλης 70% και ανακίνηση μέχρι την έκπλυση του ιζήματος
- Φυγοκέντρωση στα 2000g σε θερμοκρασία δωματίου για 3min
- Απομάκρυνση της αιθανόλης με προσοχή
- Τοποθέτηση του falcon ανεστραμμένου, σε καθαρό χαρτί. Αφήνουμε για 10-15min να στεγνώσει το ίζημα (air-dry)
- Προσθήκη στο falcon 500 µl TE Buffer και ήπια ανάδευση στο vortex (5 με 10 sec)
- Επώαση για 18h στους 37 °C (για πλήρη διάλυση του ιζήματος)
- Ήπια ανάδευση στο vortex
- Αποθήκευση στους -20 °C

3.2 ΠΟΣΟΤΙΚΟΣ ΚΑΙ ΠΟΙΟΤΙΚΟΣ ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟΣ ΑΠΟΜΟΝΩΜΕΝΟΥ DNA

Στα δείγματα που απομονώθηκαν υπολογίστηκε η συγκέντρωση του ολικού γενετικού υλικού με την αξιοποίηση της συσκευής “NanoDrop Spectrophotometer Q6000 UV-Vis”(200-750nm) της εταιρείας Quawell. Πρόκειται για ένα φασματοφωτόμετρο που αξιοποιεί την τεχνολογία των οπτικών ινών και χρειάζεται μόλις 1μl δείγματος. Το δείγμα δεν τοποθετείται σε κυψελίδα, αλλά η σταγόνα συγκρατείται λόγω επιφανειακής τάσης και γεφυρώνει αυτές τις δύο επιφάνειες που φέρουν οπτικές ίνες.⁵³



Εικόνα 7 (α)Όργανο NanoDrop Spectrophotometer Q6000 , (β) τοποθέτηση δείγματος στην οπτική επιφάνεια με τη χρήση πιπέτας και (γ) σταγόνα δείγματος ανάμεσα στις δύο οπτικές επιφάνειες

Τα χημικά μόρια εμφανίζουν μέγιστη τιμή απορρόφησης ηλεκτρομαγνητικής ακτινοβολίας σε ορισμένο μήκος κύματος το καθένα. Για τα νουκλεϊκά οξέα το μήκος κύματος είναι 260nm, ενώ οι πρωτεΐνες παρουσιάζουν στα 280nm. Τέλος, τα άλατα και η φαινόλη στα 230nm.

Οι λόγοι καθαρότητας:

- A_{260}/A_{280nm}

Επιθυμητές τιμές ανάμεσα σε 1,8 έως 2 (σημαίνει ότι το δείγμα περιέχει καθαρό DNA δίχως προσμίξεις. Αν ο λόγος είναι μικρότερος του επιθυμητού εύρους πιθανότατα στο

δείγμα υπάρχουν πρωτεΐνες, φαινόλη ή άλλες χημικές ουσίες που χρησιμοποιήθηκαν κατά την διαδικασία απομόνωσης. Αν ο λόγος είναι μεγαλύτερος του 2, τότε στο δείγμα που μετρήθηκε υπάρχει RNA.

- A260/A230nm

Επιθυμητές τιμές μεταξύ 2 και 2,2 (δείγμα καθαρού DNA χωρίς προσμίξεις). Μικρότερος λόγος αποδίδεται σε ύπαρξη πρωτεϊνών, αλάτων ή/και φαινόλης.⁵³

Διαδικασία φωτομέτρησης

Αρχικά, καθαρίζουμε τις δύο οπτικές επιφάνειες στις οποίες πρόκειται να τοποθετηθεί το δείγμα. Ακολουθεί μηδενισμός της μέτρησης χρησιμοποιώντας τυφλό δείγμα ρυθμιστικού διαλύματος Tris-EDTA. Στην συνέχεια, με μία πιπέτα τοποθετούμε την κάτω επιφάνεια 1μl από το προς μέτρηση δείγμα και κατεβάζουμε τον βραχίονα του οργάνου. Τέλος, επιλέγουμε στο λογισμικό την εντολή 'Measure' και αυτόματα υπολογίζονται τόσο η συγκέντρωση του γενετικού υλικού στο δείγμα όσο και οι λόγοι καθαρότητας του. Σκουπίζουμε με χαρτί τις δύο επιφάνειες και προχωράμε σε επόμενη μέτρηση.

3.3 ΣΧΕΔΙΑΣΜΟΣ ΕΚΚΙΝΗΤΩΝ

Ο σχεδιασμός των εκκινητών έγινε με την βοήθεια του υπολογιστικού εργαλείου Primer 3 (<https://primer3.org/>). Για να επιλεγθεί το κατάλληλο ζεύγος εκκινητών κάθε φορά χρειάζεται να ελέγχονται κάποιοι παράμετροι. Το μήκος των εκκινητών πρέπει να είναι 18 έως 22 νουκλεοτίδια, αρκετά μεγάλο για να εξασφαλισθεί η ειδικότητα και παράλληλα αρκετά μικρό για να μπορεί εύκολα ο εκκινητής να υβριδοποιηθεί στην μονόκλωνη αλυσίδα. Η Tm κάθε εκκινητή θα πρέπει να είναι από 50 έως 60°C, ενώ

παράλληλα η μεταξύ τους διαφορά να μην υπερβαίνει τους 5°C. Η περιεκτικότητα σε GC είναι καλό να βρίσκεται ανάμεσα στο 40% με 55%, με άλλα λόγια να υπάρχει ισορροπημένη κατανομή μεταξύ περιοχών GC και AT. Σημαντικό είναι επίσης να επιβεβαιωθεί η ύπαρξη GC στα 5 τελευταία νουκλεοτίδια του εκκινητή, καθώς εξυπηρετούν την ειδικότερη σύνδεση λόγω των τριών δεσμών υδρογόνου (δ.Η) που σχηματίζουν, σε αντίθεση με AT που ενώνονται με δύο δ.Η. Ωστόσο, πάνω από 3 G ή C, στις 5 τελευταίες βάσεις δεν ενδείκνυται. Επιπλέον, δεν είναι επιθυμητές 4 και πάνω συνεχόμενες επαναλήψεις της ίδιας βάσης στην σειρά, καθώς και 3 και πάνω δινουκλεοτιδικές επαναλήψεις (πχ ATATATAT).

SNP που συμπεριλαμβάνεται	Αλληλουχία εκκινητών 5'→3'		Tm	Μήκος PCR προϊόντος (bp)
	Πρόσθιος (F)	Ανάστροφος(R)		
rs3918290	CACCTTCATAAAT ACCAGCCAC	AACGGCTGCATATT GGTGTC	61°C	376
rs55886062	TGTGTCCCTATCT TTGAGCTGA	TAGTGTAGAAATGG CCGGAT	60°C	475

Πίνακας 4 Εκκινητές που επιλέχθηκαν για τους πολυμορφισμούς που μελετώνται

Με την βοήθεια των υπολογιστικών εργαλείων DINAMelt Server Two-State-Melting-Folding και DINAMelt Server Two-State-Melting-Hybridization γίνεται έλεγχος για την αποφυγή εσωτερικής συμπληρωματικότητας του προϊόντος και συμπληρωματικότητας μεταξύ των εκκινητών, αντίστοιχα, ώστε να αποτραπεί η εμφάνιση δευτεροταγών δομών, μετά το πέρας της PCR. Τέλος, στην Ensembl BLAST/BLAT υπάρχουν πληροφορίες σχετικά με το αν ο κάθε εκκινητής μπορεί να υβριδοποιηθεί σε άλλο σημείο του γονιδιώματος, άρα να δώσει κάποιο παραπροϊόν και

πόσο πιθανό είναι κάτι τέτοιο να συμβεί. Αφού ελέγχθηκαν, όλες οι παραπάνω παράμετροι, καταλήξαμε στα δύο ζεύγη των εκκινήτων, που φαίνονται στον πίνακα 4.

3.4 ΑΛΥΣΙΔΩΤΗ ΑΝΤΙΔΡΑΣΗ ΠΟΛΥΜΕΡΑΣΗΣ (PCR)

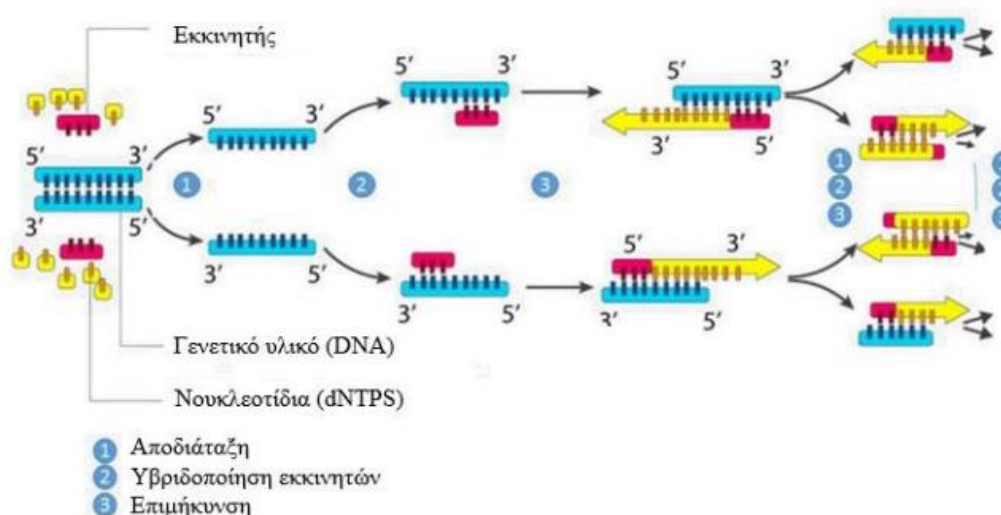
Η μέθοδος της Αλυσιδωτής Αντίδρασης Πολυμεράσης (Polymerase Chain Reaction-PCR) αναπτύχθηκε από τον Kary Mullis την δεκαετία του 1980. Είναι μία μοριακή μέθοδος και αποτέλεσε κομβικό σημείο για την εξέλιξη των βιοεπιστημών. Με την PCR να εκτελεί ρόλο μοριακού εκτυπωτή, επιτυγχάνεται η ενίσχυση ενός συγκεκριμένου τμήματος από ένα αρχικό δείγμα γενετικού υλικού και δίνεται έτσι η δυνατότητα περαιτέρω μελέτης αυτών των προϊόντων με άλλες τεχνικές όπως η πέψη με ένζυμα περιορισμού, η ηλεκτροφόρηση σε πηκτώματα, η αλληλούχηση και άλλα. Η PCR χρησιμοποιείται ευρέως τόσο σε ερευνητικό όσο και σε διαγνωστικό επίπεδο καθώς χαρακτηρίζεται από σημαντικά πλεονεκτήματα όπως η ταχύτητα, το χαμηλό κόστος, η αυξημένη ευαισθησία και η ειδικότητα. Πλέον, έχουν αναπτυχθεί πολλές παραλλαγές της τεχνικής όπως η ποσοτική PCR και η αντίστροφη μεταγραφή.

