

ELTE Kémia

Intézeti Tudományos Diákkör



ELTE
EÖTVÖS LORÁND
TUDOMÁNYEGYETEM

2024/2025

TDK Dolgozat

Dihidropirimidin-dehidrogenáz enzim radioizotópos aktivitás mérésének fejlesztése kemoterápiában részesülő daganatos betegeknél prognosztikai célból

Bogya Benedek

Eötvös Loránd Tudományegyetem

Kémia BSc III. év



Témavezetők:

Dr. Ditrói Tamás, vegyész

Országos Onkológiai Intézet, Molekuláris Immunológia és Toxikológia Osztály

Prof. Dr. Nagy Péter, osztályvezető, tudományos igazgató

Országos Onkológiai Intézet, Molekuláris Immunológia és Toxikológia Osztály

2024

Tartalomjegyzék:

1. Bevezetés	3
1.1. Kemoterápia	3
1.2. 5-fluorouracil	4
1.2.1. 5-FU hatásmechanizmusa	4
1.2.2. 5-FU katabolizmusa	6
1.3. Dihidropirimidin-dehidrogenáz enzim	6
1.4. Dihidropirimidin-dehidrogenáz deficiencia	7
2. Irodalmi áttekintés	8
2.1. Genotípusos tesztek	8
2.2. Fenotípusos tesztek	9
2.2.1. Orálisan alkalmazott uracil farmakokinetikája	10
2.2.2. 2- ¹³ C-uracil kilégzési teszt	10
2.2.3. Uracil (Ura) és dihidrouracil (UH ₂) meghatározás nyálból	10
2.2.4. DPD enzimaktivitásának direkt meghatározása	11
2.4. Célkitűzés	12
3. Alkalmazott módszerek	13
3.1. Anyagok	13
3.2. Mintavétel	13
3.3. Limfocita szeparálás	13
3.4. Sejtfeltárás	16
3.5. Enzimreakció	16
3.6. Elválasztás és detektálás	17
3.7. Sejtfeltérési módszerek	18
3.8. Fehérjemérés	19
3.9. Áramlási citometria	20
4. Eredmények és értékelésük	22
4.1. Az eluens összetétele és az áramlási sebesség	22
4.2. Enzimreakció inkubálási ideje	26
4.3. Szubsztrát koncentráció hatása	28
4.4. Sejtfeltérési módszerek	29
4.5. Limfociták szeparálása	31
5. Összefoglalás	38
6. Köszönetnyilvánítás	40
7. Irodalomjegyzék	41

Rövidítések:

5FU	– 5-fluorouracil
ADC	– adenocarcinoma, mirigyhámsejt eredetű malignus elváltozás
BCA	– bicinchoninic acid, bicinkoninsav
CH ₂ THF	– metilén-tetrahidrofolát
CHAPS	– 3- ((3-kolamidopropil) - dimetil-ammónio) -1-propánszulfonát
DHFU	– 5,6-dihidro-5-fluorouracil
DNS	– deoxiribonukleinsav
DPD	– dihidropirimidin-dehidrogenáz enzim
dTMP	– dezoxitimidin-monofoszfát
DTT	– ditiotritol
dTTP	– dezoxitimidin-monofoszfát
dUMP	– dezoxiuridin-monofoszfát
EDTA	– ethylenediaminetetraacetic acid, etiléndiamin – tetraecetsav
ELISA	– Enzyme-linked Immunosorbent Assay, enzimhez kötött immunoszorbens vizsgálat
EMA	– European Medicines Agency, Európai Gyógyszerügynökség
FBAL	– α -fluor- β -alanin
FdUMP	– 5-fluor-2'-deoksiuridin-5'-monofoszfát
FdUTP	– 5-fluor-2'-deoksiuridin-5'-trifoszfát
FSC	– Előre irányuló fényszórás (forward light scattering)
FUPA	– α -fluor- β -ureidopropionsav
FUTP	– fluorouridin-trifoszfát
HPLC	– High Performance Liquid Chromatography, nagyteljesítményű folyadékkromatográfia
mRNS	– messenger ribonukleinsav, hírvivő ribonukleinsav
NADPH	– nikotinamid-adenin-dinukleotid-foszfát redukált formája
PBMC	– Peripheral Blood Mononuclear Cells, perifériás mononukleáris sejtek
PBS	– phosphate-buffered saline, foszfáttal pufferelt sóoldat
PCR	– Polymerase chain reaction, Polimeráz láncreakció
RIPA	– radioimmunoprecipitation assay buffer, radioimmunprecipitációs puffer
RNS	– ribonukleinsav
RP-HPLC	– Reversed -phase high Performance Liquid Chromatography, fordított fázisú HPLC
SCC	– Squamous Cell Carcinoma, laphámsejt eredetű malignus elváltozás
SSC	– Oldalirányú fényszórás (Side light scatter)
TBAH-SO ₄	– tetrabutylammónium-hidrogénszulfát
TS	– timidilát szintáz
UH ₂	– 5,6-dihidouracil
Ura	– uracil
UTP	– uridin-trifoszfát
VVT	– vörösvértest

1. Bevezetés

Malignus, azaz a rosszindulatú daganatok kialakulásához a normális sejtosztódás és a sejtpusztulás közötti bonyolult, szabályozott egyensúly felborulása vezet [1]. Molekuláris értelemben a daganatok kialakulásáért a sejtmagban megtalálható örökítőanyag, a DNS bizonyos szakaszaiban bekövetkezett mutációk állnak. Életünk során folyamatosan keletkeznek ilyen génhibák, viszont az egészséges szervezetben genetikai hibajavító mechanizmusok működnek, amelyek kijavítják a mutációkat, vagy korlátozzák a mutáció öröklődését programozott sejthalál (apoptózis) megvalósításával. A különböző rákos sejtekre jellemző, hogy rezisztensek az apoptózisra, korlátlan osztódó képességgel rendelkeznek, saját érrendszert tudnak kialakítani, a környező szövetekbe is be tudnak hatolni, illetve áttétek (metasztázisok) képzésre is hajlamosak, azaz áttérjedhetnek más szervekre is [2]. A malignus betegségek kialakulásához számos tényező járul hozzá, mint a környezeti hatások, fertőzések és a genetikai hajlam. A daganatos betegségek kezelésére többféle módszer is kialakult, ilyenek a sebészeti megoldások, amikor műtéti úton távolítják el az érintett szöveteket, szerveket vagy a sugárkezelés, amely során valamilyen sugárforrás alkalmazásával pusztítják el a sejteket és a gyógyszeres kezelések, azaz a kemoterápiák, valamint újabban az immunterápiák alkalmazása kezd elterjedni. A célzott terápiák során a genetikai úton vagy fenotípus alapján molekuláris biológiai módszerekkel azonosított tumortípus kezelésre egy szelektív kemoterápiás szert alkalmaznak, amely arra a sejttípusra jellemző túlélési mechanizmust gátolja, így a kezelés mellékhatásai jelentősen csökkenthetők, pl.: HER2+ emlőtumorknál [1]. Napjaink egyik legmodernebb, személyre szabott kezelési eljárása az immunterápia, amelyért 2018-ban orvosi Nobel díjat kaptak felfedezői. Immunterápia során a beteg saját immunrendszerét használják fel a rákos sejtek ellen úgy, hogy azokat aktiválva, stimulálva képessé teszik a betegben lévő rákos sejtek felismerésére és megtámadására.

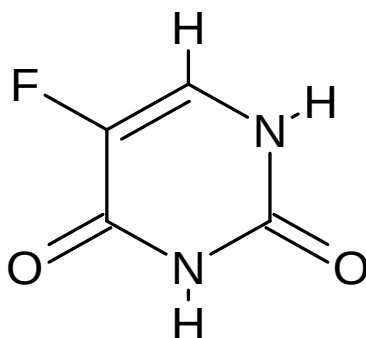
1.1. Kemoterápia

A kemoterápia a daganatellenes kezelések közé tartozik, mely során kemoterápiás gyógyszereket juttatnak be a betegbe intravénásan vagy intraartériásan [2]. A kezelés célja lehet a műtét előtt a tumor méretének a csökkentése és az alacsonyabb stádiumba hozatala (neoadjuváns kezelés), sebészeti beavatkozás után a keringésben lévő daganatos sejtek, mikrometasztázisok elpusztítása (adjuváns kezelés), vagy sugárterápiával együtt alkalmazva az érzékenység fokozása (radiokemoterápia). Ezek a kemoterápiás szerek sejtmérgek, azaz citotoxikus és citosztatikus tulajdonsággal rendelkeznek, így szelektíven képesek pusztítani az összes gyorsan osztódó sejtet, beleértve a rákos sejteket is. Ezen tulajdonságból ered ezeknek a hatóanyagoknak a mellékhatása is, mivel az összes egészséges viszonylag gyorsan osztódó sejtet is

károsítják. Ezért a kemoterápiás kezelés alatt hányinger, hányás, hasmenés, vérképromlás, hajhullás, rossz közérzet vagy bél-és szájnyálkahártyagyulladás jelenthet meg.

1. 2. 5-fluorouracil

Széles körben alkalmaznak fluoropirimidin alapú kemoterápiás gyógyszereket, mint az 5-fluorouracil (5-FU), capecitabin vagy a tegafur colorectalis, azaz vastag- és végbéldaganatok, gyomor- és bélrendszeridaganatok, hasnyálmirigyrák, nyelőcsőrák, valamint metasztatikus emlőtumorsejtek kezelésére [3]. Évente becslések szerint világszerte több mint kétfélmillió beteg részesül fluoropirimidin alapú gyógyszeres kezelésben és 30-40%-át érintik a toxikus tünetek.



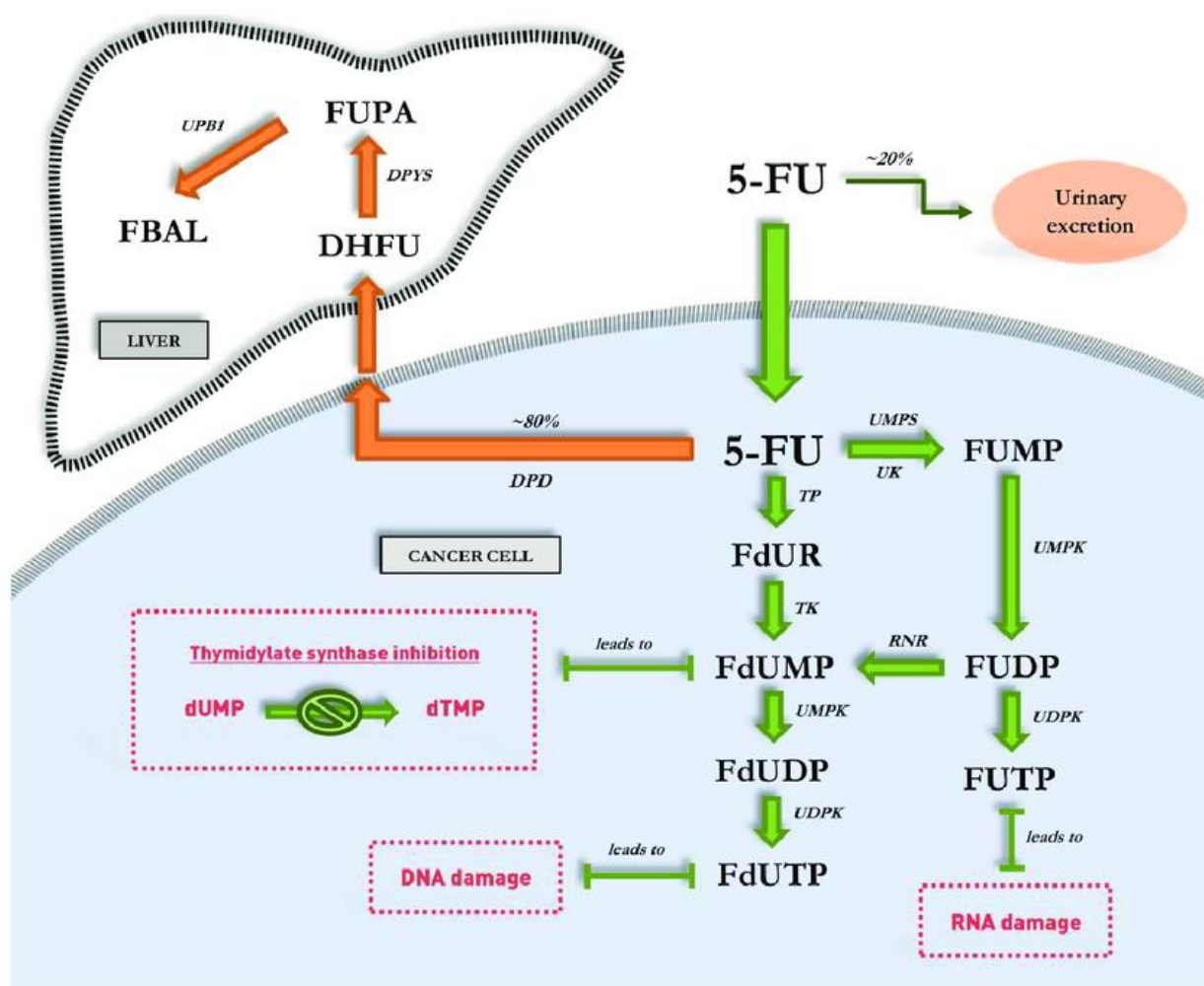
1. ábra – 5-fluorouracil

Az 5-FU a pirimidin alapú kemoterápiás gyógyszerek közé sorolható, ami hatását tekintve citosztatikum, ami azt jelenti, hogy ez a vegyület megzavarja a sejtciklust, ezáltal megakadályozva a sejtosztódást (sejtproliferációt). Az 5-FU az egyik legszélesebb körben alkalmazott kemoterápiás készítmény, amit sikeresen alkalmaznak többek között fej-nyaki laphámsejtes karcinóma (Squamous Cell Carcinoma - SCC), gastrointestinalis SCC és adenokarcinóma (ADC – mirigyhámsejt eredetű daganatos betegség), valamint a méhnyak SCC-re. Az 5-FU egy uracil analóg, amelynél C-5 pozícióban egy fluor található, ezért az 5-FU az uracil transzportfolyamatához analóg módon könnyen eljuthat a célsejtekbe.

1.2.1. 5-FU hatásmechanizmusa

A hatásmechanizmusát figyelembe véve ez a kemoterápia az antimetabolitok családjába tartozik, mivel gátolja a DNS és RNS szintézisét egy esszenciális enzim gátlásán keresztül, valamint timin/uracil analóggént képes beépülni az RNS és a DNS szálba is [3,4]. Az 5-FU átalakulhat enzimkatalitikusan a 2. ábra szerint számos aktív metabolitná, mint a 5-fluoro-2'-deoxyuridin-5'-trifoszfát (FdUTP), amely

bekapcsolódhat a DNS-be a dezoxitimidin-trifoszfát (dTTP) helyett; fluorouridin-trifoszfát (FUTP), ami pedig bekapcsolódhat az RNS-be az uridin-trifoszfát (UTP) helyett. Az FUTP a beékelődésével megváltoztatja az RNS szerkezetét és működését, míg a FdUTP-nek és FdUMP-nek DNS károsító hatása van. Az FdUMP gátolja a timidilát szintáz (TS) enzimet, ami egy DNS előállításához nagyon fontos dezoxitimidin-monofoszfátot (dTMP) állít elő a deoxiuridin-monofoszfátból (dUMP). Mechanizmusát tekintve egy FdUMP, metilén-tetrahidrofolát (CH₂THF), és TS hármas enzimkomplex jön létre, ami akadályozza a dUMP szubsztrát kötődését a TS nukleotid kötőhelyéhez a FdUMP-val való versengés révén. Ezen hatások fejtik ki a gyógyszer citotoxikus és citosztatikus hatását, tehát egyrészt mérgező hatást fejtenek ki a sejtekre, ezáltal indukálják a sejthalált, másrészt a gyorsan osztódó sejtek szaporodását is gátolják.