Αρχή της μεθόδου

Η αρχή της μεθόδου βασίζεται στην ιδιότητα του ενζύμου πολυμεράση του DNA, η οποία χρησιμοποιώντας ως εκμαγείο μία αλληλουχία-κλώνο, συνθέτει μία νέα αλυσίδα DNA συμπληρωματική στον αρχικό κλώνο, *in vitro*. Η αντίδραση πραγματοποιείται σε τρία επαναλαμβανόμενα διαδοχικά βήματα:

- α) αποδιάταξη του δίκλωνου DNA με θέρμανση στους 94-95°C για 30-60 sec συνήθως
- β) υβριδοποίηση εκκινήτων συμπληρωματικά στο μονόκλωνο εκμαγείο σε θερμοκρασία 55-65 °C

γ) επιμήκυνση του νεοσυντιθέμενου κλώνου από την πολυμεράση, η οποία ξεκινώντας από τους εκκινητές προσθέτει στο 3' άκρο κάθε φορά ελεύθερα τριφωσφορικά δεοξυριβονουκλεοτίδια (dNTPs), συμπληρωματικά.



Εικόνα 8 Τα βασικά στάδια της PCR (Προσαρμογή από: wntproteins.com).

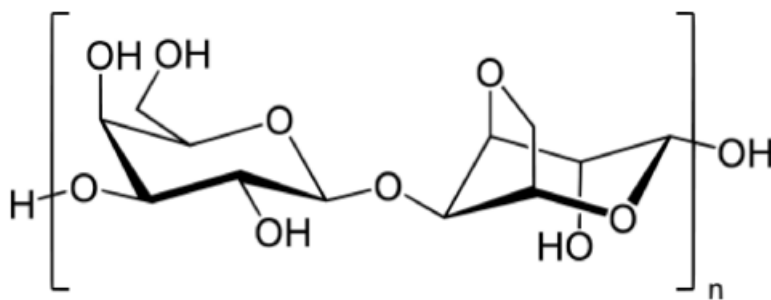
Η πολυμεράση που χρησιμοποιείται ονομάζεται Taq καθώς προέρχεται από το θερμοφίλο βακτήριο *Thermus aquaticus*. Επιλέγεται το συγκεκριμένο ένζυμο καθώς παραμένει ανθεκτικό για ορισμένο χρόνο, ακόμη και στους 95 °C. Η βέλτιστη λειτουργία της είναι στους 72 °C, για αυτό και το τρίτο στάδιο της επιμήκυνσης πραγματοποιείται σε αυτή τη θερμοκρασία.

Τα τρία παραπάνω βήματα εκτελούνται επαναλαμβανόμενα για 25-35 κύκλους, δηλαδή έως ότου επιτευχθεί ικανοποιητική ενίσχυση. Η συσκευή όπου πραγματοποιείται η PCR ονομάζεται θερμικός κυκλοποιητής, διότι διαθέτει θερμαινόμενη πλάκα με δυνατότητα εναλλαγής της θερμοκρασίας γρήγορα και με υψηλή ακρίβεια.

Πέρα από τον θερμικό κυκλοποιητή, το αρχικό γενετικό υλικό του οποίου τμήμα στοχεύουμε να ενισχύσουμε, τα ζεύγη των εκκινητών, την πολυμεράση του DNA και τα dNTPs, για να πραγματοποιηθεί η αντίδραση απαιτείται και ένα ρυθμιστικό διάλυμα που θα είναι υπεύθυνο για τη διατήρηση του pH και την συγκέντρωση των αλάτων στα επιθυμητά επίπεδα, αλλά και θα περιέχει ιόντα Mg^{+2} , τα οποία λειτουργούν ως συμπράγοντας του ενζύμου και με περίσσεια ιόντων το αποτέλεσμα είναι μη ειδική ενίσχυση, ενώ χαμηλότερη συγκέντρωση ιόντων οδηγεί αντίστοιχα σε μειωμένη ή και καθόλου ενίσχυση της αλληλουχίας.⁵³

3.5 ΗΛΕΚΤΡΟΦΟΡΗΣΗ ΤΩΝ ΠΡΟΪΟΝΤΩΝ PCR

Η ηλεκτροφόρηση είναι μία μέθοδος κατά την οποία τα μακρομόρια (DNA, RNA, πρωτεΐνες) διαχωρίζονται βάσει του μεγέθους τους, υπό την επίδραση ηλεκτρικού πεδίου, σε ένα υλικό που φέρει ευμεγέθεις πόρους (πήκτωμα). Ως γνωστόν, τα μόρια DNA φέρουν αρνητικό φορτίο, λόγω παρουσίας φωσφορικών ομάδων στην αλυσίδα. Έτσι, όταν βρίσκονται στην επίπεδη συσκευή της ηλεκτροφόρησης και ασκείται σε αυτά ηλεκτρική τάση, τα εξαναγκάζει να κινηθούν από τον αρνητικό πόλο (κάθοδος) προς τον θετικό (άνοδος). Η κίνηση τους μέσα από τους πόρους του πηκτώματος εξαρτάται από παραμέτρους όπως το μέτρο της τάσης που εφαρμόζεται, η ιοντική ισχύς του ρυθμιστικού διαλύματος, η θερμοκρασία αλλά και το μέγεθος και το φορτίο των μακρομορίων. Η κίνηση των μικρότερων μορίων διευκολύνεται λόγω του μεγέθους τους, οπότε στο πήκτωμα εντοπίζονται πιο κοντά στην άνοδο. Η μέθοδος επιτρέπει τον διαχωρισμό δεοξυριβονουκλεϊκών οξέων μήκους από 500bp έως και 25kb.



Εικόνα 9 Ο χημικός τύπος της αγαρόζης

Για να έχουμε μία οπτικοποίηση των αποτελεσμάτων της αντίδρασης PCR, ένας τρόπος είναι να ηλεκτροφορήσουμε τα προϊόντα της σε πήκτωμα αγαρόζης. Η αγαρόζη είναι ένας πολυσακχαρίτης, ο οποίος απομονώνεται από φύκη (red algae) και χρησιμοποιήθηκε πρώτη φορά για εξυπηρέτηση βιολογικών σκοπών το 1882 από τον Robert Koch. Η περιεκτικότητα του πηκτώματος σε αγαρόζη ορίζεται κάθε φορά ανάλογα με το μέγεθος των μορίων DNA που στοχεύουμε να διαχωρίσουμε. Όσο πιο μικρού μήκους νουκλεϊκά οξέα επιθυμούμε να διαχωρίσουμε, τόσο υψηλότερη συγκέντρωση αγαρόζης απαιτείται στο πήκτωμα.⁵³

Πρωτόκολλο παρασκευής πηκτώματος αγαρόζης με περιεκτικότητα 1,5% w/v

Αντιδραστήρια

- Ρυθμιστικό διάλυμα TAE 1x. Παρασκευάζεται από αραιώση TAE 50x (242g Tris base (Applichem), 100ml EDTA 0.5 M, 57.1 ml Glacial acetic acid (Sigma-Aldrich), pH 8.0 και προσθήκη ddH₂O μέχρι τελικό όγκο 1L)
- Αγαρόζη (NIPPON Genetics)
- Gel Red DNA Stain (NIPPON Genetics), ώστε να καταστεί ορατή η ζώνη σε έκθεση ακτινοβολίας UV.

Στάδια

- Ζύγισμα 1,5g σκόνης αγαρόζης και ανάμιξη σε 100ml TAE 1x σε κωνική φιάλη
- Θέρμανση έως να διαλυθεί πλήρως η αγαρόζη και το διάλυμα να είναι διαυγές
- Προσθήκη 4,5ml χρωστικής Gel Red και ανάδευση
- Μεταφορά του διαλύματος σε ειδικό καλούπι που φέρει «χτενάκι» για τη δημιουργία θέσεων τοποθέτησης των δειγμάτων (πηγαδάκια) και αναμονή έως ότου πήξει το διάλυμα (~30min)
- Εμβάπτιση του πηκτώματος στην ειδική συσκευή για ηλεκτροφόρηση , στην οποία έχει ήδη προστεθεί TAE 1x.