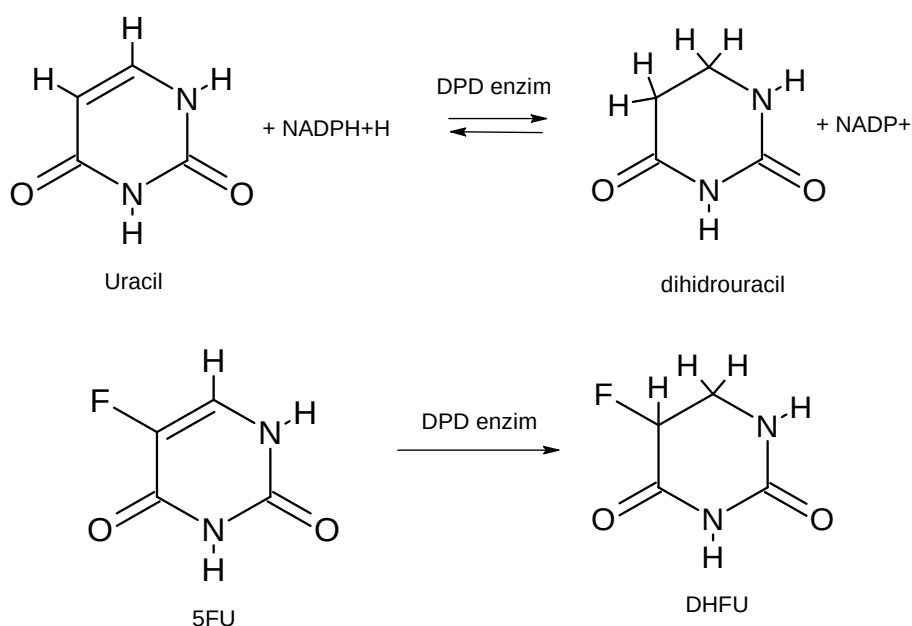
2. ábra – 5-FU metabolizmusá sejtben és májban
eredeti ábra: Azwar,et al., *Biology* 2010 [23]

1.2.2. 5-FU katabolizmusa

Az 5-FU első lebontó enzime a dihidropirimidin-dehidrogenáz (DPD), amely a folyamat sebességmeghatározó enzime és megtalálható a bélben, bélnyálkahártyában, a vér perifériás mononukleáris sejtjeiben (Peripheral Blood Mononuclear Cells - PBMC) és számos más szövet sejtjeiben, de a legjelentősebb lebontás a máj szöveteiben valósul meg. Az enzim katalitikus működése során DHFU, azaz 5,6-dihidro-5-fluorouracil keletkezik NADPH jelenlétében. Ezt követően ez a redukált termék hidrolizál a dihidropirimidináz enzim hatására α -fluor- β -ureidopropionsavvá (FUPA), majd a β -ureidopropionáz enzim hatására α -fluor- β -alaninná (FBAL) alakul, ammónia és szén-dioxid mellett a **2. ábra** szerint. [3,4]

1.3. Dihidropirimidin-dehidrogenáz enzim

A DPD enzim egy DPYD gén által kódolt fehérje, ami nagyon fontos szerepet játszik az RNS-ben található uracil és a DNS-ben található timin lebontásában [5]. Ez az enzim az oxidoreduktázok közé sorolható, a metabolizmus első és sebességmeghatározó lépésében katalizálja az uracil 5,6-dihidrouracillá és a timin 5,6-dihidrotiminné való redukálását NADPH jelenlétében. Ez az enzim jelentős szerepet játszik a fluoropirimidin alapú kemoterápiás gyógyszerek lebontásában, katalizálja az 5-FU lebontását is az uracillal analóg módon, annak redukciójával.



3. ábra – Uracil és 5-FU DPD katalizált redukálása

1.4. Dihidropirimidin-dehidrogenáz deficiencia

A DPD deficiencia egy autoszomális recesszív jellegű anyagcserezavar betegség, amely a DPD enzim aktivitásának csökkenését vagy annak teljes hiányát jelenti [6]. Ez azt jelenti, hogy a testi kromoszómákat érintő genetikai rendellenesség hozza létre, amely recesszív öröklődés miatt csak homozigóta állapotban manifesztálódik ténylegesen fenotípusosan. A DPYD gén több mutációját is megfigyelték, melynek következményeként részleges vagy teljes DPD aktivitás hiány alakult ki. A pirimidin katabolikus útvonal rendellenessége súlyos értelmi fogyatékosághoz, motoros retardációhoz és görcsrohamokhoz vezethet. Különösen fontos a DPD enzim a fluoropirimidin alapú kemoterápiás gyógyszeres kezelésben részesülő daganatos betegek esetében. Az 5-FU az egyik legszélesebb körben alkalmazott kemoterápiás gyógyszer, mely esetében a DPD hiánnyal küzdő betegeknél súlyos és esetekben végzetes toxicitást okozhat a gyógyszer, amennyiben annak detoxifikációja gátolt a DPD funkciójának hiányában. Mellékhatások között szerepel 5-FU mérgezés esetén a súlyos, vérzéssel járó tápcsatorna mucositis; hányás; hasmenés; görcsök; súlyos neutropenia és thrombocytopenia; bőrtünetek; bőrpír, duzzanat, hámlás és fekélyek. Épp ezért javasolt az 5-FU kemoterápiás kezelés előtt prognosztikus célból megvizsgálni a DPD enzim aktivitását, mely során kiszűrhetőek a DPD hiányos betegek, akik nem kaphatnak 5-FU kezelést. Az EMA (European Medicines Agency) javaslata, hogy minden beteg esetében végezzék el a DPD enzim hiányának vizsgálatát az 5-fluorouracillal injekció vagy infúzió formában történő kezelés előtt, beleértve a hasonló gyógyszereket, mint a tegafur vagy a capecitabin [7].

2. Irodalmi áttekintés

A korábban említett DPD diszfunkció a kemoterápiás kezelés közben az aktív, tehát citotoxikus és citosztatikus tulajdonsággal rendelkező metabolitok fokozott expozíciójához vezet. A DPD hiány hatására megjelenő súlyos mellékhatások indukálták azt, hogy számos módszer alakult ki a DPD oxidoreduktáz enzim aktivitásának a mérésére. Jelleget tekintve két alapvető csoportja van a klinikai diagnosztikai teszteknek a genotípusos és a fenotípusos tesztek. A genotípusos teszteknek az a lényege, hogy az egyed genomját (teljes örökítőanyag) vizsgálják különböző molekuláris biológiai módszerekkel annak érdekében, hogy azonosítsák azokat a szakaszokat, amelyek esetében eltérés található. Ezeknek a DNS nukleotid szakaszoknak, azaz a géneknek az alapvető feladata az élet számára nélkülözhetetlen fehérjék kódolása. Ezekből a transzkripció során mRNS, majd a transzláció során fehérje szintetizálódik. Hibás genetikai kód esetében, azaz mutáció esetén előfordulhat, hogy hibás fehérje keletkezik, ami nem tudja ellátni a feladatát. A genotípusos tesztek során ezért a DPYD gén mutációit vizsgáljuk, amivel következtethetünk a DPD deficiencia valószínűségére. Ezzel szemben a fenotípusos tesztek során a genetikai elváltozásból eredő már manifestálódott tulajdonság vizsgálatát helyezzük a középpontba. Ezek közül a módszerek közül számos teszt megfelelt a klinikai gyakorlatban, de a rutinszerű alkalmazásuk nincs előírva. Különböző detektálási módokat alkalmazhatunk DPD enzimaktivitás meghatározására, mint a UV-Vis spektroszkópia, infravörös spektroszkópia vagy radioaktív anyagok nyomon követésére alkalmas detektorok.

2.1. Genotípusos tesztek

Egyre elterjedtebben alkalmaznak genotípusos tesztekkel szemben a fenotípusos tesztekkel, mivel nagy pontossággal képes azonosítani a genetikai mutációkat, amelyek okozhatják a fenotípusosan manifestálódó DPD deficienciát, valamint kevésbé érzékenyek a mintaelőkészítés és a feldolgozás különbözőségeire. Négy változat mutatott reprodukálhatóan szignifikáns összefüggést az 5-FU súlyos toxicitásának fokozott kockázatával [5]. A c.1905+1G>A (DPYD*2A, IVS14+1G>A, rs3918290), ahol a c.1905+1 azt jelenti, hogy a DNS kódoló szakaszának, azaz a génnek az 1905 – ös pozíciója utáni nukleotid esetében történt a változás, ami egy splice – site mutáció. A splice – site mutáció egy olyan genetikai változás, amely az exonok (a gén kódoló szakasza) és az intronok (nem kódoló szakasz) között jön létre. Normál körülmények között a sejt jelzőbázisok segítségével képes azonosítani, hogy melyik exon melyik intron szakasz és a fehérjeszintézis előtt az intron szakaszokat kivágja, valamint az exon szakaszokat egyesíti. Egy ilyen típusú változás hibás mRNS szintézist eredményezhet, mely során a sejt nem ismeri jól fel melyik szakaszokat kell átírni a transzkripció során, így kimaradhat exon vagy benne maradhat intron

hibás fehérjét eredményezve. A G>A pedig azt jelenti, hogy a mutáció során egy guanin cserélődött ki egy adeninre. A másik három mutáció ugyanezen nómenklatúra alapján kvantifikálja a mutáció pontos helyét, valamint a nukleotidcsere jellegét., c.1679T>G (DPYD) *13, p.I560S, rs55886062) – ahol a p. azt jelenti, hogy a fehérjében történt változás jelen esetben az 560 – as pozícióban az eredeti izoleucin cserélődött ki szerinre, c.2846A>T (p.D949V, rs67376798), c.1129-5923C>G(rs75017182). Az rs számok egyedi azonosítók, amelyek által adatbázisokban vissza tudjuk keresni a különböző polimorfizmusokat. Azok a betegek, akik egy variánsra heterozigóták, részleges DPD-hiánynak felelnek meg. Azok a betegek, akik egy variánsra homozigóták, teljes DPD-hiányos kategóriába sorolhatóak [8]. A genetikai tesztek során célzottan ez a négy gén vizsgálata található a középpontban polimeráz láncreakció (PCR) technika segítségével. A PCR technika egy gyors, automatizált módszer, ami képes DNS polimeráz I. segítségével egy DNS – szakasz akár milliószoros felszaporítására, feltéve, ha annak a szekvenciája ismert vagy legalább az elején és végén lévő szekvencia ismert [10]. A mérés során a DNS polimeráz I. enzim nem képes elkezdni a komplementer szálát csak folytatni, ezért két 20-25 tagból álló egyszálú oligonukleotid sorozatot készítenek, amik komplementerek a DNS szakasz egyik, illetve másik 3' végével, ezeket hívjuk primereknek. A reakcióelegyben a primerek vannak nagy feleslegben, a felszaporítandó DNS szakasz, a négy dezoxi-ribonukleozid-trifoszfát és egy hőforrásból származó baktériumból izolált DNS polimeráz. A reakció során 95 °C-ra hevítve a DNS kettős hélix denaturálódik és kettészakad, ezután alacsonyabb hőmérsékleten a primerek bekapcsolódnak a komplementer helyükre. Az enzim aktivitásához megfelelő hőmérsékleten az enzim megszintetizálja a komplementeret a DNS szakaszhoz. Ezt a folyamatot ciklikusan ismételve tudjuk felszaporítani a DNS szakaszokat, amik utána megfelelő szekvenátorokkal vizsgálhatóak. Ezek olyan gépek, amikkel meg tudjuk határozni egy adott szakasz nukleotid sorrendjét, ezáltal a mutációk azonosítására szolgálnak.

2.2. Fenotípusos tesztek

A DPD enzim aktivitás számos szövetben meghatározható, de a legintenzívebb aktivitás a májban található, ahol maga a katabolizmus történik, ezért a csökkentett májfunkcióval rendelkező páciensek esetén szintén toxikus mellékhatások jelenhetnek meg. A máj biopszia invazív jellege miatt inkább a perifériás mononukleáris sejtekből (PBMC) meghatározott aktivitás mérések a gyakoribb fenotípusos tesztek, melyek eredményei jól korrelálnak egészséges máj biopsziából mért aktivitással [11].

2.2.1. Orálisan alkalmazott uracil farmakokinetikája

A módszer lényege, hogy testfelület négyzetméterenként 500 mg uracilt adagolnak orálisan a betegnek, majd egy kanült helyeznek a vénájába [12]. Megfelelő időközönként vért vesznek tőle és centrifugálással elválasztják a vérplazmát. Van Staveren tanulmánya szerint a vérplazmában található uracil és dihidrouracil koncentrációját egy validált HPLC technikával határozták meg úgy, hogy az uracilt 266 nm-en, a dihidrouracilt pedig 205 nm-en detektálták. Az eredményeket összevetették PBMC-ből radioenzimatikusan meghatározott aktivitásokkal és arra jutottak, hogy a normál DPD aktivitással rendelkező és a DPD hiánnyal élő betegek esetében szignifikánsan különbözik az uracil farmakokinetikája, ezért egy alternatív módszer lehet a DPD aktivitás jellemzésére.

2.2.2. 2-¹³C-uracil kilégzési teszt

Számos aktivitás mérésnek nagy hátránya az idő- és munkaigényesség, ami jelentősen korlátozza ezeknek a használatát a rutinszerű diagnosztikában. Ezért számos kutatás célja volt az, hogy egy egyszerű, gyors és nem invazív mérést hozzanak létre, ami a legtöbb klinika számára megvalósítható. Egyik ilyen tudománytörténetileg jelentős megoldás a 2-¹³C-uracil kilégzési teszt [13,14]. Ennek a diagnosztikai eljárásnak az a lényege, hogy 2-¹³C-uracilt adnak orálisan a betegnek, majd a kilélegzett ¹³CO₂-t mérik infravörös spektroszkópiával. A módszer a pirimidin katabolikus útvonalon alapszik, mely során β -alanin, ammónia és szén-dioxid keletkezik. A DPD hiányban szenvedő betegek esetében a csökkentett 2-¹³C-uracil katabolizmus csökkentett mennyiségű ¹³CO₂-t fog eredményezni. Viszont ennek a módszernek nagy hátránya, hogy közepes hatékonysággal, vagy egyáltalán nem tudja megkülönböztetni a súlyos toxicitású betegeket a közepes súlyosságúaktól. Ennek a tesztnek egy fontos korlátja, hogy a kapott eredményt befolyásolják más enzimek is, mint a dihidropirimidináz vagy a β -ureido-propionáz.

2.2.3. Uracil (Ura) és dihidrouracil (UH₂) meghatározás nyálból

Carlsson és munkatársai cikkében colorectális, azaz vastag-és végbéldaganatos betegek nyál mintáiban vizsgálta az Ura és az UH₂ mennyiségét, mivel a csökkentett DPD hatására változik az UH₂/Ura arány, ezért ez az érték jellemző lehet az enzim aktivitására [15]. Az eljárás során az 5-FU adjuváns kezelés előtt összegyűjtötték reggel az éhgyomori nyálat úgy, hogy egy vattacsomót kellett 2 percig rágni, majd centrifugálással elválasztották a folyadékot. A mintát egy HPLC oszlopra vezették, majd 2 oszlop segítségével határozták meg az analitokat. Az első oszlop egy fordított fázisú C18, a másik pedig egy kationcserélő oszlop volt. 210 nm-en végezték a detektálást és ez alapján számolták ki a két metabolit

arányát. Ugyanez a szerzőcsoport tanulmányozta ugyanilyen technikával a reggeli első vizeletből vett mintát, de nem volt statisztikailag szignifikáns különbség a beteg minták és a kontroll csoport között.