Πρωτόκολλο φόρτωσης των δειγμάτων στο πήκτωμα και ηλεκτροφόρηση

Αντιδραστήρια

- Ρυθμιστικό διάλυμα TAE 1x
- Διάλυμα φόρτωσης δειγμάτων Orange G (6x) (0,25mL χρωστική Orange G (Sigma-Aldrich), 30mL γλυκερόλης και 70ml ddH₂O)

Λόγω ύπαρξης γλυκερόλης, το ιξώδες του διαλύματος αυξάνεται και έτσι αποτρέπεται η διαρροή των δειγμάτων στο πήκτωμα. Επιπλέον λόγω του πορτοκαλί χρώματος διευκολύνεται η παρατήρηση της πορείας της ηλεκτροφόρησης των δειγμάτων.

- Μάρτυρας μοριακών μεγεθών (DNA Ladder) βήματος 100bp (New England Biolabs)

Η συσκευή που χρησιμοποιήθηκε είναι από την εταιρεία Bio-Rad.

Στάδια

- Προσθήκη 3μl DNA Ladder στο πρώτο πηγαδάκι και 4μl δείγμα σε κάθε επόμενο (2,5μl PCR product και 1,5μl διαλύματος φόρτωσης).
- Σύνδεση των καλωδίων, με τον θετικό ηλεκτρόδιο να βρίσκεται απέναντι από τις θέσεις φόρτωσης
- Ρύθμιση τάσης στα 100V για 30min σε RT.
- Απεικόνιση των αποτελεσμάτων με μεταφορά του πηκτώματος σε ειδική τράπεζα υπεριώδους ακτινοβολίας (UVP).

3.6 ΠΟΛΥΜΟΡΦΙΣΜΟΣ ΜΗΚΟΥΣ ΘΡΑΨΜΑΤΟΣ

ΠΕΡΙΟΡΙΣΜΟΥ (PCR-RFLP)

Η αρχή της μεθόδου στηρίζεται στην ικανότητα μιας κατηγορίας ενζύμων, που ονομάζονται περιοριστικές ενδονουκλεάσες, να αναγνωρίζουν συγκεκριμένες δίκλωνες αλληλουχίες δεοξυριβονουκλεϊκών οξέων και να τις τέμνουν. Έτσι, δημιουργούνται πρότυπα θραύσματα.

Πριν πραγματοποιηθεί η πέψη, το αρχικό δείγμα DNA έχει ενισχυθεί με PCR, με τη βοήθεια ειδικών εκκινητών που στοχεύουν στην δημιουργία ενός προϊόντος σχετικά μικρού μήκους που φέρει εντός του την θέση πολυμορφισμού. Τα προϊόντα της PCR επωάζονται με το κατάλληλο κάθε φορά ένζυμο για ορισμένο χρόνο και σε κατάλληλη θερμοκρασία. Μετά το πέρας του χρόνου επώασης η θερμοκρασία αυξάνεται και προκαλείται έτσι απενεργοποίηση του περιοριστικού ενζύμου, λόγω μετουσίωσης. Τέλος, τα προϊόντα που προκύπτουν από την πέψη ηλεκτροφορούνται σε πήκτωμα αγαρόζης με σκοπό την απεικόνιση και τον διαχωρισμό τους και ανάλογα με το πρότυπο θραυσμάτων που προκύπτει, μπορούμε να διακρίνουμε τον γονότυπο αυτών.

Με σκοπό την γονοτύπηση των προς μελέτη πολυμορφισμών rs3918290 και rs55886062 χρησιμοποιήθηκαν τα περιοριστικά ένζυμα HpyCH4IV και TfiI, αντίστοιχα (NEW ENGLAND BioLabs® Inc). Η επιλογή των κατάλληλων περιοριστικών ενζύμων έγινε με τη βοήθεια του προγράμματος NEB cutter (v.2.0). Κάθε ένζυμο διατίθεται μαζί με ρυθμιστικό διάλυμα επώασης “10X CutSmart™ Buffer” (50 mM Potassium Acetate, 10 mM Magnesium Acetate, 20 mM Tris-acetate, 100 µg/ml BSA, pH 7,9 στους 25°C).

Πολυμορφισμός	Ένζυμο	Αλληλουχία αναγνώρισης	Σχηματιζόμενα άκρα
rs3918290	HpyCH4IV	5' A CGT3' 3' TGC A 5'	5' προεξεχόντων άκρων
rs55886062	TfiI	5' G AWTC 3' 3' ATWA G 5' (W= A ή T)	5' προεξεχόντων άκρων

Πίνακας 5 Ένζυμα για την γονοτύπηση των πολυμορφισμών rs3918290 και rs55886062

(<https://international.neb.com/>)

Τόσο το ένζυμο HpyCH4IV, όσο και το TfiI κόβουν τα προϊόντα της PCR, εφόσον στην θέση πολυμορφισμού υπάρχει το προγονικό αλληλόμορφο (κυτοσίνη για τον rs3918290 και αδενίνη για τον rs55886062).

Κεφάλαιο 4: ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

4.1 ΕΝΙΣΧΥΣΗ ΝΟΥΚΛΕΟΤΙΔΙΚΩΝ ΤΜΗΜΑΤΩΝ ΤΟΥ *DPYD*

Η ενίσχυση των δύο νουκλεοτιδικών τμημάτων του *DPYD*, καθένα από τα οποία φέρει τις θέσεις των μελετώμενων πολυμορφισμών rs3918290 και rs55886062, αντίστοιχα, πραγματοποιήθηκε με την μέθοδο PCR. Στόχος ήταν η προτυποποίηση των συνθηκών, ώστε στην ηλεκτροφόρηση να βλέπουμε μία καθαρή και έντονη ζώνη στο αναμενόμενο ύψος (βάσει του μοριακού μεγέθους του προϊόντος).

Δοκιμάστηκαν διάφορες συνθήκες για κάθε πολυμορφισμό, για να καταλήξουμε στα παρακάτω πρωτόκολλα. Γίναν δοκιμές στην θερμοκρασία και τον χρόνο υβριδοποίησης των εκκινητών, τον αριθμό των κύκλων, τις συγκεντρώσεις του $MgCl_2$, των εκκινητών, του ενζύμου και του δείγματος DNA.

Πρωτόκολλο PCR

Στόχος στην παρούσα εργασία είναι η ενίσχυση δύο τμημάτων του γονιδίου *DPYD*, κάθε ένα από τα οποία φέρει τις θέσεις των πολυμορφισμών rs3918290 και rs55886062.

Οι αντιδράσεις PCR έγιναν με τους θερμοκυκλοποιητές (thermal cyclers) του εργαστηρίου: “SuperCycler PCR machine”, της εταιρείας Kyrattec (Mansfield, Queensland, Australia) και του “GeneAmp PCR System 9700” της εταιρείας Applied Biosystems (Foster City, California, USA).

Για κάθε αντίδραση PCR χρησιμοποιήθηκε και ένας αρνητικός μάρτυρας (negative control) ώστε να εξασφαλισθεί η απουσία επιμόλυνσης στα αναλώσιμα και στα αντιδραστήρια που χρησιμοποιήθηκαν.

- Ενίσχυση τμήματος που φέρει τον πολυμορφισμό rs3918290

Αντιδραστήρια	Όγκος ανά αντίδραση (σε μl) Vτελικός= 25μl	Αρχική συγκέντρωση	Τελική συγκέντρωση
ddH ₂ O	15,8μl	-	-
Ρυθμιστικό δ/μα Taq pol	2,5 μl	10x	1x
MgCl ₂	1,5 μl	25mM	1,5 mM
Πρόσθιος εκκινητής	1,25 μl	10 mM	0,5 mM
Ανάστροφος εκκινητής	1,25 μl	10 mM	0,5 mM
dNTPs	0,5 μl	10 mM	0,2 mM
Taq DNA pol (enzyquest)	0,2 μl	5 U/μl	0,04 U/μl
DNA	2 μl	50 ng/μl	100ng

Πίνακας 6 Όγκοι και συγκεντρώσεις της αντίδρασης PCR για τον πολυμορφισμό rs3918290

Στάδια	Θερμοκρασία	Χρόνος
1. Αρχική αποδιάταξη	95°C	5 min
2. Αποδιάταξη	95°C	45sec
3. Υβριδοποίηση εκκινητών	61°C	30sec
4. Επιμήκυνση	72°C	1 min
	Επανάληψη σταδίων 2 έως 4 για 30 κύκλους	
5. Τελική επιμήκυνση	72°C	10min
6. Διατήρηση	4°C	∞

Πίνακας 7 Πρωτόκολλο της αντίδρασης PCR για τον πολυμορφισμό rs3918290

- Ενίσχυση τμήματος που φέρει τον πολυμορφισμό rs55886062

Αντιδραστήρια	Όγκος ανά αντίδραση (σε µl) Vτελικός= 25µl	Αρχική συγκέντρωση	Τελική συγκέντρωση
ddH ₂ O	15,8µl	-	-
Ρυθμιστικό δ/μα Taq pol	2,5 µl	10x	1x
MgCl ₂	1,5 µl	25mM	1,5 mM
Πρόσθιος εκκινητής	1,25 µl	10 mM	0,5 mM

Ανάστροφος εκκινητής	1,25 μ l	10 mM	0,5 mM
dNTPs	0,5 μ l	10 mM	0,2 mM
Taq DNA pol (enzyquest)	0,2 μ l	5 U/ μ l	0,04 U/ μ l
DNA	2 μ l	50 ng/ μ l	100 ng

Πίνακας 8 Όγκοι και συγκεντρώσεις της αντίδρασης PCR για τον πολυμορφισμό rs55886062

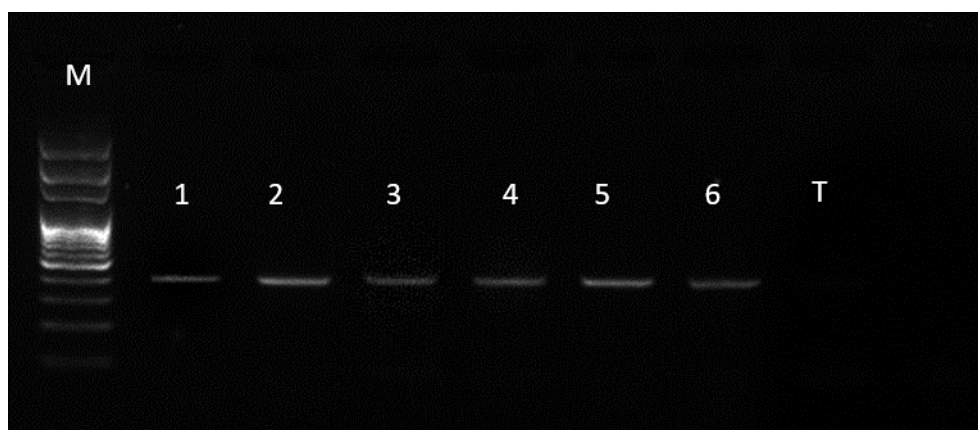
Στάδια	Θερμοκρασία	Χρόνος
1. Αρχική αποδιάταξη	95°C	5 min
2. Αποδιάταξη	95°C	45sec
3. Υβριδοποίηση εκκινητών	60°C	30sec
4. Επιμήκυνση	72°C	1 min
	Επανάληψη σταδίων 2 έως 4 για 30 κύκλους	
5. Τελική επιμήκυνση	72°C	10min
6. Διατήρηση	4°C	∞

Πίνακας 9 Πρωτόκολλο της αντίδρασης PCR για τον πολυμορφισμό rs55886062

PCR rs3918290

Το μοριακό μέγεθος του προϊόντος που ενισχύθηκε με PCR είναι 376bp. Η αλληλουχία είναι η εξής (υπογραμμισμένη η θέση πολυμορφισμού όπου C το φυσιολογικό αλληλόμορφο και T το παραλλαγμένο αλληλόμορφο στον πρόσθιο κλώνο):

caccttcataaataccagccacatacagtgaaaaccaactcaataaaatgagtatttcattctcttccttctgcttatgtagatac
 ttcttccatcttacatggcaccattataaacaagcttcacattgtgtgggttttatgagttcttgagcttttcttctttttatcttcc
 tatgcatcagcaaagcaactggcagattctttaataaaatatacacattaatattataagcctatgaattggatgtttaaataaac
 attcaccaacttatgccaattctctgttttagatgttaaatcacacttaCgttgtctggaaagtcagccttagttcagtgacactt
 tgacaccaatatgcagccgtt



Εικόνα 10 Απεικόνιση αποτελεσμάτων PCR σε πήκτωμα αγαρόζης 1,5% w/v. Τα προϊόντα εμπεριέχουν τη θέση του προς μελέτη πολυμορφισμό rs3918290. M: μάρτυρας μοριακών μεγεθών (βήμα 100bp), T: αρνητικός μάρτυρας (επιβεβαιώνει ότι δεν υπήρξε επιμόλυνση των αντιδραστηρίων με γενωμικό DNA), αρίθμηση 1 ως 6: ενδεικτικά τα δείγματα DNA των ατόμων που χρησιμοποιήθηκαν.

PCR rs55886062

Το μοριακό μέγεθος του προϊόντος που ενισχύθηκε με PCR είναι 475bp. Η αλληλουχία είναι η εξής (υπογραμμισμένη η θέση πολυμορφισμού όπου Α το φυσιολογικό αλληλόμορφο και C η μεταλλαγή στον πρόσθιο κλώνο):

tgtgtccctatctttgagctgagcatccaaaaataatgaacaattaataacaaaaataagagtttgagattattaaatgaa
 aaagtcactttcataatatttatatctttgttgcttcctagacaataactaaatgagcaatatatgcctgcccttcttccatgggaca
 gaaaggaaggaaagaaactaaagattaatgtgtaatgataggtctgtcaaatagtttaataagtagtatttcttagtaaaaaaa
 atccattataatgtttataccttaattaaaaatatatgatagacatttctatatgacttcaataaatatttcttaccttatcaagagagaa

agttttggtgagggcaaaaccccatccagcttcaaaagctcttgaAtcattgatgtgctgggtggctggagttgcgctagca
agacccaaaaggattataaaacttcaatccggccatttctacacta

4.2 ΓΟΝΟΤΥΠΗΣΗ ΕΝΙΣΧΥΜΕΝΩΝ ΠΡΟΪΟΝΤΩΝ

Με την μέθοδο της γονοτύπησης, που βασίζεται στην αξιοποίηση των περιοριστικών ενζύμων, μπορούμε να εξάγουμε πληροφορία, σχετικά με την αλληλουχία του γονιδιώματος. Ένα ένζυμο πέψης αναγνωρίζει μια αλληλουχία στο DNA και το κόβει, αφήνοντας είτε μονόκλωνα, είτε δίκλωνα άκρα. Για να μελετήσουμε έναν συγκεκριμένο πολυμορφισμό επιλέγουμε ένζυμο, το οποίο αναγνωρίζει την αλληλουχία, γύρω από τη θέση του πολυμορφισμού. Η αλληλουχία αναγνώρισης του ενζύμου μπορεί να ταυτίζεται με την αλληλουχία του προγονικού αλληλομόρφου, αλλά μπορεί να είναι ίδια με την αλληλουχία της παραλλαγής. Τα ένζυμα HpyCH4IV και TfiI στοχεύουν και κόβουν και τα δύο, την προγονική αλληλουχία.

Εάν ένα άτομο είναι ομόζυγος για το φυσιολογικό ένζυμο και τα δύο αλληλόμορφα του (μητρικής και πατρικής προέλευσης) θα κοπούν σε δύο τμήματα διαφορετικού μήκους, επομένως στην ηλεκτροφόρηση των προϊόντων πέψης, περιμένουμε να δούμε δύο ζώνες (κάθε μία θα περιέχει τμήμα και του πατρικού και του μητρικού αλληλομόρφου). Εάν είναι ομόζυγος για τον πολυμορφισμό, το γονιδίωμα του δεν θα κοπεί και στην ηλεκτροφόρηση θα εμφανιστεί μία ζώνη, στο ύψος, που αντιστοιχεί στο μήκος του προϊόντος ενίσχυσης από την PCR. Τέλος εάν είναι ετερόζυγος (ένα αλληλόμορφο προγονικό και ένα που φέρει πολυμορφισμό), τότε μόνο το ένα αλληλόμορφο, το προγονικό, θα καταταμηθεί σε δύο μέρη (αντιστοιχεί σε 2 ζώνες στην ηλεκτροφόρηση), ενώ το άλλο θα μείνει άκοπο (1 ζώνη πιο ψηλά). Στην ηλεκτροφόρηση τότε, θα παρατηρήσουμε 3 ζώνες συνολικά.

Πρωτόκολλα κατάτμησης των rs3918290 και rs55886062

Δοκιμάστηκαν συνθήκες πέψης, που διέφεραν μεταξύ τους ως προς τον χρόνο επώασης και την ποσότητα του PCR προϊόντος που υπέστη κατάτμηση. Παρουσιάζονται παρακάτω τα πρωτόκολλα που καταλήξαμε.

▪ rs3918290

Αντιδραστήρια	Αρχική συγκέντρωση	Τελική συγκέντρωση	Ποσότητα (Vτελικό=25μl)
Προϊόν PCR	-	-	3 μl
CutSmart™ Buffer	10x	1x	2.5 μl
HpyCH4IV enzyme	10units/μl	5 units	0.5 μl
ddH2O	-	-	19 μl

Πίνακας 10 Πρωτόκολλο κατάτμησης των προϊόντων της PCR για τον πολυμορφισμό rs3918290

▪ rs55886062

Αντιδραστήρια	Αρχική συγκέντρωση	Τελική συγκέντρωση	Ποσότητα (Vτελικό=25μl)
Προϊόν PCR	-	-	3 μl
CutSmart™ Buffer	10x	1x	2.5 μl
TfI enzyme	10units/μl	5 units	0.5 μl
ddH2O	-	-	19 μl

Πίνακας 11 Πρωτόκολλο κατάτμησης των προϊόντων της PCR για τον πολυμορφισμό rs55886062

Τα δείγματα επωάζονται για 15min για τον rs3918290 στους 37°C και για 15min για τον rs55886062 στους 65°C, σε θερμαινόμενη πλάκα (Thermoblock Bio TDB-120, Biosan). Για τα δείγματα του rs3918290 ακολουθεί απενεργοποίηση του ενζύμου με αύξηση της θερμοκρασίας της πλάκας στους 65°C για 20min. Το ένζυμο του δεύτερου πολυμορφισμού δεν απαιτεί απενεργοποίηση. Χρησιμοποιήθηκε και ένας αρνητικός μάρτυρας (negative control) ο οποίος περιλαμβάνει όλα τα αντιδραστήρια, εκτός από το περιοριστικό ένζυμο, του οποίου η ποσότητα αντικαταστάθηκε με ddH₂O.