2.2.3. DPD enzimaktivitásának direkt meghatározás

Az A. Fleming és munkatársai 1992-es cikkében közölt módszere szolgál alapjául az Országos Onkológia Intézetben használt módszerhez [16]. A vizsgálat a fenotípusos tesztek közé sorolható és a perifériás mononukleáris sejtekből meghatározott enzimaktivitás alapján vizsgálhatóak a betegek DPD deficienciája. Ennek érdekében heparin véralvadásgátlót tartalmazó vérvételi csőbe vettek reggel 8 és 11 óra között vért, ezzel is kizárva a cirkradián ritmus okozta hatásokat. 20 ml vért gyűjtöttek és összekeverték 15 ml RPMI folyadékkal és ezt elegyítették Ficoll oldattal, nátrium-diatrizoáttal. A nátrium-diatrizoát oldat szintén egy gyakran alkalmazott folyadék, amit általában Ficollal kombinálva használnak limfociták vagy más leukociták sűrűség alapú elválasztására. 30 perces 400g-n történő centrifugálás után a limfocitákat összegyűjtötték és kétszer PBS oldattal mosták, az eritrociták lizálására hipotóniás oldatot alkalmaztak. A limfocitákat 35mM pH 7,4 foszfát pufferben szuszpendáltak, a sejteltérés fagyasztás–olvasztás ciklusok alkalmazásával történt, amit jeges hűtés melletti szonikálás követett (5×10 s). 30 percig 20 000g-vel 4 °C-on centrifugáltak, végül a felülúszó lizátumot vizsgálatig jeges hűtés alatt tárolták. A reakcióelegyet 35mM foszfát pufferben állították elő, amibe 2.5 mM MgCl₂, 250 μM NADPH, 20 μM és ¹⁴C jelölt 5-FU (55 mCi/mmol) került, majd 1 órát 37 °C-on inkubálták a reakcióelegyet. Az enzimreakció leállítására jéghideg etanolt alkalmaztak, majd 30 percre -20 °C-os fagyasztóba tették a mintát. 400g-n 5 perc centrifugálás után a felülúszót HPLC-vel és on-line szcintillációs detektorral analizálták. A minta teljes fehérje tartalmát meghatározták, a DPD enzimaktivitást pedig nmol(DHFU)/perc × mg fehérje dimenzióban adták meg.

Van Kuilenburg és munkatársainak 1998-as tanulmányában az előzőhöz nagyon hasonlóan PBMC-ből mérték a DPD aktivitást. A vért EDTA-t tartalmazó vérvételi csőbe vették le és a limfocita szeparáláshoz Lymphopaque (1.086 g / ml) oldatot használtak. 800g-n szobahőmérsékleten centrifugáltak 20 percet és összegyűjtötték a limfocitákat, majd PBS-sel mosták (800 g 8 min). Az eritrociták lizálása jéghideg ammónium-kloriddal történt, majd 250g-n 4 °C-on 10 percet centrifugáltak. A limfocitákat a felhasználásig folyékony nitrogénben tárolták. A reakcióelegyhez 35 mM foszfát puffert (pH= 7,4), 2.5 mM magnézium-kloridot, 1 mM DTT-t, 250 μM NADPH és 25 μM [2-¹⁴C]timint használtak. A ¹⁴C jelzett timint és a keletkező jelzett dihidrotimint izokratikus elúció mellett fordított fázisú folyadékkromatográfiával választották el és egy radiodetektorral detektáltak. A lizátum teljes fehérje tartalmát BCA teszttel határozták meg [17].

Ugyanez a kutatócsoport vizsgálta a vérben található különböző alakos elemek fajlagos enzimaktivitását. A vér alakos elemei közé sorolhatóak az eritrociták, limfociták, trombociták, bazofil granulociták, neutrofil granulociták, eozinofil granulociták valamint a monociták. Az egyes sejttípusok enzimaktivitásuk meghatározásához különböző szeparálási technikákat alkalmaztak, hogy elválaszthassanak bizonyos populációkat. Az eozinofil és neutrofil granulocitákat úgy tisztították, hogy ammónium-kloridos eritrocita lízist alkalmaztak, majd centrifugálták és PBS-sel mosták. Végeredményként a minta >95% neutrofil és <5% eozinofil granulocitát tartalmazott. Eritrocitákhoz a Percollos elválasztás során háromszor mosták fiziológias sóoldattal, majd a sejtpellet fölötti folyadék részt eltávolították. A trombocitákat a felülúszó vérplazmából nyerték, valamint a leukocitáktól a monocitákat is elválasztották. A méréseik során azt tapasztalták, hogy a különböző alakos elemek különböző DPD aktivitással rendelkeznek. A sejtek közül a legmagasabb fajlagos aktivitása a monocitáknak, majd limfocitáknak, granulocitáknak és végül a trombocitáknak volt. Az eritrocitáknak nem volt jelentős mértékű aktivitása, amit ki is tudtak mérni, az is a szennyező granulocitáknak tudható be.

2.4. Célkitűzés

Az Országos Onkológiai Intézet Biokémiai Osztálya országos szinten végez DPD enzimaktivitás meghatározást radioenzimatikus módszerrel 5-FU kezelés mellékhatásainak előrejelzésére. A munka fő célja, hogy a patológiás tartományban, azaz csökkentett DPD aktivitású minták esetén fejlesszük a már alkalmazott módszer érzékenységét, megbízhatóságát és reprodukálhatóságát. Ebben a tartományban különösen fontos a tényleges DPD aktivitás ismerete, mivel ekkor a potenciális toxicitásból adódó mellékhatások elkerülése végett egyéb, nem fluoropirimidin alapú terápiás megoldásra van szükség. A módszerfejlesztés során az eredeti módszer különböző paramétereit tervezzük megvizsgálni, hogy azonosítsuk az eljárás érzékenységét és megbízhatóságát befolyásoló tényezőket. Vizsgálni kívánjuk mind az alkalmazott kromatográfiás módszert, mind a limfocita-szeparálási eljárást, ezen túl azonban szeretnénk a mért enzimaktivitásainkat korreláltatni vérplazmában mérhető metabolit szintekkel és arányokkal, amelyet HPLC-MS/MS módszerrel kívánunk megvalósítani.

3. Alkalmazott módszerek

3.1. Anyagok

A mérésekhez a Sigma-Aldrich vegyszergyártótól szereztük be a tetrabutilammónium-hidrogénszulfátot, nikotinamidot, magnézium-kloridot, ditiotreitolt, glükózt, albumint, EDTA-t, NADPH-t, di-kálium-hidrogén-foszfátot. Reanal-tól a nátrium-kloridot, di-nátrium-hidrogén-foszfátot, kálium-dihidrogén-foszfátot, ammónium-kloridot, kálium-hidrogén-karbonátot, kálium-kloridot, calcium-kloridot, magnézium-szulfátot, nátrium-hidrogén-karbonátot. Cytiva-tól a Ficoll-Paque oldatot. Merck KGaA-tól a türk oldatot és a trinátrium-citrátot, Superco-tól az acetonitrilt, Gibco-tól a tripán kék festéket. A flow citometriás mérésekhez Miltenyi Biotec antitesteket (130-127-586), a fehérjeméréshez Thermo Fisher Scientific Pierce™ BCA Protein Assay Kit –et, az enzimreakcióhoz pedig Moravek Biochemicals Inc. által előállított 53.5mCi/mmol fajlagos aktivitású [6-¹⁴C]5-fluorouracilt használtunk.

3.2. Mintavétel

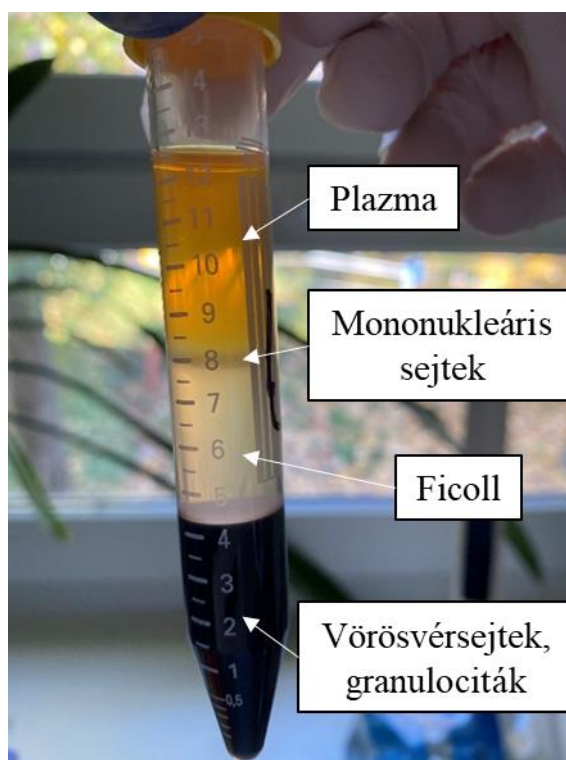
A vizsgálat vérmintából történik, amit az Országos Onkológiai Intézet ambulanciáján vesznek le a könyökvénából EDTA-t tartalmazó vérvételi csőbe, vagy az országos lefedettség miatt egy külső klinikán, amit elküldenek az Intézet számára. Az EDTA kelát komplexképződés formájában köti meg a calcium ionokat, amelynek a szervezetben katalitikus funkciója van a protrombin trombin átalakításnál, ami a véralvadás alapreakcióját a fibrinogén-fibrin átalakulást katalizálja. Ennek eredményeként a véralvadás nem következik be és a vérminta analizálásra alkalmas. Véralvadás gátlására még citrátot és heparint is alkalmazhatnak. A kísérletekhez használt vérmintákat egészséges önkéntes donoroktól vettük le 9 ml térfogatú Vacutainer K2EDTA mintavételi csövekbe. A mintagyűjtést a BPR-021/00084-2/2014 számú ETT-TUKEB etikai engedély alapján végeztük.

3.3. Limfocita szeparálás

A vérmintákat alaposan, de csak óvatosan fordítgatva összerázzuk és 4ml Ficoll-Paque oldatra rétegezzük Pasteur pipetta segítségével. A Ficoll oldat egy pontosan meghatározott sűrűségű, hidrofil poliszacharid oldat, amit elsősorban a diagnosztikában és a kutatásban vérmintákból sejtek szeparálására használnak. A Ficoll oldat sűrűsége 1,077 g/ml Ezt követően egy centrifuga segítségével centrifugáljuk 23 percet 3220 g-n, majd a leállítást fék nélkül történik. Utóbbi azért szükséges, mert fékezésnél a nagy rántás miatt nem egy összefüggő kis réteget kapnánk a mononukleáris sejtekből, hanem nagy térfogatban

oszlának el a limfociták, azaz a nyiroksejtek. Centrifugálás hatására sűrűség alapján több rétegre válik szét a vér: felső (sárga) réteg a vérplazma, amiben az alvadási faktorok, fehérjék, ionok vannak; alatta a szürkésfehér, hőszerű rétegben a mononukleáris sejtek, azaz limfociták és monociták, alatta a színtelen, szeparáló Ficoll oldat és végül a legalján a vörösvértesteket és granulocitákat tartalmazó vörös réteg. Így már egy Pasteur pipetta segítségével a vérplazma és a Ficoll oldat között lévő limfocitákat át tudjuk pipetázni egy műanyag centrifugacsőbe.

9 ml-re kiegészítjük a limfocitákat tartalmazó frakciót „kiegészített PBS”-sel (phosphate-buffered saline, azaz foszfáttal pufferelt sóoldat), ez az első mosási lépés. A PBS az egy olyan oldat, ami izotóniás koncentrációban tartalmazza a sókat, ami az ozmózisnyomás és az elektrolit egyensúly miatt fontos, illetve puffer lévén megakadályozza, hogy a kísérlet során drasztikus pH-változás következzen be. Tehát az emberi szervezet belső környezetét hivatott reprodukálni, ezért széles körben használják biológiai, biokémiai és orvosi kutatásokban. A „kiegészített PBS” tartalmaz továbbá glükózt, ami energiaforrás a sejteknek, ezért élő sejt tárolása esetén elengedhetetlen, valamint biztosítja az izotóniás környezetet és szérum albumint, ami az ozmotikus egyensúly fenntartása miatt fontos. A mintát a mosóoldattal 5 percig 1811 g-n, fél használata mellett centrifugáljuk.

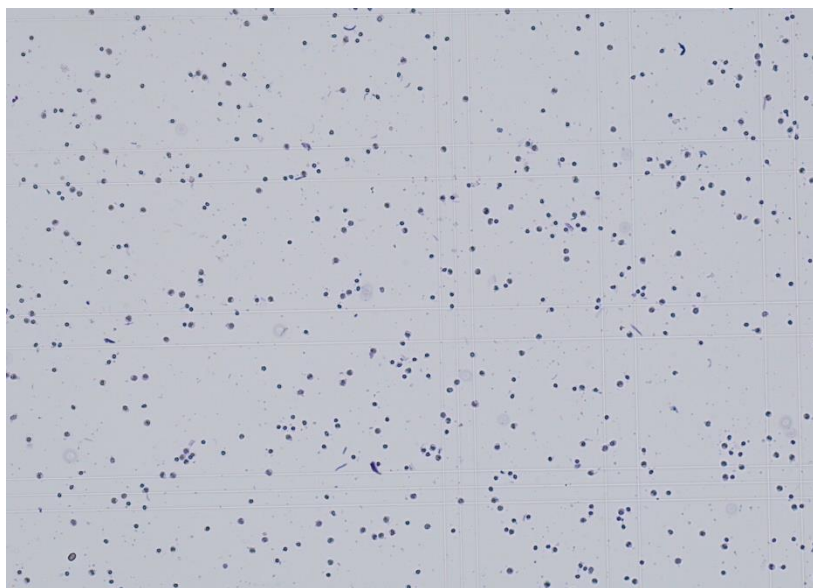


4. ábra – Vér frakciói Ficoll oldatos szeparálást követően

A lecentrifugált átlátszó sejtek a műanyag cső alján gyűlnek össze. A felette lévő oldatot leöntjük és 4 ml lizáló oldatot adunk hozzá úgy, hogy a pipettával a sejteket felkeverjük, majd 10 percig jegesfürdőben tároljuk. A lizáló oldat ammónium-kloridot tartalmaz, ami kémiai tulajdonságaiból adódóan eritrociták (vörösvértestek) lízisére használható. Az ammónium-kloridból származó NH_3 a sejt membránján átdiffundálva növeli annak citoszolikus pH-ját, ezáltal az oldott CO_2 egy része ezen a pH-n karbonáttá fog alakulni. A megnövekedett CO_3^{2-} koncentrációt a sejt klorid-karbonát transzporterén keresztül próbálja ellensúlyozni, ezáltal megnő a citoszolikus klorid koncentráció, ami végül egy ozmotikus sokkot fog eredményezni a sejten belüli magas NH_4Cl koncentráció miatt [18]. Lízis után újra felöntjük „kiegészített PBS” oldattal és 5 min 805g mellett centrifugáljuk. A végén egy fehér-okker színű sejt tömeget kapunk a centrifugacső alján. Ha továbbra is piros, az azt jelenti, hogy nem volt sikeres a lízis és még maradt a rendszerben eritrocita, azaz vörösvérsejt. Ilyenkor a lízis folyamatát a kiegészített PBS-es mosással együtt meg kell ismételni, míg ezt a fehér-okker színt meg nem kapjuk.