Ακολουθεί ηλεκτροφόρηση των προϊόντων πέψης σε πήκτωμα αγαρόζης 3,5% στα 100V για 1h σε θερμοκρασία δωματίου. Τέλος, το πήκτωμα τοποθετείται σε τράπεζα υπεριώδους ακτινοβολίας (UVP), ώστε να προσδιοριστούν οι γονότυποι.

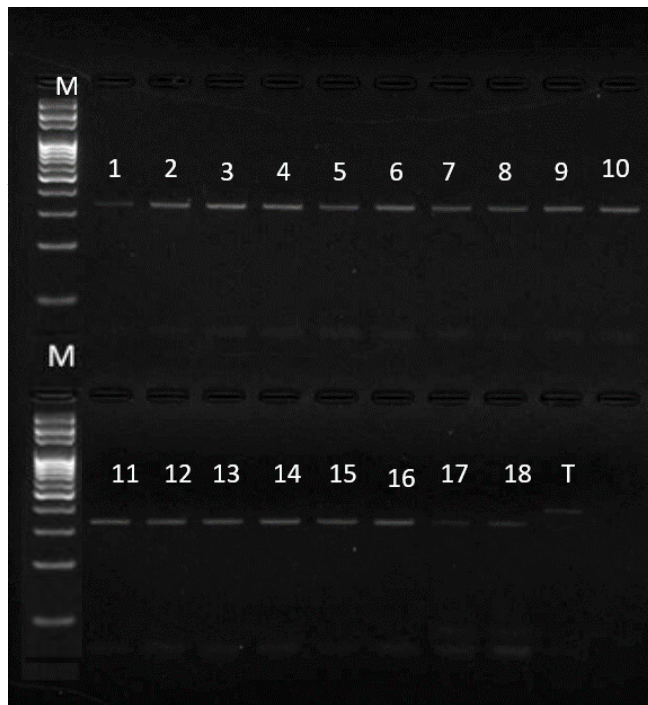
Πέψη με στόχο τον πολυμορφισμό rs3918290

Η γονοτύπηση πραγματοποιήθηκε με τη μέθοδο της κατάτμησης με το περιοριστικό ένζυμο *HpyCH4IV*. Το ένζυμο στο προγονικό αλληλόμορφο δίνει 2 προϊόντα, μήκους 317bp και 59bp, αναγνωρίζοντας την αλληλουχία:

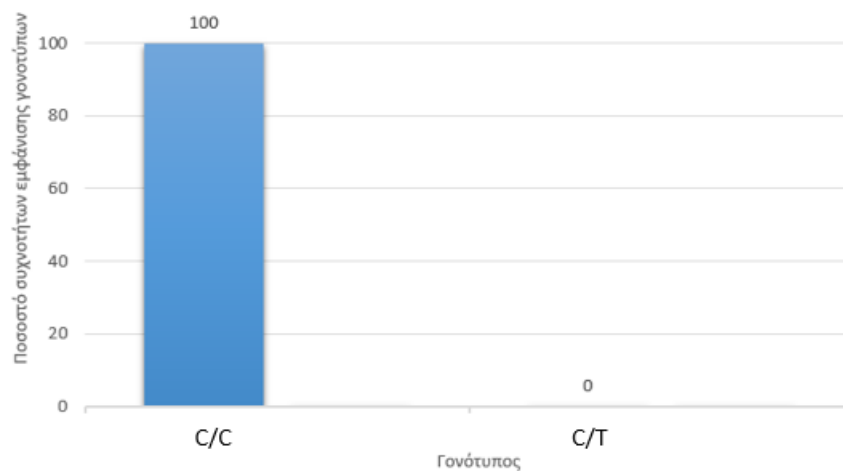


Η κυτοσίνη είναι η προγονική βάση (στον 5'→3' κλώνο). Εάν υπάρχει οποιαδήποτε άλλη βάση δεν πραγματοποιείται κατάτμηση.

Και στα 30 δείγματα, πήραμε 2 ζώνες στην ηλεκτροφόρηση, οπότε εξάγεται το συμπέρασμα πως όλα τα άτομα ήταν ομόζυγα για το φυσιολογικό αλληλόμορφο.



Εικόνα 12 Ηλεκτροφόρηση σε πήκτωμα αγαρόζης 3,5 % w/v των προϊόντων κατάτμησης για το μελετώμενο πολυμορφισμό στο γονίδιο *DPYD* με το περιοριστικό ένζυμο *HpyCH4IV*. M: μάρτυρας μοριακών μεγεθών (βήμα 100bp), T: αρνητικός μάρτυρας (δεν περιέχει ένζυμο πέψης), αρίθμηση 1 ως 18: ενδεικτικά τα δείγματα DNA που χρησιμοποιήθηκαν.



Πίνακας 12 Ποσοστό γονοτυπικών συχνοτήτων στο δείγμα μελέτης για τον rs3918290

Το 100% των δειγμάτων ($n=30$), στα οποία ελέγχθηκε ο γονότυπος, με την μέθοδο της κατάτμησης με περιοριστικό ένζυμο *HpyCH4IV*, ήταν ομόζυγα για το φυσιολογικό αλληλόμορφο.

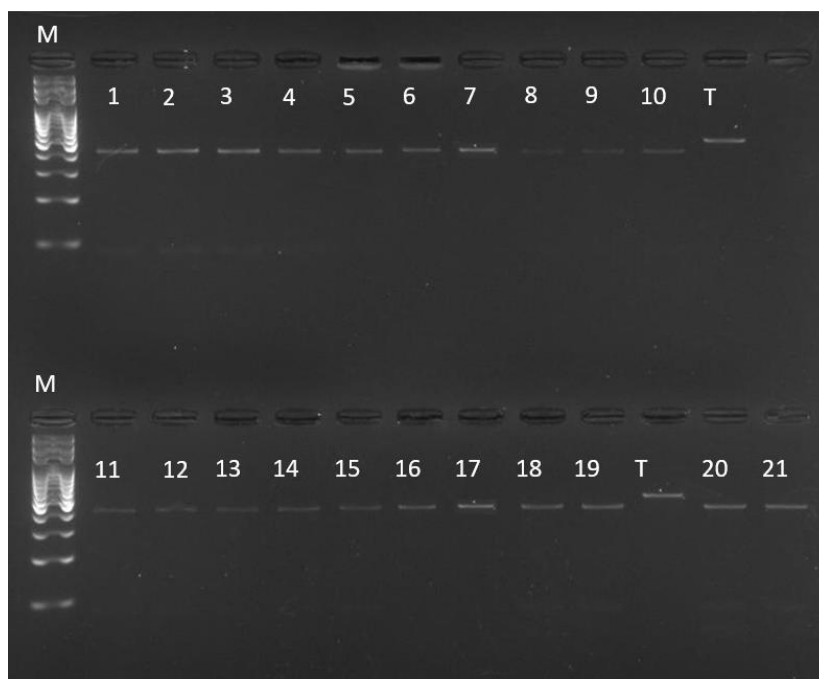
Πέψη με στόχο τον πολυμορφισμό rs55886062

Η γονοτύπηση πραγματοποιήθηκε με τη μέθοδο της κατάτμησης με το περιοριστικό ένζυμο *TfiI*. Το ένζυμο στο προγονικό αλληλόμορφο δίνει 2 προϊόντα, μήκους 393bp και 82bp, αναγνωρίζοντας την αλληλουχία:



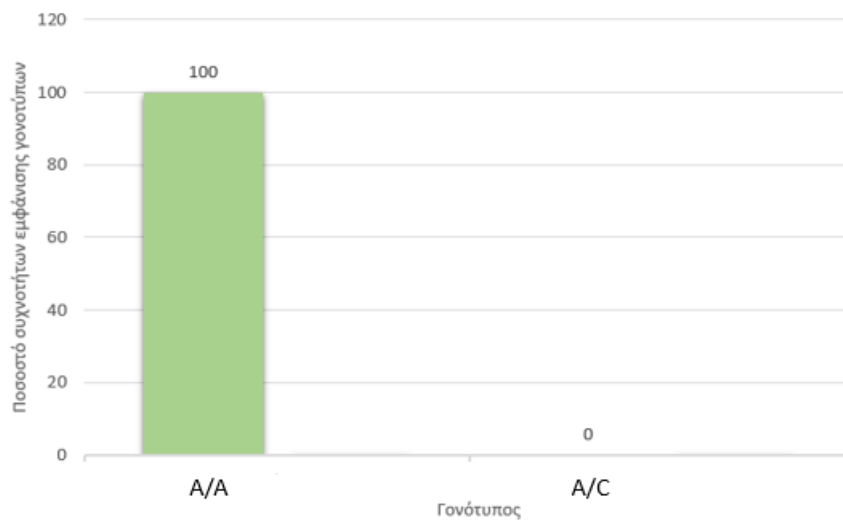
Το W μπορεί να είναι αδερίνη ή θυμίνη (αναγνωρίζει και τα δύο). Εάν υπάρχει η προγονική βάση αδερίνη (στον 5'→3' κλώνο), πραγματοποιείται κατάτμηση, εάν υπάρχει ο πολυμορφισμός, δηλαδή κυτοσίνη, δεν θα κοπεί.

Στα 30 δείγματα που δοκιμάστηκαν, στην ηλεκτροφόρηση, πήραμε 2 ζώνες. Επομένως το συμπέρασμα, που προκύπτει, είναι πως όλα οι ασθενείς ήταν ομόζυγοι για το φυσιολογικό.



Εικόνα 13 Ηλεκτροφόρηση σε πήκτωμα αгарόζης 3,5 % w/v των προϊόντων κατάτμησης για το μελετώμενο πολυμορφισμό στο γονίδιο *DPYD* με το περιοριστικό ένζυμο *TfiI*. M: μάρτυρας μοριακών μεγεθών (βήμα 100bp),

Τ: αρνητικός μάρτυρας (δεν περιέχει ένζυμο πέψης), αρίθμηση 1 ως 21: ενδεικτικά τα δείγματα DNA που χρησιμοποιήθηκαν.