Most következik az utolsó „kiegészített PBS”-ben való mosás 10 min 805g mellett. A felülúszót leöntjük és a csövet Hanks’ oldattal töltjük fel. 10 min 805g-n és fék nélkül centrifugáljuk, ezáltal egy lazább limfocita halmazt kapunk. A Hanks’ oldat biztosítja rövid távon a sejtek életképességéhez szükséges szervetlen ionokat, fiziológiás pH-t, megfelelő ozmotikus nyomást. Széleskörben alkalmazott oldat a sejtbiológia területén, amit főleg rövidtávú műveletekre alkalmaznak, mint a sejtek mosása.

Beteg mintánként két Eppendorf mikorcentrifuga csőbe 90 μl Türk-oldatot teszünk, majd 400 μl Hanks’ oldattal a limfocita halmazt felfuszpendáljuk és vortexeljük. Vortexelés után azonnal 10 μl -t bemérünk az Eppendorf csövekbe és hagyjuk 10 percet állni, hogy megfestődjene a limfociták. A Türk oldat egy laboratóriumokban gyakran alkalmazott vegyszer, ami ecetsav tartalma révén elősegíti a maradék vörösvértestek hemolízisét és a benne lévő metilénkék festék pedig megfesti a leukocitákat (fehérvérsejteket), ezért alkalmasak lesznek a mikroszkóppal való számlálásra. A festett mintából 10 μl -t belepipettázunk egy Bürker-kamrába, ami egy olyan üvegeszköz, amely rendelkezik egy apró ismert térfogatú mélyedéssel és egy ismert beosztású ráccsal és fénymikroszkóp segítségével megszámloljuk, hogy ebben az adott térfogatban mennyi festett limfocita található meg. 100 körüli érték az ideális, amely megfelel N/ml sejtkoncentrációnak, ha ennél több az egész mintát arányosan hígítjuk Hanks’ oldattal és új ellenőrző sejszámlálást végzünk. A Hanks’ oldatban lévő limfocita mintát csavaros kupakú műanyag edénybe (kriocső) helyezük és felhasználásig folyékony nitrogénben tároljuk.



5. ábra – Türk oldattal festett leukociták Bürker kamrában, mikroszkóp alatt

3.4. Sejtfeltárás

Az 5-FU-t lebontó DPD enzim a limfociták sejtplazmájában fordul elő, ezért az enzim aktivitásának a meghatározásához lizálással kell azt felszabadítani a sejtekből. Lizáláshoz számos technikát lehet alkalmazni, mint az ultrahangos szonikálás, fagyasztás-olvasztás ciklusok ismétlése vagy a detergenssek használata. Ezt a Biokémiai Osztályon ennél a típusú mérésnél több körös folyékony nitrogénes fagyasztás-olvasztás technikával valósítják meg. A limfocitákat tartalmazó Hanks'-oldatos mintát a mérés napján kivesszük a folyékony nitrogént tartalmazó minta tárolóból és kézmeleg vízben felolvasztjuk, majd vortexeljük 1 percig. Ezt a ciklust háromszor ismétljük meg, majd 30 percig 22136g mellett 4 °C-on centrifugáljuk és végül a felülúszó lizátumot új Eppendorf csőbe pipettázzuk. A centrifugálás alatt előkészülünk az enzimreakcióhoz a szükséges oldatok elkészítésével.

3.5. Enzimreakció

A centrifugálás közben elkészítjük a szükséges oldatokat az enzimreakcióhoz.

- Foszfátpuffer – 0,2M KH_2PO_4 , 0,2M K_2HPO_4 pH = 7,6 vizes oldat
- A oldat – 0,3 mg/ml ditiotritol (DTT) foszfátpufferben
- MgCl_2 – 10 mg/ml A oldatban
- Nikotinamid oldat – 5 mg/ml A oldatban
- NADPH oldat – 1 mg/ml A oldatban

Reakcióelegy 28 darab mintára

- 526 μl A-oldat
- 175 μl MgCl_2 -oldat
- 70 μl nikotinamid oldat
- 350 μl NADPH oldat
- 280 μl 6- ^{14}C 5-FU

A foszfátpuffer biztosítja a megfelelő pH-t az enzimreakcióhoz. A DTT egy redukálószer, amely segít az aktív centrumukban tiol csoportokat tartalmazó enzimeket katalitikusan aktív formában tartani, mivel számos enzim esetén ezek nagyon könnyen oxidálódni tudnak. A magnézium-ionok és a nikotinamid kofaktorok, amik hozzájárulnak az enzim működéséhez, míg a NADPH egy olyan kofaktor, ami a szervezet redukálószer, ezért szükséges az 5-FU redukálásához. Betegenként két mintát készítünk elő:

- I. 50 μl lizátumhoz 100 μl jeges etanolt adunk és utána 50 μl reakcióelegyet
- II. 50 μl lizátumhoz 50 μl reakcióelegyet adunk és vortexeljük

Az első esetben a folyamat már a reakcióelegy hozzáadása előtt le van állítva, az lesz a nulladik időpillanati referencia. A mintákat 37 °C-on rázatva inkubáljuk 40 percet, majd jeges 96%-os etanollal leállítjuk és vortexeljük. 10 perc centrifugálással 6864g-n a denaturált fehérjéket lecentrifugáljuk az Eppendorf cső aljára. A tiszta felülúszót átpipettázzuk HPLC mintatartó üvegekbe. A mérésig ezeket a mintákat -20 °C-os fagyasztoóban tároljuk.

3.6. Elválasztás és detektálás

Az előzőek során eljutottunk oda, hogy a vérből elválasztottuk a limfocitákat, majd lizáltuk és megfelelő körülmények között létrehoztunk egy enzimreakciót, mely során az enzim a ^{14}C jelzett radiofarmakon egy részét átalakította a szintén ^{14}C jelzett redukált termékévé. Ezeket kell elválasztani, amelyre fordított fázisú nagy teljesítményű folyadékkromatográfiát alkalmazunk (RP-HPLC), ELITE LaChrom, MERCK HITACHI autosampler I-2000es széria. Az elválasztáshoz ThermoFisher ODS HYPERSIL C-18 fordított fázisú (250 mm $\times$ 4,6 mm, 5 μm , 100 Å) oszlopot használtunk és szobahőmérsékleten izokratikus, azaz állandó összetételű eluenst alkalmaztunk 0,5 ml/perc áramlási sebességgel. Az eluens 1:1 arányban tartalmazott 1,47 mM koncentrációjú pH 7,8 foszfátpuffert és 5 mM

koncentrációjú tetrabutylammónium-hidrogénszulfát oldatot. A detektáláshoz FlowStar Berthold LB 514 típusú szcintillációs számlálót alkalmaztunk.

3.7. Sejtfeltérési módszerek

Lízisnek nevezzük azt a folyamatot, mely során a sejtet körülvevő sejtmembránt részlegesen vagy teljesen lebontjuk vagy feloldjuk különböző módszerekkel annak érdekében, hogy a citoszolikus, azaz a sejtplazmában vagy az organellekben található számunkra érdekes anyagokat vizsgálni tudjuk, mint a fehérjék, ribonukleinsavak (RNS) vagy a dezoxiribonukleinsavak (DNS). Alapvetően a lizálási technikák két fő csoportra oszthatóak a fizikai és kémiai lizálási eljárásokra. A fizikai lizálási módszerek közé tartoznak a fagyasztás – olvasztás ciklusok, a termikus lizálás, a szonikálás, az ozmotikus sokk alkalmazása vagy a mechanikai eljárások. A fagyasztás – olvasztás ciklusoknál a víz fagyasztás során történő térfogatnövekedését használjuk ki, mely során a sejtmembrán károsodik és ezt ciklikusan ismételjük. Termikus lizálást is alkalmazhatunk, ugyanis kimutatták, hogy a tartós magas hőmérséklet is használható lizálásra, mert denaturálódnak a sejtmembránban található fehérjék, de ennek a felhasználhatósága korlátozott, mivel a metabolitok, fehérjék és a DNS is károsodhat magas hőmérséklet hatására. A szonikálás során az ultrahang energiáját fogjuk alkalmazni és ez jelenleg az egyik legszélesebb körben alkalmazott technika. A nagy frekvenciájú hanghullámok lokálisan váltakozó nagy és kis nyomásának, valamint a kavitációnak köszönhetően a sejtek membránja széttörik így megtörténik a lízis. Az ozmotikus sokk az ozmózis jelenségén alapszik, amely során, ha egy féligáteresztő hártya, esetünkben a sejtmembrán két oldala között koncentráció különbség jön létre, akkor ez egy irányított részecskeáramlást fog okozni. Ha egy a citoszolikusnál kisebb koncentrációjú oldatot alkalmazunk, azaz egy hipotóniás oldatot, akkor mivel ez a kisebb koncentrációjú térrész oldószermolekulák, azaz vízmolekulák fognak a sejtmembránon keresztül a sejtbe áramlani, ami a sejt szétpukkadásához vezet. A mechanikai lizálási technikák esetén nyíróerőt fogunk létrehozni, mely során ennek az erőnek a hatására, mechanikai úton fogjuk károsítani a sejtmembránt. Ebbe a csoportba tartozik az üveg, acél vagy kerámia gyöngyökkel való lizálás, mely során a sejtekkel ütköznek ezek a gyöngyök, így a sejtmembránt fizikai úton törik össze. Ide tartozik még a Potter-Elvehjem homogenizátor, ami egy szintén nyíróerő hatására történő módszer a sejtek szétzúzására, homogenizálására. Ez a homogenizátor egy üvegcsőből áll, amihez tartozik egy a cső belső átmérőjénél csak kicsivel kisebb átmérőjű üveg dugattyú. A sejteket tartalmazó szuszpenziót a Potter csővébe töltjük, majd a dugattyú fel – le mozgatásával, tehát a szuszpenzió dugattyú és üvegcső közötti átpréselésével váltjuk ki a nyírófeszültséget.

A kémiai elven működő lizálás történhet a pH megváltoztatásával, mint a lúgos hidrolízis, mely során a sejthártyát alkotó foszfolipidek észterkötéseinek a hidrolizálása történik, vagy alkalmazhatunk detergenset, amik felületaktív anyagok, amfipatikus molekulák, amik a hidrofil – hidrofób kölcsönhatások alapján képesek a sejthártyát megbontani. A detergensok kettős oldékonyságú tulajdonságuk miatt képesek micellákat képezni és ezáltal diszpergálni vízben nem oldódó zsírokat, olajokat. Ezen belül megkülönböztetünk ionos (anionos, kationos) és nemionos detergenset. A biológiai lízisek során valamilyen specifikus enzimet is alkalmazunk annak érdekében, hogy a citoszol anyagait kinyerjük a sejtől. Ennek a módszernek nagy előnye, hogy nagyon specifikusan alkalmazhatjuk egy bizonyos sejtípusra, annak függvényében, hogy melyik enzimet alkalmazzuk [19].

A különböző lizálási eljárások összehasonlításához ugyanazon limfocita mintát dolgoztuk fel, majd a keletkező lizátumok fehérje tartalmát mértük, mint a lízis hatékonyságának mutatóját. A fagyasztás-olvasztást az alapszám módszernek megfelelően, a szonikálást 10 másodpercig és 10%-os működési ciklusban végeztük, ami azt jelenti, hogy másodpercenként csak tízed másodpercig ad ultrahangot. A detergenset úgy adtuk hozzá a limfocitákhoz, hogy 5 percig 1000g-n centrifugáltuk, leszívtuk a felülúszó háromnegyedét, majd ugyanennyi detergennel visszaállítottuk az eredeti térfogatot. Megvizsgáltuk a Potter-Elvehjem homogenizátor, a fagyasztás – olvasztás ciklusok és a szonikálás hatását, valamint különböző detergenset is kipróbáltunk, mint a CHAPS, RIPA és a 8M koncentrációjú karbamid oldata.

3.8. Fehérjemérés

A fehérjék kimutatására számos módszer ismert, mint a Bradford módszer, ami egy kolorimetriás eljárás, azaz egy festék specifikusan kapcsolódik a fehérjéhez, ezáltal egy színváltozás történik, ami spektrofotometriásan vizsgálható, de a módszer érzékeny a detergensre. Használható még direkt UV spektrofotometria, ami gyors és egyszerű eljárás, de egy komplex mintában nagyon sok komponens képes elnyelni, ami zavarja a mérést. Specifikus fehérjekimutatásra immunpróbákat alkalmaznak, mint az ELISA vagy a Western blot. Az ELISA teszteknél egy specifikus antitestet kötnek a fehérjéhez, majd egy másodlagos antitestet, ami létrehozza a detektálható színreakciót, fluoreszcenciát vagy kemilumineszcenciát, míg a Western blotnál egy gélelektroforézis elválasztás után egy membránra blotolják és ehhez kötik a színes, fluoreszkáló vagy kemilumineszcens jelölést, ezeknek a hátránya, hogy időigényesek és az antitestek nagyon drágák. Munkánk során BCA tesztet alkalmaztunk, ami nem érzékeny a detergensre, ellenben redukálószer, tiolok zavarhatják a mérést.

A BCA teszt Biuret reakción alapszik, amely során a fehérjékben megtalálható peptidkötések és bizonyos aminosavak, mint a cisztein, triptofán vagy a tirozin képesek redukálni a Cu^{2+} iont Cu^+ ionná lúgos körülmények között. Ez a Cu^+ képes komplexet kialakítani a BCA-val és egy ibolyaszínű komplex fog keletkezni. A keletkező Cu^+ mennyisége, ezáltal a komplex mennyisége arányos lesz a mintában található fehérjekoncentrációval, spektrofotometriásan detektálható, abszorbancia maximuma 562 nm-en található [20].

A fehérjemérés során 96 lyukas microplate-et használtunk és minden mintát, valamint a kalibrációs sorozatokat duplázva vittünk fel. Külső kalibrációt alkalmaztunk, azaz egy fehérjéből ismert koncentrációjú kalibrációs sorozatot készítettünk. Erre a célra gyakran használják a szarvasmarha szérum albumint (BSA), amelyből felező hígítással csináltunk kalibrációs sorozatot 2000 és 125 $\mu\text{g/ml}$ fehérjekoncentráció között. Mivel a különböző lizálási módszerek esetén különböző puffereket alkalmazunk, ezért minden puffer esetén, amivel a hígításokat végezzük külön kalibrációs sorozatot kell csinálni, így ellenőrizve az oldószer hatását a fehérjemérés eredményére.

A méréshez az A és B reagenst 50:1 térfogatarányban összekeverjük (Working reagent – WR) és lehetőleg utána azonnal felhasználjuk. A microplate-be 10 μl -t mértünk be a lizátumból, illetve 200 μl -t a WR-ből és 30 percet 37 °C-on inkubáltuk. Inkubálás után egy spektrofotométer segítségével mértük az abszorbanciákat 562 nm-en és a kalibráló sorozat abszorbancia pontjaira egyenest illesztve számolhatjuk az ismeretlen koncentrációjú mintánk összetételét. Minden mérési pont esetében úthosszkorrekciót is alkalmaztunk.