Πίνακας 13 Ποσοστό γονοτυπικών συχνοτήτων στο δείγμα μελέτης για τον rs55886062

Το 100% των δειγμάτων (n=30), στα οποία ελέγχθηκε ο γονότυπος, με την μέθοδο της κατάτμησης με περιοριστικό ένζυμο TfiI, ήταν ομόζυγα για το φυσιολογικό αλληλόμορφο.

Κεφάλαιο 5: ΣΥΖΗΤΗΣΗ

Η μελέτη της δομής και της λειτουργίας του γονιδιώματος σε μοριακό επίπεδο, τα τελευταία χρόνια, αναδεικνύεται ολοένα και πιο σημαντική, όχι μόνο στην πρόγνωση και τη διάγνωση του καρκίνου, αλλά και στην παροχή εξατομικευμένης θεραπείας σε κάθε ασθενή. Η εξατομίκευση ενός θεραπευτικού σχήματος στοχεύει στην επιλογή του καταλληλότερου φαρμάκου, αλλά και στην προσαρμογή της δόσης, που θα φέρει τα βέλτιστα αποτελέσματα στην θεραπεία, με τις λιγότερες ανεπιθύμητες ενέργειες. Τα αποτελέσματα της θεραπείας και οι τοξικότητες που παρουσιάζουν τα φάρμακα οφείλονται σε φαρμακοκινητικές και στις φαρμακοδυναμικές διαφορές που οι ασθενείς παρουσιάζουν, αλληλεπιδράσεις με άλλα φάρμακα, την ηλικία, τις διατροφικές συνήθειες, το κάπνισμα, την κατανάλωση αλκοόλ, την ύπαρξη συννοσηροτήτων, την ηπατική λειτουργία, τη νεφρική λειτουργία και άλλα. Το πιο σημαντικό από όλα όμως,

είναι ότι ανακαλύπτονται συνεχώς γενετικοί παράγοντες που έχουν σοβαρό αντίκτυπο στην αποτελεσματικότητα και την τοξικότητα, που θα παρουσιάσει ένα φάρμακο. Αυτό το γεγονός, από μόνο του, υπογραμμίζει την σημαντικότητα της ανάγκης για την αξιοποίηση φαρμακογονιδιωματικών βιοδεικτών στη θεραπεία του καρκίνου.⁵⁴

Η φθοριουρακίλη είναι ένα αντικαρκινικό φάρμακο, χρησιμοποιείται, κατά κόρον, στη θεραπεία του γαστρικού και ορθοκολικού καρκίνου. Ανήκει στην κατηγορία των αντιμεταβολιτών, διότι αναστέλλει το βιοσυνθετικό μονοπάτι της θυμίνης, μπλοκάροντας το ένζυμο συνθάση του θυμιδυλικού και επιπλέον, ενσωματώνεται στο RNA. Έτσι, μπλοκάρει την ανάπτυξη του όγκου. Όταν η 5-FU χορηγηθεί, περίπου το 90% της δόσης απενεργοποιείται φυσιολογικά και αποβάλλεται από τον οργανισμό μέσω των ούρων. Το πρώτο βήμα στον καταβολισμό της 5-FU αναλαμβάνει το ένζυμο αφυδρογονάση της διυδροπυριμιδίνης-DPD, που την μετατρέπει στην μη δραστική της μορφή φθοριοδιυδροουρακίλη FDHU. Η υπόλοιπη ποσότητα του φαρμάκου, που δεν καταβολίζεται, υφίσταται ενζυμική ενεργοποίηση και έτσι η ουσία αποκτά κυτταροτοξική δράση.

Το ένζυμο DPD κωδικοποιείται από το γονίδιο *DPYD*. Επί του παρόντος υπάρχουν τέσσερις κλινικά αναγνωρισμένες, μη λειτουργικές παραλλαγές του *DPYD*. Πρόκειται για τους πολυμορφισμούς rs3918290 (ή *DPYD*2A*), rs55886062 (ή *DPYD*13*), rs75017182 (ή HarB3) και rs67376798 (ή D949V). Οι δύο πρώτοι πολυμορφισμοί φαίνεται να είναι εκείνοι με την μεγαλύτερη επίπτωση στην λειτουργικότητα του ενζύμου. Ο *DPYD*2A* επηρεάζει το μάτισμα του προϊόντος, καθώς κατά την ωρίμανση αφαιρείται ένα ολόκληρο εξώνιο. Ο *DPYD*13* πρόκειται για μία μη συνώνυμη μεταλλαγή, με αποτέλεσμα να υπάρχει ένα διαφορετικό αμινοξύ τελικά, στο ενεργό κέντρο του ενζύμου, που μειώνει σημαντικά την δραστικότητά του. Άτομα που φέρουν

στο γονιδιώμά τους κάποιον από αυτούς τους πολυμορφισμούς παρουσιάζουν αυξημένο ρίσκο να εμφανίσουν σοβαρή έως και θανατηφόρα τοξικότητα όταν λάβουν αντικαρκινική αγωγή με 5-FU. Ανάλογα με τον ποιο πολυμορφισμό φέρει ένα άτομο και εάν χαρακτηρίζεται από ομοζυγωτία της παραλλαγής αξιολογείται και επιλέγεται, το καταλληλότερο για αυτόν, θεραπευτικό σχήμα. Η εξατομίκευση της θεραπείας μπορεί να περιλαμβάνει είτε την μείωση της αρχικής δόσης κατά 25-50%, είτε και την επιλογή ενός εναλλακτικού φαρμάκου. Είναι σημαντικό να σημειωθεί ότι η απουσία αυτών των τεσσάρων πολυμορφισμών δεν ισοδυναμεί απαραίτητα με απουσία κινδύνου, καθώς το *DPYD* είναι εξαιρετικά πολυμορφικό και μη συνηθισμένες παραλλαγές μπορεί να οδηγήσουν σε εμφάνιση τοξικότητας.

Από τα παραπάνω, προκύπτει το συμπέρασμα ότι είναι επιτακτική η ανάγκη ενός προκαταρκτικού ελέγχου ανεπάρκειας του DPD, με μία έγκυρη, γρήγορη και οικονομική δοκιμή, για την αξιολόγηση της αποτελεσματικότητας της θεραπείας με 5-FU και η ασφάλεια των ασθενών που πρόκειται να την ακολουθήσουν. Παράλληλα, γεννιέται και το ερώτημα που αφορά την καλύτερη επιλογή δοκιμής ανεπάρκειας DPD. Πέρα από την ανάλυση του γονιδιώματος, υπάρχει και ο φαινοτυπικός έλεγχος ενός ατόμου. Πιο συγκεκριμένα, η μέτρηση της αναλογίας διυδροουρακίλης/ουρακίλης (UH2/U) στο πλάσμα με τη μέθοδο της υγρής χρωματογραφίας υψηλής πίεσης, μπορεί να αποτελέσει έμμεση μέτρηση της ενζυμικής δραστηριότητας του DPD. Μικρή τιμή του λόγου υποδηλώνει χαμηλό ρυθμό μετατροπής της U σε UH2 και επομένως, μειωμένη ενζυμική δραστηριότητα. Οι Launay et al. Το 2017 κατέδειξαν πώς η εκ των προτέρων έμμεση μέτρηση της δραστηριότητας του DPD με τον υπολογισμό αυτής της αναλογίας και η κατ' επέκταση προσαρμογή της δόσης, μπορεί να μειώσει την εμφάνιση τοξικοτήτων, διατηρώντας παράλληλα την αποτελεσματικότητα, σε ασθενείς που έλαβαν θεραπεία με 5-FU.^{55,56} Ο φαινοτυπικός έλεγχος θεωρητικά μπορεί να είναι

προτιμότερος, καθώς εντοπίζουν την ανεπάρκεια του ενζύμου ακόμη και σε άτομα που φέρουν πιο σπάνιους ή άγνωστους πολυμορφισμούς. Ωστόσο, ο de With et al. υπογραμμίζει ότι η U είναι δύσκολο να μετρηθεί με εγκυρότητα και το εύρος των τιμών αναφοράς ανάμεσα στα εργαστήρια μπορεί να διαφέρουν σημαντικά. Επιπλέον, καθώς ο προσδιορισμός του φαινότυπου βασίζεται σε μία αριθμητική τιμή, είναι μη χρήσιμος χωρίς επαρκή κλινική έρευνα που να κατηγοριοποιεί τους ασθενείς και να δίνεται η δυνατότητα προσαρμογής της δόσης. Η εγκυρότητα σε μια τέτοια κατηγοριοποίηση, θα είναι μικρότερη, σε ασθενείς που βρίσκονται κοντά στα όρια τιμών.⁵⁷ Τρεις μελέτες προσδιόρισαν το φαινότυπο DPD και τις τέσσερις κλινικά σημαντικές παραλλαγές του *DPYD*. Ωστόσο, η συσχέτιση μεταξύ U σε ασθενείς που φέρουν το αλληλόμορφο αγρίου τύπου και σε εκείνους που είχαν κάποια παραλλαγή του *DPYD*, φάνηκε να είναι αβέβαιη. Ο De With et al. διαπίστωσε ότι ο μέση τιμή της U διέφερε μεταξύ των ασθενών με παραλλαγές και εκείνων χωρίς (άγριος τύπος: 10.1 ng/ml, HapB3: 12.2 ng/ml, D949V: 14.6 ng/ml, *DPYD**2A: 16.8 ng/ml, *DPYD**13: 40.1 ng/ml).⁵⁷ Αντίθετα, ο Etienne-Grimaldi et al. ανέφερε ότι μόνο η παραλλαγή D949V συσχετίστηκε με αυξημένη [U].⁵⁸ Οι συγγραφείς, τελικά, ισχυρίστηκαν, ότι ο συνδυασμός ελέγχου γονότυπου και φαινοτύπου είναι προτιμότερος, από τη χρήση μόνο μιας μεθόδου δοκιμής. Η CPIC υπογραμμίζει ότι οι δοκιμές του φαινοτύπου δεν είναι ευρέως διαθέσιμες, ο μέσος όρος UH2/U ποικίλλει σημαντικά, μεταξύ των μελετών, περιορίζοντας την χρήση τους στην πράξη και αναφέρει πως αρκετές μελέτες δεν παρατηρούσαν ισχυρή συσχέτιση μεταξύ της αναλογίας UH2/U και των συγκεντρώσεων 5-FU στο πλάσμα.⁴⁰