3.9. Áramlási citometria

Az áramlási citometria a sejtbiológiai, sejt-biofizikai, immunológiai és onkológiai kutatások fontos eszköze, amellyel lehetőségünk nyílik a sejtpopulációk jellemzésére. Ez a technika lehetővé teszi, hogy automatizált módon kvantitatív és kvalitatív jellemzést adjunk a sejtpopulációt alkotó sejtípusokról különböző morfológiai adatok alapján. A különböző sejtípusokat azonosítani és mennyiségileg jellemezni lehet a sejt-nagyság és intracelluláris granuláltságuk alapján. Ezt kiegészítjük különböző fluorokrómokkal (fluoreszcens festékekkel, fluorofórral), amelyek segítségével a morfológiai adatok mellett különböző fehérjéket, DNS-t, RNS-t, apoptózist és számos egyéb folyamatokat tudunk tanulmányozni. A vizsgált mintánkat, ami egy sejtszuspenzió túlnyomás segítségével vezetjük be az áramlási cellába. A mérés során nagyon fontos, hogy egy jól pozícionált sejtáramot hozzunk létre, ezt hidrodinamikai fókuszálással valósítjuk meg. A készülékben egy köpenyfolyadékot alkalmazunk és turbulencia mentes lamináris

áramlást hozunk létre. Célunk az, hogy az optikai cellában a sejtek egyenként haladjanak át. Néhány mm-rel a fej alatt különböző fényforrásokat alkalmazunk, amelyek segítségével optikai jeleket kapunk a sejtekről. A gerjesztő fényforrás lézer, ami nagy intenzitású, monokromatikus, koherens, polarizált elektromágneses sugárzást tud létrehozni. Az egyes sejtek áthaladásakor detektált jelek lehetnek a fényszórásból származó jelek, amelyek lehetnek előre irányuló fényszórás (forward scatter - FSC), amikor a detektor a gerjesztő fénynyalábbal egy irányban áll vagy oldalirányú fényszórás (side scatter - SSC), amikor a fénynyalábra merőleges irányú a detektor. Ezeken túl az optikai jelek lehetnek fluoreszcencia jelek, ha különböző fluorokrómokat is alkalmazunk, ekkor a fluoreszcencia detektorok merőlegesen helyezkednek el a fénynyalábra. A fluoreszcencia intenzitása arányos lesz a sejtekhez kötött fluorokróm mennyiségével. Az előre irányuló fényszórás a sejtek méretét fogja jellemezni. Az oldalirányú fényszórás az intracelluláris granuláltsággal van összefüggésben. [21,22].

4. Eredmények és értékelésük

A jelenleg alkalmazott módszer esetén a fő probléma az, hogy a patológiás esetben, amikor DPD deficienciáról van szó a kromatogramon a keletkező termék, azaz a DHFU csúcs magassága és területe nagyon alacsony, mivel csak kis mértékben képes a lebontó enzim az 5-FU-t átalakítani. Ennek eredményeként a jel-zaj arány is alacsony, ezért egy megbízható módszer érdekében ezt az arányt a patológiás tartományban feltétlenül növelni kell. Az ilyen esetekben, amikor kis koncentrációkat szeretnénk pontosan mérni fontos feladat az alapvonalis zaj csökkentése vagy a jel növelése, hogy elérjük a kedvező jel-zaj arányt, ezáltal minél alacsonyabb kimutatási határt. Az alapvonalis zaj csökkentésére számos módszer van, mint az eluens tisztaság növelése, mechanikai szennyeződések szűréssel való eltávolítása vagy elektromos zaj esetén a hőmérséklet csökkentése a detektorban lehet egy megoldás. Esetünkben a detektor nagyon magas specificitása miatt a mintából, az eluensből, valamint a természetes háttérsugárzásból származó háttérzaj csökkentése csak indokolatlanul nagy munkával lenne elérhető, hiszen az eluens „ β -szegényítése” vagy a háttérsugárzás csökkentése rendkívül költségigényes. A detektor fejlesztése szintén nem volt járható út, akárcsak detektálási paramétereinek módosítása sem. Ezek következményeként a jel/zaj arány megnövelése céljából annak számlálóját, tehát a detektált jel megnövelését tűztük ki célul.

Első lépésként az alkalmazott kromatográfiás módszer felülvizsgálatát végeztük el. Ennek az oka az volt, hogy a rutin módszer hagyományos C18 állófázisú kolonnán történő izokratikus elválasztásra épít 100%-os vizes eluenst alkalmazva. Fordított fázisok esetén bár az irodalomban, főként poláris komponensek metabolomikai vizsgálatánál gyakran bevett módszer ez a megoldás, hiszen kellően gyenge elúciós körülményeket eredményez biztosítva a poláris komponensek visszatartását, ugyanakkor kedvezőtlen a kolonnatöltet szempontjából. A teljesen hidrofób, szilika tölteten elhelyezett szénhidrogén láncok teljesen poláris mozgófázis mellett a két fázis kompatibilitásának hiányában drasztikus változáson mennek át és „összeomlanak”. Ezzel az állófázis elveszíti visszatartó erejét, kapacitását, ami az elválasztás romlásához és a kolonna használhatatlanná válásához vezet. Ezt természetesen mi is tapasztaltuk a retenciók idő folyamatos csökkenésén keresztül, amit minden mérési sorozat után 80%-os ACN-lel történő mosással igyekeztünk ellensúlyozni.

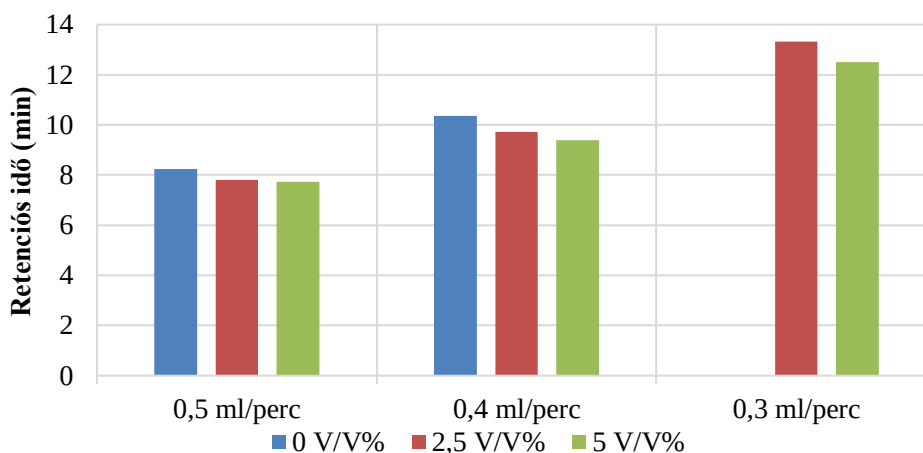
4.1. Az eluens összetétele és az áramlási sebesség

Fordított fázisú C18-as kolonnát alkalmazunk, ezért, ha megnöveljük a szerves oldószer mennyiségét az eluensben az számos előnnyel járhat. Az apoláris komponensek retenciók ideje csökken, mivel ezek a

komponensek jobban fognak oldódni a mozgó fázisban, mint vonzódni az elválasztást végző oszlop töltetéhez. Az acetonitril mennyiségének a növelése kedvező hatással van az eluens viszkozitására is, mivel kisebb a viszkozitása, mint a kezdeti vizes, foszfát puffert tartalmazó eluensnek. A stabil pH biztosítása érdekében foszfát puffert alkalmazunk, ezért nem növelhetjük meg a szerves oldószerek mennyiségét túlságosan az eluensben, mert akkor a sók kiválnak a kolonnán, ezáltal a kolonna eltömődhet. Fontos kezdeti lépés volt, hogy először a kolonnán kívül, üvegcsövekben meghatározzuk, hogy mekkora térfogatszázalékos összetételig nem látunk sókiválást. A két eluensösszetevőt, a TBAH-SO₄ tartalmú vizes foszfát puffert és az acetonitrilt különböző arányokban keverve ellenőriztük, megtörténik-e a puffer kiválása. 20 B V/V%-ig egyáltalán nem láttunk opálos megjelenést, így eddig az összetételig biztonságosan keverhetjük az eluenseket.

Az egyes összetételek mellett az áramlási sebességet is változtattuk, amely a mérési idő befolyásolásán túl egy nagyon fontos következménnyel járt: Mivel az általunk használt detektor egy, az analit szempontjából „időfüggő” mennyiséget detektál, ezért a klasszikus, UV detektálást alkalmazó kromatográfiás jelenségek is változnak. Amíg egy UV kromatogram csúcs alatti területe csak kis mértékben változik az elúció sebességétől függően, addig ez a mi szcintillációs detektorunk esetében a detektált jel nagysága jelentősen függ az áramlási sebességtől, egészen pontosan az analit detektorcellában töltött idejétől. Ez könnyen érthető, hiszen a detektor a radioaktív atom által elszenvedett bomlásokat detektálja, tehát kétszer akkora detektorban töltött idő kétszeres beütésszámot eredményez. Ezt a jelenséget mi előnyünkre kívánjuk fordítani azáltal, hogy alacsonyabb áramlási sebességet beállítva növeljük a detektált csúcsmagasságunkat, így növeljük az érzékenységet és a kimutatási határt is.

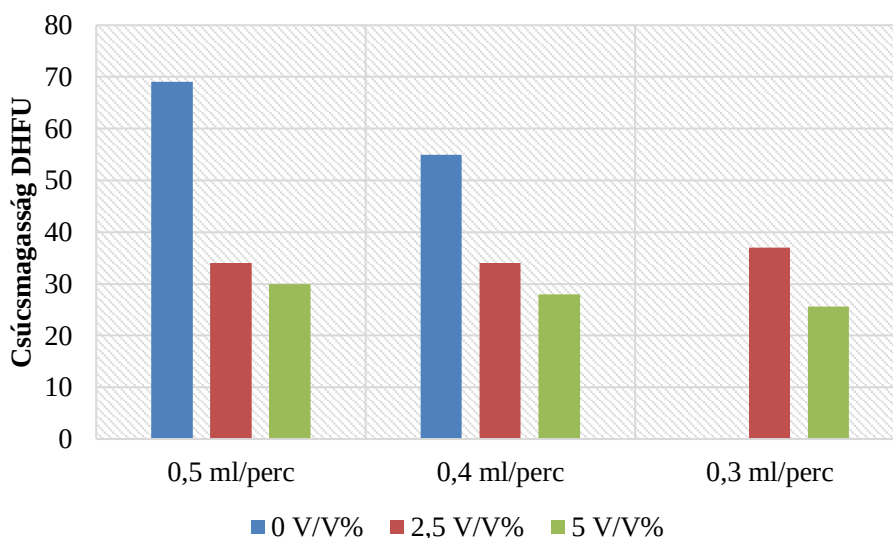
Adott összetételnél, különböző áramlási sebességek vizsgálatánál azt tapasztaltuk, hogy az elválasztás hatékonysága csökkent, ha csökkentettük a sebességet, ami a diffúzió okozat zónaszélesedés megnövekedésével magyarázható. Ez a jelenség az alapvonal szélesség megnövekedésénél és a csúcsmagasság csökkenésénél látszott. Két csúcs elválasztásának a hatékonyságát a felbontás (Resolution) jellemzi, ami a retenciós időkből és a félérték szélességből számítható és 1,5-től kezdve mondhatjuk alapvonal elválasztásnak.



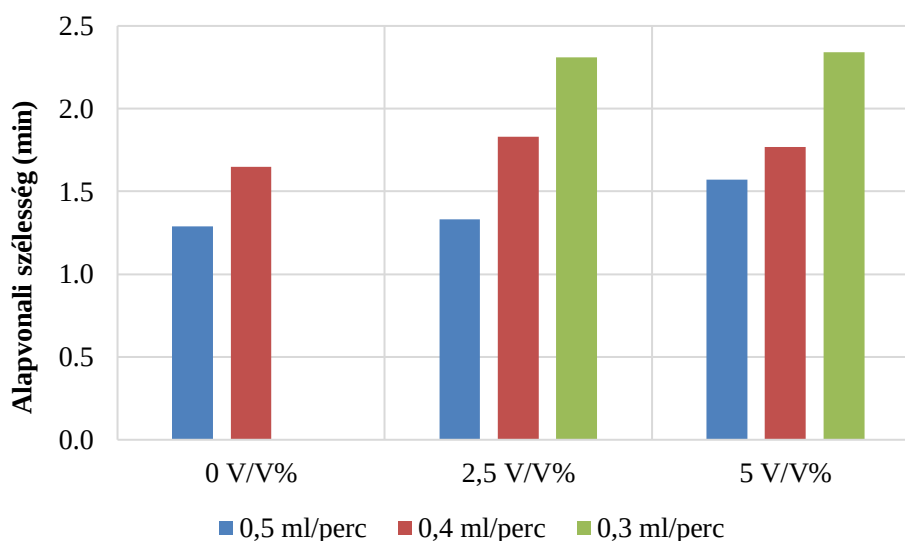
6. ábra – DHFU retenció idője az áramlási sebesség és az eluensösszetétel függvényében

A **6. ábrán** azt látjuk, hogy adott áramlási sebesség mellett, ha növeljük az eluensben az acetonitril térfogatszázalékos összetételét, akkor a retenció idő kismértékben csökkennek, az alacsonyabb áramlási sebesség pedig nagyobb retenció időket eredményez a vártnak megfelelően. 0,3 ml/min áramlási sebességnél 0%B összetételű minta esetén a készülék hibájából adódóan a kromatogram nem került rögzítésre, így ez a mérési pont sajnos hiányzik. 5 V/V% összetétel felett a kromatogramokon azt tapasztaltuk, hogy a csúcsok összeecsúsznak, ezáltal az elválasztás nem hatékony és alacsony DHFU csúcsok esetén, azaz a számunkra fontos patológiás tartományban nem értékelhetőek ki. Ez várható volt, hiszen viszonylag poláros komponensek elválasztását végezzük C18 állófázison, így eleve alacsony visszatartást vártunk.

Ezen mérések alapján úgy határoztunk, hogy a továbbiakban 2,5 V/V% acetonitrilt fogunk a vizes eluensünk mellett használni, ebben az esetben ugyanis még garantált az elválasztás. Mivel ez még továbbra is meglehetősen alacsony szerves összetétel egy C18 kolonna szempontjából, ezért felmerült alternatív állófázis alkalmazása is, mégpedig egy 100% vizes eluenssel kompatibilis fordított fázisú oszlop használata ezen poláris komponensek elválasztására.