Στα πλαίσια αυτής της εργασίας, παρουσιάζονται πρωτόκολλα ενίσχυσης PCR των δύο νουκλεοτιδικών περιοχών, που εμπεριέχουν τους μελετώμενους πολυμορφισμούς, rs3918290 και rs55886062, αντίστοιχα. Επιπροσθέτως, παρατίθενται και δύο πρωτόκολλα γονοτυπικού προσδιορισμού με την μέθοδο της κατάτμησης. με

περιοριστικά ένζυμα, ειδικά για τον κάθε πολυμορφισμό. Κρίνεται απαραίτητη η περαιτέρω έρευνα σε μεγαλύτερο αριθμό δειγμάτων, από διαφορετικές πληθυσμιακές ομάδες και με άλλες τεχνικές γονοτύπησης, όπως η αλληλούχηση κατά Sanger, η οποία είναι μία πρότυπη εργαστηριακή μέθοδος αναφοράς.

Τέλος, ορισμένες τακτικές ελέγχου τοξικότητας στην 5-FU αναφέρουν επίσης δοκιμές για άλλες παραλλαγές άλλων γονιδίων, όπως το *TYMS*, που κωδικοποιεί την συνθάση του θυμιδικού, της οποίας τη δράση αναστέλλει η φθοριοουρακίλη. Μέχρι σήμερα, η κλινική χρησιμότητα αυτών των γονοτύπων δεν είναι σαφής και οι στρατηγικές πρόβλεψης της δόσης δεν έχουν εφαρμοστεί με επιτυχία ακόμη.⁵⁹ Επομένως, κρίνεται αναγκαία η διεξαγωγή συντονισμένων μελετών μεγαλύτερης κλίμακας, με σκοπό την αποσαφήνιση όσων αναφέρθηκαν και την βελτιστοποίηση των εξατομικευμένων θεραπευτικών σχημάτων.

Συνοψίζοντας, η ανάλυση του γονότυπου είναι μία απλή και γνωστή μέθοδος, με την οποία, οι κλινικοί γιατροί εύκολα μπορούν να εξάγουν συμπεράσματα, σχετικά με την κατάλληλη δόση, που πρέπει ο εκάστοτε ασθενής να λάβει. Στηρίζεται σε ένα μεγάλο εύρος κλινικών δοκιμών και είναι οικονομική και γρήγορη μέθοδος. Δεν επηρεάζεται από παράγοντες όπως η κατανάλωση φαγητού, ο κιρκάδιος ρυθμός και η λειτουργία του ήπατος και των νεφρών. Ωστόσο, με την γονοτύπηση εξετάζονται οι μέχρι τώρα γνωστές παραλλαγές, των οποίων η συχνότητα εμφάνισης αλλάζει ανάλογα με την καταγωγή. Τέλος, δεν είναι σαφώς καθορισμένη η δόση που θα λάβει ένας ασθενής που φέρει και άλλες παραλλαγές και σε άλλα γονίδια που εμπλέκονται στο μηχανισμό δράσης του ενζύμου και επηρεάζουν κατ' επέκταση την απόκριση στη φαρμακευτική αγωγή.⁶⁰ Η φαρμακογενετική λοιπόν αποτελεί ένα επιπρόσθετο εργαλείο στην κλινική πρακτική. Η διενέργεια γονοτυπικής εξέτασης συνδυαστικά με τη θεραπευτική

παρακολούθηση της 5'FU, συμβάλλουν στη βέλτιστη θεραπευτική και ασφαλή προσαρμογή της χορηγούμενης δόσης, συνεπώς και στην εξατομίκευση της θεραπείας κάθε ασθενούς.

ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

1. Heber, D., Blackburn, G.L., Liang V.W.G., Milner J. *Nutritional Oncology*. 2nd ed. Elsevier; 2006.
2. <https://www.cancer.gov/about-cancer/understanding/what-is-cancer>.
3. Bray F, Ferlay J, Soerjomataram I, Siegel RL, Torre LA, Jemal A. Global cancer statistics 2018: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries. *CA Cancer J Clin*. 2018;68(6):394-424. doi:10.3322/caac.21492
4. Center M SR and JA. Global Cancer Facts and Figures 2010. American Cancer Society.
5. <https://gco.iarc.fr/today/data/factsheets/populations/900- world-fact-sheets.pdf>.
6. Centelles JJ. General Aspects of Colorectal Cancer. *ISRN Oncol*. 2012;2012:1-19. doi:10.5402/2012/139268
7. Recio-Boiles A CB. *Colon Cancer*. StatPearls; 2021. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK470380>
8. Hossain MS, Karuniawati H, Jairoun AA, et al. Colorectal Cancer: A Review of Carcinogenesis, Global Epidemiology, Current Challenges, Risk Factors, Preventive and Treatment Strategies. *Cancers (Basel)*. 2022;14(7):1732. doi:10.3390/cancers14071732
9. Jensen LF, Hvidberg L, Pedersen AF, Vedsted P. Symptom attributions in patients with colorectal cancer. *BMC Fam Pract*. 2015;16(1):115. doi:10.1186/s12875-015-0315-9
10. Alzahrani S, Al Doghaither H, Al-Ghafari A. General insight into cancer: An overview of colorectal cancer (Review). *Mol Clin Oncol*. 2021;15(6):271. doi:10.3892/mco.2021.2433
11. Fleming M, Ravula S, Tatishchev SF, Wang HL. Colorectal carcinoma: Pathologic aspects. *J Gastrointest Oncol*. 2012;3(3):153-173. doi:10.3978/j.issn.2078-6891.2012.030
12. Hugén N, van Beek JJP, de Wilt JHW, Nagtegaal ID. Insight into Mucinous Colorectal Carcinoma: Clues from Etiology. *Ann Surg Oncol*. 2014;21(9):2963-2970. doi:10.1245/s10434-014-3706-6
13. Petrelli F, Tomasello G, Borgonovo K, et al. Prognostic Survival Associated With Left-Sided vs Right-Sided Colon Cancer. *JAMA Oncol*. 2017;3(2):211. doi:10.1001/jamaoncol.2016.4227
14. Mármol I, Sánchez-de-Diego C, Pradilla Dieste A, Cerrada E, Rodríguez Yoldi M. Colorectal Carcinoma: A General Overview and Future Perspectives in Colorectal Cancer. *Int J Mol Sci*. 2017;18(1):197. doi:10.3390/ijms18010197
15. Rawla P, Sunkara T, Barsouk A. Epidemiology of colorectal cancer: incidence, mortality, survival, and risk factors. *Gastroenterol Rev*. 2019;14(2):89-103. doi:10.5114/pg.2018.81072
16. Hagggar F, Boushey R. Colorectal Cancer Epidemiology: Incidence, Mortality, Survival, and Risk Factors. *Clin Colon Rectal Surg*. 2009;22(04):191-197.