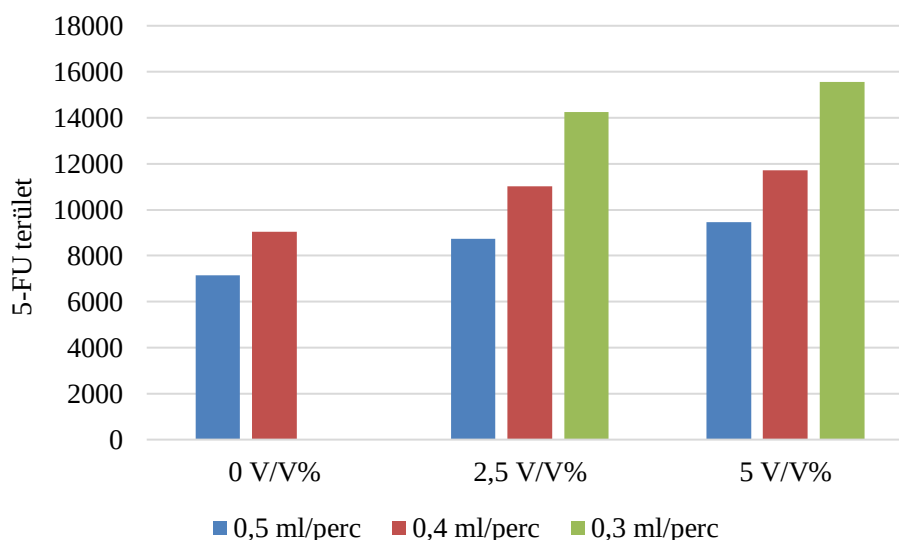
7. ábra – DHFU csúcsmagassága áramlási sebesség és eluensösszetétel függvényében



8. ábra – 5-FU csúcs alapvonal szélességének áramlási sebesség és összetétel függése

A 7. és 8. ábra alapján azt láthatjuk, hogy az áramlási sebességet csökkentve és az acetonitril arányát növelve a csúcsmagasság csökken, ami elsőre ellentétes a detektor karakterisztikájától várt tendenciával, valamint, hogy adott összetételnél, ha csökkentjük az áramlási sebességet vagy növeljük az eluensben az acetonitril mennyiségét az alapvonal szélesség nő. Ezek a látható tendenciák a diffúzióval magyarázhatók, amelynek következményeként az alapvonal szélesség nő és a csúcsmagasság csökken. Ez sajnos esetünkben rontja az érzékenységet annak ellenére, hogy előzetes feltételezésünk alapján a

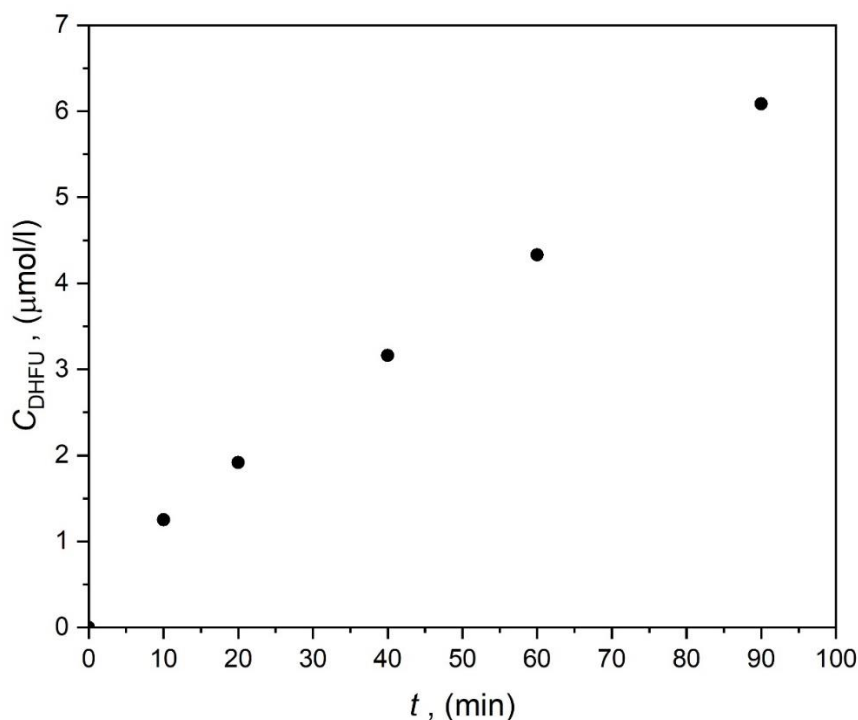
csúcsmagasságnak az áramlási sebesség csökkentésével nőnie kellene. Ezt láthatóan felülírja a diffúzió hatása, ezért sajnos az áramlási sebesség csökkentése nem hozza el nekünk a kívánt javulást. A jelenség ugyanakkor megfigyelhető a 9. ábrán, ahol valóban a csúcs alatti területek növekedését tapasztaltuk az áramlás lassulásával párhuzamosan.



9. ábra – 5-FU jel alatti területének változása áramlási sebesség és összetétel függvényében

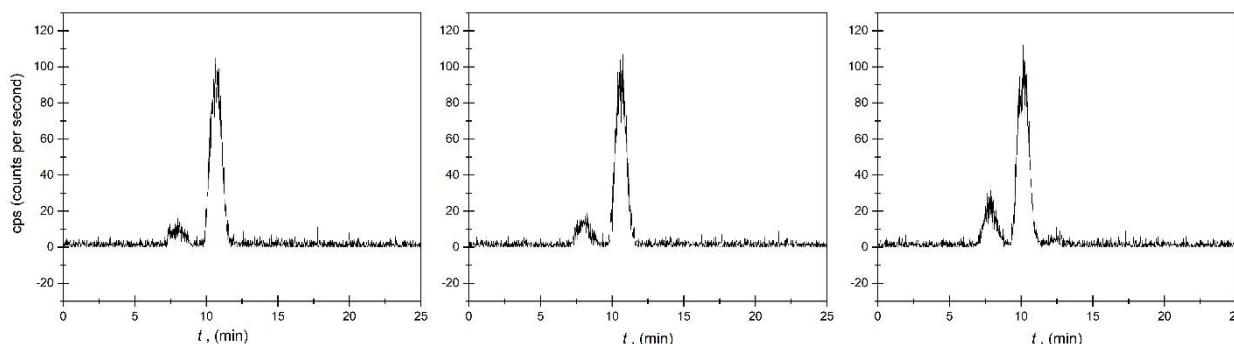
4.2. Enzimreakció inkubálási ideje

Az eredeti protokoll szerint az enzimreakciót 40 percig kell inkubálni 37 °C-on rázatás mellett és az inkubálási idő letelte után jéghideg 96%-os etanollal állítjuk le a folyamatot. A következőkben azt vizsgáltuk, hogy miképp változnak az eredmények az inkubálási idők függvényében 0 és 90 perc között. Az enzimkinetikai legegyszerűbb összefüggései alapján is azt várjuk, hogy növelve az inkubálási időt az enzim nagyobb mértékét fogja átalakítani a gyógyszernek, ezért a DHFU csúcsok nőni fognak, így javul az érzékenységünk.



10. ábra – DHFU koncentráció inkubálási idő függvényében

A **10. ábra** azt mutatja, hogy az inkubálási időt, ha növeljük, akkor az átalakítás mértéke nő, azaz nő a keletkező DHFU mennyisége. Az inkubálási idő változtatása a módszerfejlesztésnél egy egyszerű és könnyen kivitelezhető módja lehet a jel-zaj arány növelésére, de nem érdemes túl hosszú inkubálási időt sem hagyni, mivel az eleve időigényes klinikai diagnosztikai tesztünk elvégzése még hosszabb időtartamot fog igénybe venni. Ezen adatok alapján úgy döntöttünk, hogy a későbbiekben 60 perces inkubálási időtartamokat fogunk hagyni az enzimreakciónak rázatás mellett. A **11. ábrán** a termékcsúcs (8 min retenciós időnél) növekedésével párhuzamosan alig látható mértékben csökkent a kiindulási anyag (5-FU 10,7 min retenciós időnél), amelyből a fentebbi konverziós adatokkal együtt egy fontos következtetést vonhatunk le: Még normál (patológiásnál magasabb) enzimaktivitás esetén is mindössze 15% konverziót értünk el, azaz a teljes enzimreakció alatt megfelelő feleslegben van jelen a reaktáns, biztosítva a lineáris összefüggést enzimaktivitás és termelődő DHFU között. Amennyiben ez nem teljesülne, úgy egy bizonyos enzimaktivitás felett nem áll fenn ez a kapcsolat, tehát nem tudnánk megkülönböztetni nagy aktivitású mintákat.



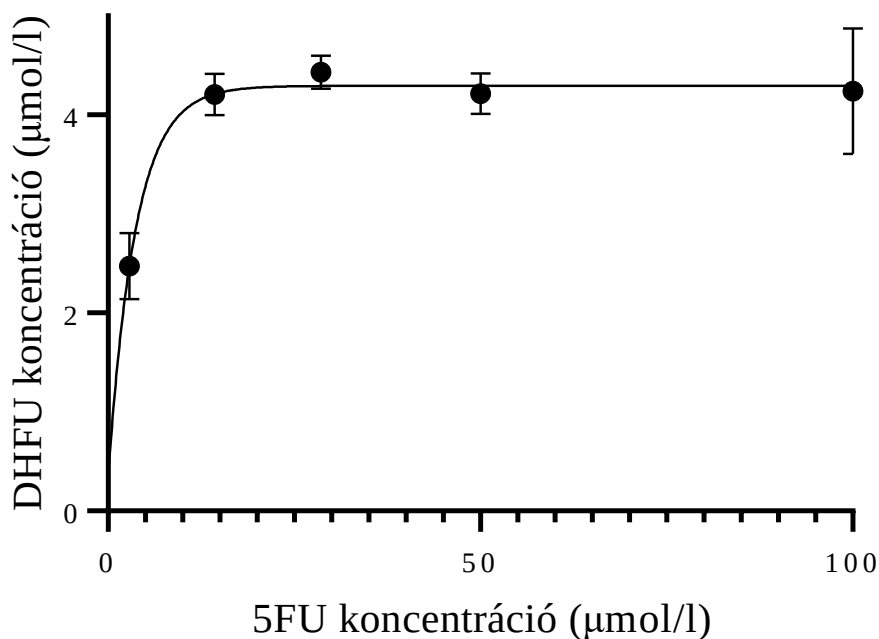
11. ábra –Kromatogramok 40, 60 és 90 perc inkubálási idejű mintáknál – 8 min retenciós időnél a DHFU, 10,7 min retenciós időnél az 5-FU csúcsa látható.

4.3. Szubsztrát koncentráció hatása

A csúcs területét, azaz a keletkezett termék mennyiségét az enzimkinetika segítségével úgy is meg lehet növelni, hogy a reakciósebességi egyenletből kiindulva annak egyes paramétereit változtatjuk. A reakciósebességi egyenlet egy olyan elsőrendű differenciálegyenlet, ami összeköti a reakciósebességet a reagáló anyagok pillanatnyi koncentrációjával. Az enzimkinetika leggyakrabban a Michaelis-Menten mechanizmus alapján magyarázható. Az enzim által katalizált reakció során az enzim aktív centrumába bekötődik a szubsztrát és ez lehetővé teszi, hogy egy kisebb aktiválási energiájú, azaz nagyobb reakciósebességű úton keresztül valósuljon meg a szervezetben lejátszódó biokémiai folyamat. Az enzimreakció mechanizmusa a következő egyenlet szerint fog zajlani:



Ahol E az enzim, S a szubsztrát, ES az enzim-szubsztrát komplex és P a termék. Az enzimből és a szubsztrátból egyensúlyi folyamatként keletkezik (k_1 reakciósebességi együtthatóval) az enzim-szubsztrát komplex, amely egy instabil állapot, így vissza tud alakulni a kiindulási anyagokba (k_{-1} reakciósebességi együtthatóval) vagy tovább alakulhat (k_2 reakciósebességi együtthatóval) a terméké. A reakciósebesség, ha növeljük a kiindulási anyagok koncentrációját növekszik, ezért jelen kísérletben a szubsztrát, azaz az 5-FU koncentrációjának a függvényében vizsgáltuk az átalakulás mértéket, azaz, hogy hogyan változik a DHFU csúcs területe, ha növeljük a szubsztrát koncentrációt, miközben az enzim koncentrációját állandó értéken tartottuk.



12. ábra – DPD enzim által katalizált DHFU termelés kinetikai görbéje

Ezt látjuk a **12. ábrán** is, hogy egy telítési görbét kapunk, azaz bizonyos koncentráció felett változatlan a reakciósebesség, így ellaposodik a görbe. Ez a jelenség azzal magyarázható, hogy a citoszolból kinyert enzim teljes mennyisége bizonyos szubsztrát koncentráció felett telítődik, ezért hiába növeljük azt tovább nincs a rendszerben szabad enzim, így nincs befolyása a reakciósebességre. A másik határfeltétel akkor áll fent, amikor a szubsztrát koncentrációja közel nulla, ekkor a differenciálegyenlet elsőrendű differenciálegyenletre fog egyszerűsödni, azaz a sebesség lineárisan fog függeni a szubsztrát koncentrációtól, ezt mutatja a kezdeti közel lineáris szakasz. A görbe alapján azt látjuk, hogy az általunk alkalmazott 5-FU koncentrációt, ha növeljük sem látunk jelentős sebességnövekedést, így a továbbiakban is ezt az 5-FU koncentrációt fogjuk használni.

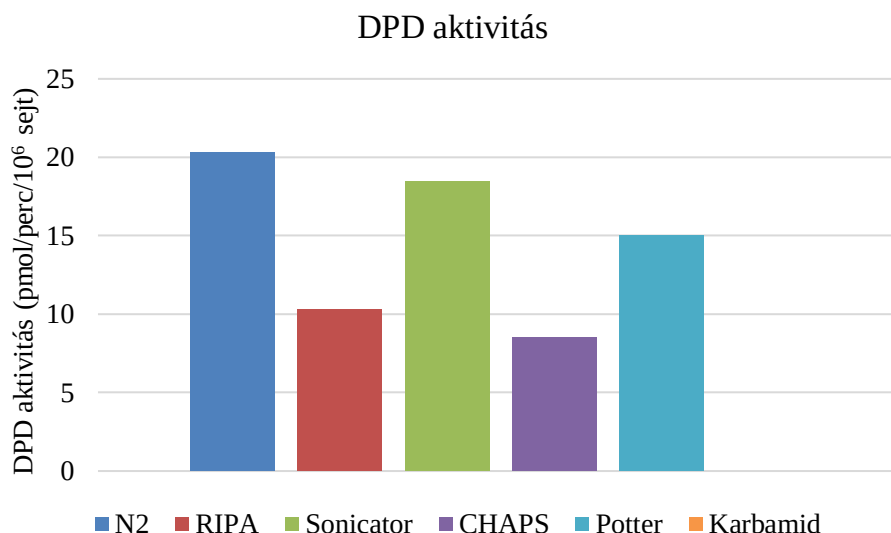
4.4. Sejtfeltérési módszerek

A következőkben különböző lizálási módszereket alkalmaztunk és megvizsgáltuk bicinkonin sav (BCA - Bicinchoninic acid) fehérjekimutatással a lizátum teljes fehérjetartalmát. Megvizsgáltuk a Potter-Elvehjem homogenizátor, a fagyasztás – olvasztás ciklusok és a szonikálás hatását, valamint erős és gyenge detergenset is kipróbáltunk, mint a CHAPS, RIPA és a karbamid.

1. táblázat – Lizátumok fehérjetartalma

Minta	c (mg/ml)
RIPA	0,41
Szonikálás	0,51
Fagyasztás-olvasztás	0,53
CHAPS	0,30
Karbamid	0,31
Homogenizátor	0,45

A BCA teszttel tehát meghatároztuk ugyanannak a limfocita mintának különböző lizálási eljárással megvalósított lizátumának az összes fehérje tartalmát. A homogenizátorral végzett lizálásnál jelentős mintavesztéset tapasztaltunk, ezért nem tudtunk párhuzamos mintákat előkészíteni a BCA mérésre. A mérési adatokból az látszik, hogy a legmagasabb fehérje-szinteket a szonikálással és a fagyasztás-olvasztás ciklussal végzett lizálásnál kaptuk. emellett az is látható, hogy a 8M karbamidos lizálás esetén a többinél alacsonyabb fehérje koncentrációt kaptunk. Mivel a potenciális lízis eljárások közül az eredeti fagyasztás-olvasztás és a szonikálás produkálta a legmagasabb fehérje-koncentrációkat, így ezek használata mellett maradtunk. A Potter-Elvehjem homogenizátor ellen a szignifikáns mintavesztés, míg a detergens-alapú eljárások ellen az alacsonyabb hatékonyság és a denaturációból fakadó potenciális aktivitáscsökkenés szól. Az utóbbit ellenőriztük aktivitásméréssel, amelynek eredményei a **13. ábrán** szerepelnek. Látható, hogy detergens alkalmazása valóban alacsonyabb mért enzimaktivitást eredményezett, a csökkenés mértéke azonban nem összemérhető a korábban mért fehérjeszint csökkenéssel, hanem annál jelentősebb. Ez a különbség azonban könnyen magyarázható a fentebb említett denaturáló hatással, amely látványosan jelentkezett 8M karbamid esetén, ahol nem tudtunk érdemi enzimaktivitást sem mérni.