doi:10.1055/s-0029-1242458

17. Van Cutsem E, Cervantes A, Adam R, et al. ESMO consensus guidelines for the management of patients with metastatic colorectal cancer. *Ann Oncol*. 2016;27(8):1386-1422. doi:10.1093/annonc/mdw235
18. Mohammadian M, Zeynali S, Azarbaijani A, Khadem Ansari M, Kheradmand F. Cytotoxic effects of the newly-developed chemotherapeutic agents 17-AAG in combination with oxaliplatin and capecitabine in colorectal cancer cell lines. *Res Pharm Sci*. 2017;12(6):517. doi:10.4103/1735-5362.217432
19. Lynch HT, Grady W, Suriano G, Huntsman D. Gastric cancer: New genetic developments. *J Surg Oncol*. 2005;90(3):114-133. doi:10.1002/jso.20214
20. Balakrishnan M, George R, Sharma A, Graham DY. Changing Trends in Stomach Cancer Throughout the World. *Curr Gastroenterol Rep*. 2017;19(8):36. doi:10.1007/s11894-017-0575-8
21. Boland CR, Yurgelun MB. Historical Perspective on Familial Gastric Cancer. *Cell Mol Gastroenterol Hepatol*. 2017;3(2):192-200. doi:10.1016/j.jcmgh.2016.12.003
22. Karimi P, Islami F, Anandasabapathy S, Freedman ND, Kamangar F. Gastric Cancer: Descriptive Epidemiology, Risk Factors, Screening, and Prevention. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev*. 2014;23(5):700-713. doi:10.1158/1055-9965.EPI-13-1057
23. Rawla P, Barsouk A. Epidemiology of gastric cancer: global trends, risk factors and prevention. *Gastroenterol Rev*. 2019;14(1):26-38. doi:10.5114/pg.2018.80001
24. J. M.BERG, J. L. TYMOCZKO GJG& LS. *Biochemistry*. 8th ed. Palgrave MacMillan; 2015.
25. Karen Whalen, Richard Finkel TAP. *Pharmacology*. 6th ed. Lippincott; 2018.
26. Parker JB, Stivers JT. Dynamics of Uracil and 5-Fluorouracil in DNA. *Biochemistry*. 2011;50(5):612-617. doi:10.1021/bi101536k
27. Merloni F, Ranallo N, Scortichini L, Giampieri R, Berardi R. Tailored therapy in patients treated with fluoropyrimidines: focus on the role of dihydropyrimidine dehydrogenase. *Cancer Drug Resist*. Published online 2019. doi:10.20517/cdr.2018.006
28. Palmirotta R, Lovero D, Delacour H, Le Roy A, Cremades S, Silvestris F. Rare Dihydropyrimidine Dehydrogenase Variants and Toxicity by Fluoropyrimidines: A Case Report. *Front Oncol*. 2019;9. doi:10.3389/fonc.2019.00139
29. Longley DB, Harkin DP, Johnston PG. 5-Fluorouracil: mechanisms of action and clinical strategies. *Nat Rev Cancer*. 2003;3(5):330-338. doi:10.1038/nrc1074
30. Thomas HR, Ezzeldin HH, Guarcello V, Mattison LK, Fridley BL, Diasio RB. Genetic regulation of dihydropyrimidinase and its possible implication in altered uracil catabolism. *Pharmacogenet Genomics*. 2007;17(11):973-987. doi:10.1097/FPC.0b013e3282f01788
31. Yokoi K, Nakajima Y, Matsuoka H, et al. Impact of DPYD , DPYS , and UPB1 gene variations on severe drug-related toxicity in patients with cancer. *Cancer Sci*. 2020;111(9):3359-3366. doi:10.1111/cas.14553
32. Hagmann W, Jesnowski R, Faissner R, Guo C, Löhr JM. ATP-Binding Cassette C Transporters in Human Pancreatic Carcinoma Cell Lines. *Pancreatology*. 2009;9(1-2):136-144. doi:10.1159/000178884

33. Kobayashi Y, Ohshiro N, Sakai R, Ohbayashi M, Kohyama N, Yamamoto T. Transport mechanism and substrate specificity of human organic anion transporter 2 (hOat2 [SLC22A7]). *J Pharm Pharmacol*. 2010;57(5):573-578. doi:10.1211/0022357055966
34. Farrell JJ, Elsaleh H, Garcia M, et al. Human Equilibrative Nucleoside Transporter 1 Levels Predict Response to Gemcitabine in Patients With Pancreatic Cancer. *Gastroenterology*. 2009;136(1):187-195. doi:10.1053/j.gastro.2008.09.067
35. Lorient M-A, Ciccolini J, Thomas F, et al. Dépistage du déficit en dihydropyrimidine déshydrogénase (DPD) et sécurisation des chimiothérapies à base de fluoropyrimidines : mise au point et recommandations nationales du GPCO-Unicancer et du RNPgX. *Bull Cancer*. 2018;105(4):397-407. doi:10.1016/j.bulcan.2018.02.001
36. Siddiqui NS, Purvey S, Hamal R, Zhang L, Diasio RB, Saif WM. Dihydropyrimidine dehydrogenase gene (DPYD) polymorphism among pts with 5-FU/capecitabine (CAP)-related adverse events (AEs): Experience of 2 decades. *J Clin Oncol*. 2018;36(15_suppl):2576-2576. doi:10.1200/JCO.2018.36.15_suppl.2576
37. OMIM. [https://www.omim.org/entry/612779?search=%22dpd gene%22&highlight=%22dpd gene%22#17](https://www.omim.org/entry/612779?search=%22dpd%20gene%22&highlight=%22dpd%20gene%22#17)
38. NCBI. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/1806#gene-expression>
39. Shastry BS. SNPs: Impact on Gene Function and Phenotype. In: ; 2009:3-22. doi:10.1007/978-1-60327-411-1_1
40. Amstutz U, Henricks LM, Offer SM, et al. Clinical Pharmacogenetics Implementation Consortium (CPIC) Guideline for Dihydropyrimidine Dehydrogenase Genotype and Fluoropyrimidine Dosing: 2017 Update. *Clin Pharmacol Ther*. 2018;103(2):210-216. doi:10.1002/cpt.911
41. <https://www.snpedia.com/index.php/Rs3918290>.
42. Wei X, McLeod HL, McMurrough J, Gonzalez FJ, Fernandez-Salguero P. Molecular basis of the human dihydropyrimidine dehydrogenase deficiency and 5-fluorouracil toxicity. *J Clin Invest*. 1996;98(3):610-615. doi:10.1172/JCI118830
43. Vreken P, van Kuilenburg ABP, Meinsma R, Beemer FA, Duran M, van Gennip AH. Dihydropyrimidine dehydrogenase deficiency: A novel mutation and expression of missense mutations in E. coli. *J Inherit Metab Dis*. 1998;21(3):276-279. doi:10.1023/A:1005380525218
44. <https://www.pharmgkb.org/variant/PA166153888>.
45. Loganayagam A, Arenas-Hernandez M, Fairbanks L, Ross P, Sanderson JD, Marinaki AM. The contribution of deleterious DPYD gene sequence variants to fluoropyrimidine toxicity in British cancer patients. *Cancer Chemother Pharmacol*. 2010;65(2):403-406. doi:10.1007/s00280-009-1147-x
46. Offer SM, Wegner NJ, Fossum C, Wang K, Diasio RB. Phenotypic Profiling of DPYD Variations Relevant to 5-Fluorouracil Sensitivity Using Real-time Cellular Analysis and In Vitro Measurement of Enzyme Activity. *Cancer Res*. 2013;73(6):1958-1968. doi:10.1158/0008-5472.CAN-12-3858
47. Johnson J, Weitzel K. Advancing Pharmacogenomics as a Component of Precision Medicine: How, Where, and Who? *Clin Pharmacol Ther*. 2016;99(2):154-156. doi:10.1002/cpt.273
48. Kalow W. Pharmacogenomics: Historical Perspective and Current Status. In:

- Pharmacogenomics*. Humana Press; :003-016. doi:10.1385/1-59259-957-5:003
49. Nakatani K, Nobori T. [Pharmacogenomics]. *Rinsho Byori*. 2013;61(11):1018-1025. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24450107>
 50. Cascorbi I, Tyndale R. Progress in Pharmacogenomics: Bridging the Gap From Research to Practice. *Clin Pharmacol Ther*. 2014;95(3):231-235. doi:10.1038/clpt.2013.235
 51. Sanoudou D. Editorial [Hot Topic: Pharmacogenomics: Achievements, Challenges and Prospects, for Patients, Pharmaceutical Industries and Healthcare Systems (Guest Editor: Despina Sanoudou)]. *Curr Pharm Des*. 2010;16(20):2182-2183. doi:10.2174/138161210791792840
 52. Gillis NK, Patel JN, Innocenti F. Clinical Implementation of Germ Line Cancer Pharmacogenetic Variants During the Next-Generation Sequencing Era. *Clin Pharmacol Ther*. 2014;95(3):269-280. doi:10.1038/clpt.2013.214
 53. Παλαιολόγου, Δ., Κατσαρέλη, Ε., & Γ. Π. Εργαστηριακές Ασκήσεις Γενετικής Του Ανθρώπου. In: *Εργαστηριακές Ασκήσεις Γενετικής Του Ανθρώπου*. ; 2013:84.
 54. Bertholee D, Maring JG, van Kuilenburg ABP. Genotypes Affecting the Pharmacokinetics of Anticancer Drugs. *Clin Pharmacokinet*. 2017;56(4):317-337. doi:10.1007/s40262-016-0450-z
 55. Launay M, Ciccolini J, Rodallec A, et al. Upfront DPD Deficiency Detection to Secure 5-FU Administration: Part 1 – Where Do We Stand? *Clin Cancer Drugs*. 2018;4(2). doi:10.2174/2212697X04666170531080625
 56. Launay M, Dahan L, Duval M, et al. Beating the odds: efficacy and toxicity of dihydropyrimidine dehydrogenase-driven adaptive dosing of 5-FU in patients with digestive cancer. *Br J Clin Pharmacol*. 2016;81(1):124-130. doi:10.1111/bcp.12790
 57. de With M, Knikman J, de Man FM, et al. Dihydropyrimidine Dehydrogenase Phenotyping Using Pretreatment Uracil: A Note of Caution Based on a Large Prospective Clinical Study. *Clin Pharmacol Ther*. 2022;112(1):62-68. doi:10.1002/cpt.2608
 58. Etienne-Grimaldi M-C, Boyer J-C, Beroud C, et al. New advances in DPYD genotype and risk of severe toxicity under capecitabine. Galli A, ed. *PLoS One*. 2017;12(5):e0175998. doi:10.1371/journal.pone.0175998
 59. Cevik M, Namal E, Sener ND, et al. Investigation of DPYD , MTHFR and TYMS polymorphisms on 5-fluorouracil related toxicities in colorectal cancer. *Per Med*. 2022;19(5):435-444. doi:10.2217/pme-2021-0047
 60. Paulsen NH, Vojdeman F, Andersen SE, et al. DPYD genotyping and dihydropyrimidine dehydrogenase (DPD) phenotyping in clinical oncology. A clinically focused minireview. *Basic Clin Pharmacol Toxicol*. 2022;131(5):325-346. doi:10.1111/bcpt.13782