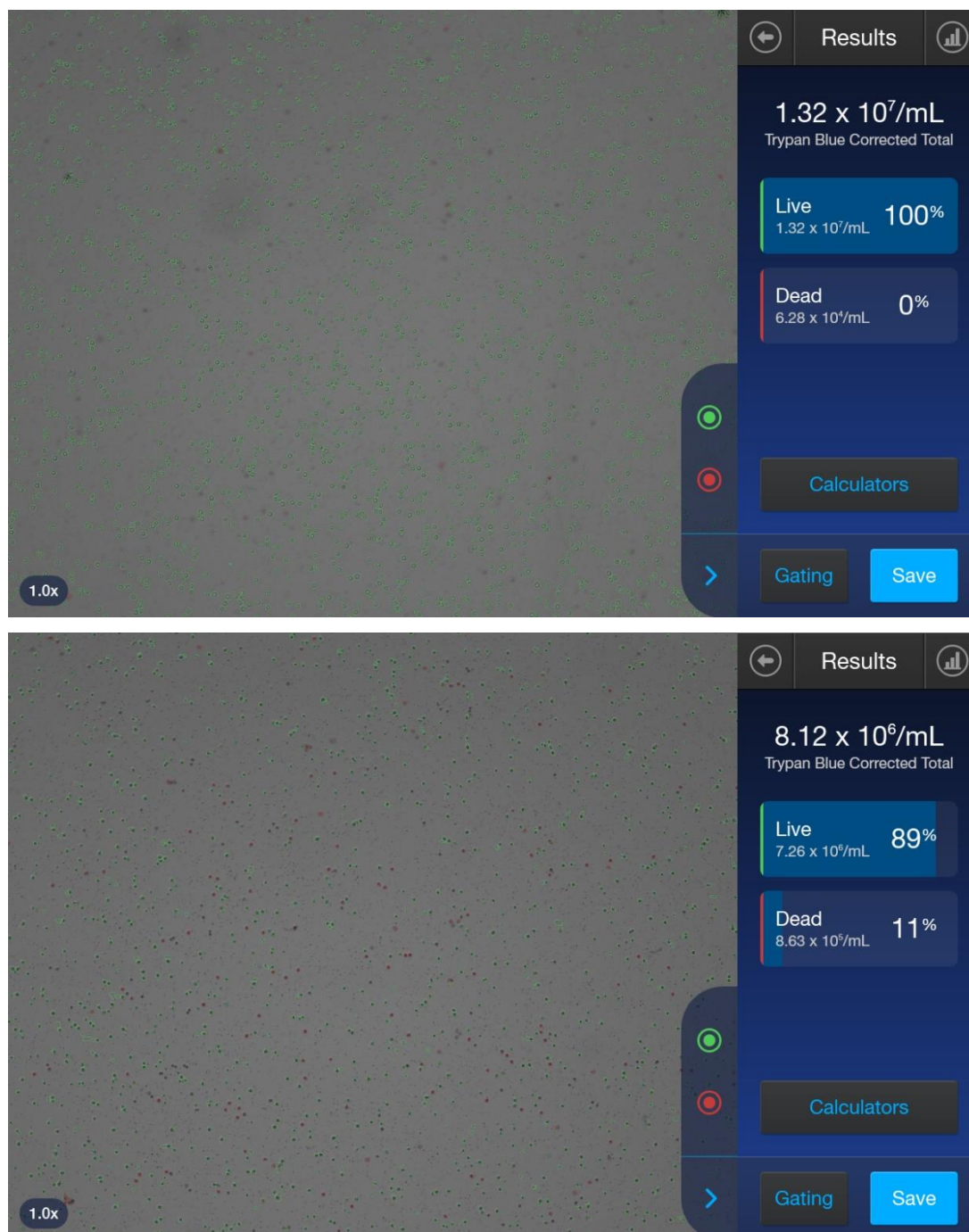


13. ábra – Különböző lizálási eljárások hatása a mért DPD aktivitásra

4.5. Limfociták szeparálása

A következőkben a limfocita szeparálás körülményeit vizsgáltuk meg, azaz, hogy bizonyos változtatások hogyan hatnak a limfociták elválasztásának a hatékonyságára, azok számára és tisztaságára. A következőkben négy különböző módon szeparált limfocita szuszpenziót készítettünk ugyanazon friss vérmintából, majd áramlós citometria segítségével vizsgáltuk azokat: **A minta:** szeparálása az alapmódszer szerint történt, **B minta:** 400g centrifugálásokat alkalmaztunk minden lépésnél, **C minta:** az eritrociták lizálását egy alternatív protokoll alapján csináltuk hipotóniás sóoldattal, **D minta:** a 10 perc ammónium-kloridos lizálás szobahőmérsékleten történt meg. A C minta esetén első lépésben egy 0,2 %-os NaCl oldatot adtunk a limfocitákhoz, majd pontosan 30 másodperc után 1,6 %-os NaCl oldat segítségével állítottuk vissza az izotóniás környezetet. Ez a módszer szintén az ozmotikus sokk létrehozásán alapszik. A végső mosást követően nem Hanks' oldatba tettük a limfocitákat, hanem 1 ml „kiegészített PBS” oldatba, mivel élő sejteket szeretnénk vizsgálni, amihez nélkülözhetetlen a glükóz jelenléte az oldatban. Az áramlási citometriás mérés előtt automata sejtszámlálóval számoltuk meg, hogy mekkora sejtkoncentráció található a mintában. A méréshez Thermo Fisher Scientific Countess 3 típusú automatizált sejtszámlálót alkalmaztunk. Sejtsuszpenzió és tripánkéék festék 1:1 arányú keverékét mértük rá a készülékhez tartozó chamber slide -ra. A tripánkéék egy életképességet vizsgáló festék, amely azon alapszik, hogy csak olyan sejtek membránján tud behatolni, amik permeábilisek számára. Normál körülmények között az élő sejtek membránja nem permeábilis, ezért a festék nem jut be a sejten belülre. Ezek a sejtek, tehát az élő sejtek

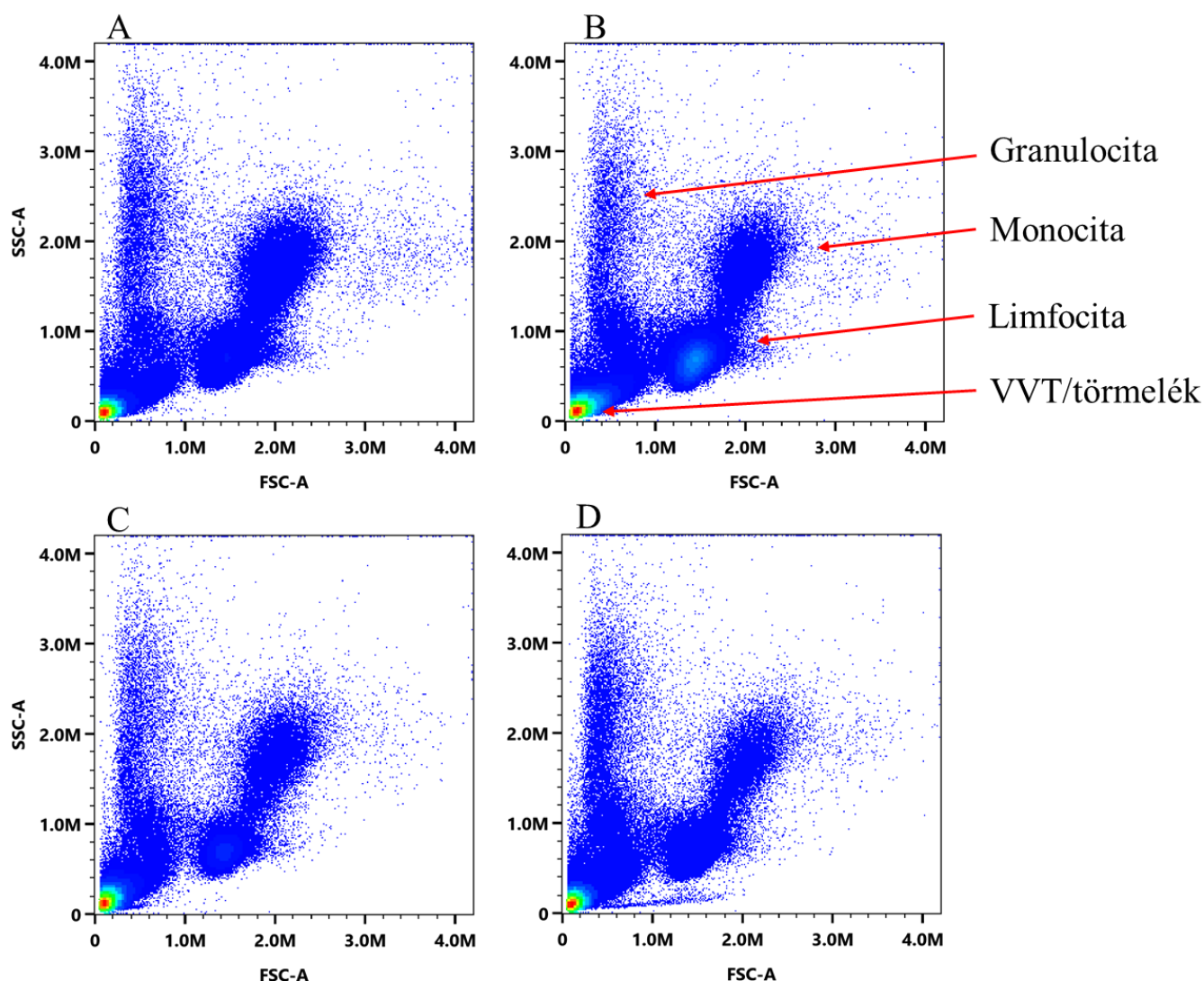
nem festődnek meg, míg a haldokló sejtek permeábilissá váló membránján keresztül a festék behatol és sötétnek látszanak ezek a sejtek.



14. ábra – B (felül) és C (alul) minták Countess 3 automata sejtyszámlálóval készített képei

A készülék az azonosított élő sejteket a mikroszkópos képen zölddel, az elhalt sejteket pirossal jelöli.

A mérések során azt láttuk, hogy **A** esetben: 8,6 millió; **B** esetben 13,2 millió; **C** esetben: 7,26 millió, valamint **D** esetben 9,65 millió élő sejtet számolt össze a készülék 1ml térfogatra vonatkoztatva. A **C** esetben azt tapasztaltuk, hogy nagyon erőteljes módszer a vörösvértestek lizálásra alkalmazott 0,2 %-os NaCl-lel megvalósított ozmotikus sokk, mivel nem csak a vörösvértestek, de a limfociták életképességére is negatív hatással van, ami a **14. ábrán** is jól látható. Korábban granulociták szeparálására sikeresen alkalmazták, viszont a jelen példa azt mutatja, hogy limfocitákat tartalmazó minták esetén ez nem alkalmazható. Továbbá az is észrevehető, hogy a centrifugálás során alacsonyabb g-t alkalmazva több sejtet tudunk elválasztani, azaz a szeparálásunk hatékonyabb. Az **A** és a **D** módszer esetében nem tapasztaltunk jelentősebb eltérést. Az áramlásos citometriában a 10 millió sejt az ideális egy milliliter térfogatban, ezért az ennél lényegesen több sejtet tartalmazó mintákat arányosan erre a koncentrációra hígítottuk „kiegészített PBS” oldat segítségével. A négy különböző szeparálással elkészített sejtszuspenzióknk mellett vizsgáltunk egy antitest mentes kontrol mintát, ami semmilyen kezelést nem kapott, egy CD3 antitesttel, egy CD4 antitesttel, egy CD8 antitesttel jelölt, egy propidium-jodiddal kezelt kontrol mintát, valamint egy olyan mintát, ami mindegyik jelölést megkapta. Mindegyik antitesttel jelölendő minta esetén vettünk egy centrifugacsövet és belemérünk 100 µl sejtszuspenziót, valamint 2-2 µl antitestet. Miután a sejtszuspenziók megkapták a megfelelő antitestet, 30 percig szobahőmérsékleten, fénytől elzárva hagytuk, hogy lejátszódjon az immunológiai jelölésük. Az inkubálást követően 400g mellett 5 percig centrifugáljuk szobahőmérsékleten a sejteket, hogy utána eltávolítsuk a specifikusan nem kötött antitesteket. A centrifugálást követően eltávolítottuk a felülúszó folyadékot, majd 300 µl „kiegészített PBS” oldatot öntöttünk a centrifugacső alján maradt szuspenzióra. Ahhoz, hogy jól detektálható jelet kapjunk a propidium-jodidos kontrol minta esetében, azt 60 °C-on inkubáljuk 15 percig, amely a sejtek életképességének az elvesztését okozza.



15. ábra –Áramlási citometriás pontdiagrammok előre irányuló és oldalirányú szórás ábrázolásával. Az ábrán feltüntettük az egyes populációkat, amelyek közül a limfocitákat CD3, CD4 és CD8 jelöléssel is megerősítettünk.

A **15. ábra** alapján megállapítható, hogy a tisztítási eljárás során a várt limfociták mellett több egyéb frakció is megjelent, mint a monociták vagy a vörösvértestek és sejtörmelék, míg granulociták csak kis mennyiségben jelentek meg a szuszpenziókban. Minden mintára igaz sajnos, hogy az összes detektált esemény 80-97%-a kis méretű részecske, vélhetően maradék VVT vagy sejtörmelék. A 16. táblázattal együtt több megfigyelést is tehetünk a tisztítási procedúránkkal kapcsolatban:

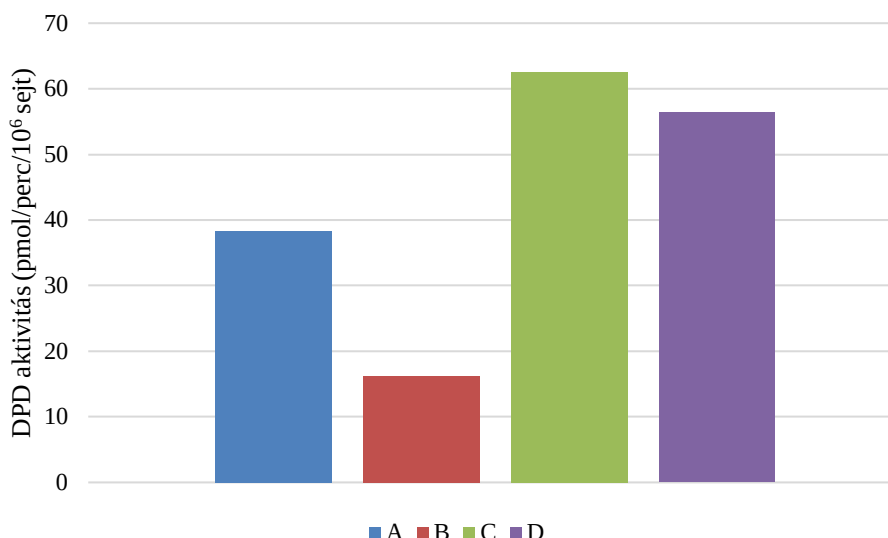
A **C** mintában tapasztalt erőteljes lízis hatása itt is jól látható, hiszen nem csak az összes detektált esemény száma, de a limfociták száma is jóval alacsonyabb, mint a többi mintában. A **D** minta esetében, ahol vörösvértestek szempontjából szelektívebb, ám az alaplódszernél erőteljesebb lízist alkalmaztunk, bár az összes esemény nem csökkent lényegesen, limfocitaszámban sajnos az alulmaradt az **A** és **B** mintákhoz viszonyítva.

Érdekes megfigyelni azonban a **B** minta számait a **2. táblázatban**, valamint a **15. ábrán** található diagrammot. Mindkettőből jól kivehető, hogy a limfociták aránya jóval magasabb a többi három mintához viszonyítva, valamint, hogy a teljes esetszám jóval alacsonyabb, mint az **A** és **D** mintákban. Ezt a megfigyelést a sejtszámlálás is megerősíti, ugyanis ott is magasabb mononukleáris sejtkoncentrációt mértünk. Ezek alapján joggal feltételezhetjük, hogy számunkra legelőnyösebb lépés a centrifugálási lépés felülvizsgálata, amellyel nagyobb sejtszámokat, tisztább sejtszuspenziót nyerhetünk ezzel növelve az érzékenységünket.

2. táblázat Áramlási citometriával meghatározott frakciók és sejtpopulációk

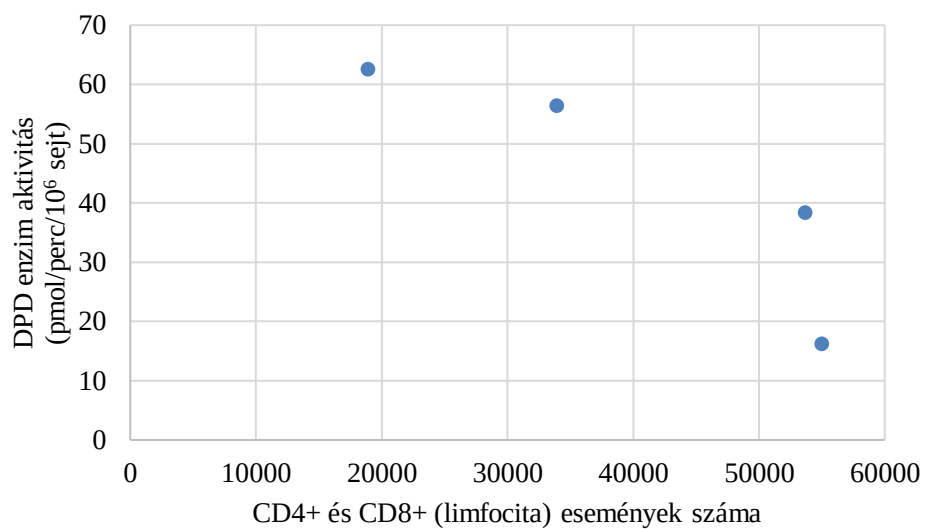
Minta	A	B	C	D
Teljes eseményszám	1 541 376	395 760	415 968	1 495 976
Limfocitaszám (CD4+,CD8+)	51 656	52 244	18 158	32 728
Limfocita arány	3,35%	13,20%	4,37%	2,19%
Monocitaszám	29 983	16 034	14 126	11 160
VVT/sejttörmelék száma	1 415 323	278 738	353 116	1 415 653
VVT/sejttörmelék aránya	91,8%	70,4%	84,9%	94,6%

A citometriás mérések kiegészítéseként a különböző mintákból elvégeztük azok aktivitásmérését is feltételezve, hogy azoknak a meghatározott limfocitaszámokkal kell korrelálniuk. A **2. táblázat** látható eredmények azonban nem hozták a várt összefüggést.



16. ábra – Mért DPD enzimaktivitások különböző limfocitaszeparálási protokollok mellett

A mért aktivitásokat korreláltatva a citometriás mérésből nyert limfocitaszámmal éppen ellentétes összefüggést találtunk a várttal szemben a **17. ábrán** látható módon. Ennek az ellentmondásnak a feloldásához érdemes felidézni az egyes sejttípusok irodalomban már közölt fajlagos DPD aktivitását, valamint megvizsgálni a **15. ábrán** látható mért sejtpopulációkat. Itt jól megfigyelhető, hogy jelentős számban vannak jelen monociták is a tisztított sejtszuspenziókban, amelyeknek fajlagos DPD aktivitása (expressziója) jóval magasabb, mint más sejttípusoké. Mivel az aktivitásmérés során Türk-oldattal mért sejtszámra normáljuk a kapott eredményt, amely mindkét sejttípus jelölésére alkalmas, így a monocita-limfocita arány, amely változhat az egyes mintaelőkészítési protokollok között, vélhetően befolyásolja a mért aktivitásunkat. Mivel a citometriás mérés során nem alkalmaztunk monocitára specifikus antitesteket, ezért azok számát teljes bizonyossággal nem tudtuk meghatározni a mérésünkből, mindössze becslésre volt lehetőségünk méretük alapján. A jövőben azonban mindenképpen ilyen irányban kívánunk tovább haladni a kísérleteinkkel és meghatározni a két sejttípus aránya és amért aktivitás közötti összefüggést. A módszer eredetileg a jel maximálásának figyelembevételével lett beállítva, anélkül, hogy az egyes sejtpopulációkat vizsgálták volna. Ez helyes megközelítés, hiszen valós körülmények között a kezelt beteg vérében lévő összes, DPD aktivitással rendelkező sejt részt vesz a kemoterápiás szer katabolizmusában, nem csak a limfociták. A már hivatkozott sejttípusok fajlagos DPD aktivitását tárgyaló cikk alapján ugyanakkor az is látható, hogy amíg a monociták fajlagos aktivitása, tehát a sejteken belül a DPD expressziója széles skálán változhat, addig a limfociták esetében ez az expressziós szint viszonylag stabil, szűk eloszlású, tehát a mérések is reprodukálhatóbbak és jobban jellemzik az enzimre vonatkoztatott fajlagos aktivitást.



17. ábra – Mért DPD aktivitások a citometriásan mért limfocitaszám függvényében különböző limfocita szeparálási protokollok mellett

5. Összefoglalás

Munkánk célja volt, hogy a jelenleg alkalmazott DPD enzimaktivitást mérő protokoll különböző paramétereit megvizsgáljuk annak érdekében, hogy javítsunk a módszer érzékenységén, reprodukálhatóságán és megbízhatóságán a patológiás tartományban, ahol csökkentett enzim aktivitásról beszélünk. Az érzékenység javításának potenciális eszköze a kötött analitikai berendezés mellett a detektálandó termék koncentrációjának növelése volt, amelyet a kromatográfiás paraméterek optimalizálásán túl az enzimreakció és az azt megelőző mintaelőkészítési protokoll javításával kívántunk elérni.

A kromatográfiás elválasztás felülvizsgálata során változtatva az eluensösszetételt és az áramlási sebességet azt találtuk, hogy 100% vizes puffer helyett 2,5% acetonitrilt tartalmazó izokratikus elúciót érdemes alkalmaznunk, ami előnyösebb egy C18 állófázisú kolonnánál, kedvezően hat a kolonna élettartamára, teljesítőképességére az elválasztás hátrányos befolyásolása nélkül. Elválasztásunkat átültettük egy alternatív, 100% vizes eluenssel kompatibilis poláris C18 oszlopra is, amelyen az eredeti 2 csúcsunk mellett egy további termékcsúcs jelent meg, amit az új állófázis poláris szelekciója okozott. Az alkalmazott új oszlopnál azonban sajnos technikai problémák akadtak az állófázis stabilitásával, ezért a munkát a megszokott fordított fázisú kolonnán folytattuk. Újabb poláris kolonna beszerzését követően tovább kívánjuk folytatni ezt a fejlesztési vonalat, amelynek része a módszer LC-MS kompatibilissé tétele és ezt követően az újonnan megjelent termékcsúcs vagy termékcsúcsok tömegspektrometriás azonosítása.

Az enzimreakció felülvizsgálata során az inkubálási időnél a vártaknak megfelelően azt tapasztaltuk, hogy azt megnövelve jelentősen emelkedett a DHFU mennyisége, ezáltal kedvezőbb jel-zaj arányt kaptunk. Az inkubálási idő megnövelése egy könnyen kivitelezhető megoldás lehet a későbbiekben a módszer hatékonyságának a növelése érdekében, itt azonban a megnövekedett mintaelőkészítési idő miatt nincs lehetőségünk korlátlan jelnövelésre. A szubsztrát-koncentráció növelése nem vezetett megnövekedett termék-koncentrációhoz, tehát már így is egy szubsztráttal telített enzimrendszerrel van dolgunk, emiatt itt nincs lehetőségünk további jelnövelésre. Vizsgáltuk még a limfociták lízisére alkalmazott eljárás hatékonyságát alternatív sejtfeltárási módszerek mellett, fehérjeméréseink és az aktivitásadatok alapján a módszer eredeti, fagyasztást-olvasztás alapú lízise a szonikáláshoz hasonlóan biztosította a lehető legjobb hatásfokot, míg a detergenses módszerek ezeknél gyengébben teljesítettek.

A módszer limfocita szeparálási lépésének vizsgálata során az áramlási citometriás mérések azt mutatták, hogy alacsonyabb centrifugálási g-k esetén jóval nagyobb százalékban tartalmaz limfocitákat a

sejtszuspenziónk, azaz kevesebb sejtörmelék vagy hemolízisen át nem esett vörösvértestet tartalmaz, ezzel szemben a mért enzimaktivitás jóval alacsonyabbnak adódott várakozásunkkal szemben. Ennek látszólagos feloldására vizsgáltuk más citometriás paraméterekkel való korrelációját, amely során arra jutottunk, hogy a látszólagos anomália oka monociták jelenléte a tisztított sejtszuspenzióban, amely irodalmi adatok alapján magasabb fajlagos DPD expressziója miatt okozója lehet ennek a jelenségnek.

Munkánkat tervezzük tovább folytatni, amely során a módszert átültetjük poláris C18 állófázisú elválasztásra, amelyet LC-MS kompatibilis módon szeretnénk megvalósítani, majd szeretnénk azonosítani az esetlegesen megjelenő további reakciótermékeket is. Emellett szeretnénk ugyanezen platformon beállítani egy metabolomikai módszert is plazma Uracil/dihidouracil és timin/dihidrotimin mérésre az aktivitásmérés eredményeink kiegészítésére. Ezen túl szeretnénk még mélyebben vizsgálni a limfocita szeparálási protokollunkat és alaposan körbejárni, mely sejtípusok felelősek leginkább az általunk mért enzimreakcióban a tapasztalt aktivitásért.

6. Köszönetnyilvánítás

Köszönöm az Országos Onkológiai Intézetnek és Prof. Dr. Polgár Csaba főigazgatónak, hogy lehetőséget adtak, hogy ebben az intézményben készíthessem el Tudományos Diákköri Dolgozatomat. Ezen belül is köszönöm Kovács Juditnak, Akacs Beátának, Kapuvári Bencének, Susztrik Beatrixnak, Képiró Évának, Szántó Noéminak és Dr. Gyöngy Zsuzsannának a rengeteg segítséget és hogy bármikor fordulhattam hozzájuk.

Köszönettel tartozom témavezetőimnek Dr. Ditrói Tamásnak és Prof. Dr. Nagy Péternek a rengeteg türelmet, jó tanácsot és hogy mindenben támogattak.

Végezetül köszönöm a családomnak, hogy végig mellettem álltak.

7. Irodalomjegyzék

- 1 Polgár, Cs., *Onkológia és Sugárterápia*, Semmelweis Kiadó, 2019, 68-75
- 2 Tulassay, Zs., Matolcsy, A., *Az onkológia tankönyve*, Semmelweis Kiadó, **3**, 2011, 157-162
- 3 Ghafouri-Fard, S., Abak, A., Tondro Anamag, F., Shoorei, H., Fattahi, F., Javadinia, S. A., Basiri, A., & Taheri, M., *Frontiers in Oncology*, **11**, 2021
- 4 Pinedo, H.M., Peters G.F., *Journal of Clinical Oncology*, **6**, 1988, 1653–1664
- 5 Coenen, M., Paulussen, A., Breuer, M., Lindhout, M., Tserpelis, D., Steyls, A., Bierau, J., van den Bosch, B., *Current Therapeutic Research*, **90**, 2019, 1-7
- 6 van Kuilenburg, A.B.P., Meijer, J., Meinsma, R., Pérez-Dueñas, B., Alders, M., Bhuiyan, Z.A., Artuch, R., Hennekam, R.C.M., *Department of Paediatrics, Obstetrics and Gynaecology, and Preventive Medicine and Public Health*, **45**, 2019, 65-69
- 7 <https://www.ema.europa.eu/en/medicines/dhpc/5-fluorouracil-iv-capecitabine-tegafur-containing-products-pre-treatment-testing-identify-dpd#documents-section> (2024.11.12.)
- 8 Paulsen, N.H., Qvortrup, C., Vojdeman, F.J., Plomgaard, P., Andersen, S.E., Ramlov, A., Bertelsen b., Rossing, M., Nielsen, C.G., Hoffmann-Lücke., E., Greibe E., Holm, H.S., Nielsen, H.H., Lolas, I.B.Y., Madsen, J.S., Bergmann, M.L., Mørk, M., Fruekilde, P.B.M, Bøttger, P., Petersen, P.C., Nissen, P.H., Feddersen, S., Bergmann, T.K., Pfeiffer, P., Damkier, P., *Acta Oncologica*, **61**, 2022, 1400-1405
- 9 Ádám, V., *Orvosi Biokémia*, Medicina Könyvkiadó Zrt., 2006, 413
- 10 <https://www.cancer.gov/publications/dictionaries/genetics-dictionary/def/splice-site-mutation> (2024.11.12.)
- 11 Deac, A.L., Burz, C.C., Bocşe, H.F., Bocşan, I.C., Buzoianu A. D., *Medicine and Pharmacy Reports*, **93**, 2020, 223-230
- 12 van Staveren, M.C., Theeuwes-Oonk, B., Guchelaar, H.J., van Kuilenburg, A.B.P., Maring, J.G., *Cancer Chemotherapy and Pharmacology*, **68**, 2011, 1611–1617
- 13 Mattison, L.K., Ezzeldin, H., Carpenter, M., Modak, A., Johnson, M. R., Diasio R. B., *Clinical Cancer Research*, **10**, 2004, 2652–2658
- 14 Cunha-Junior, G.F., De Marco, L., Bastos-Rodrigues, L., Bolina, M.B., Linhares, M., Pianetti, G.A., Cesar, I.C., Coelho, L.G., *Cancer Chemotherapy and Pharmacology*, **72**, 2013, 1273–1282
- 15 Carlsson, G., Odin, E., Gustavsson, B., Wettergren, Y., *Cancer Chemotherapy and Pharmacology*, **74**, 2014, 757–763

- 16 Fleming, A.R., Milano, G., Thyss, A., Etienne, M., Renée, N., Schneider, M., Demani, F., *American Association for Cancer Research*, **52**, 1992, 2899–2902
- 17 Van Kuilenburg, A., van Lenthe, H., Blom, M. J., Mul, E.P.J., Van Gennip, A.H., *British Journal of Cancer*, **79**, 1999, 620–626
- 18 Chernyshev, A. V., Tarasov, P.A., Semianov, K.A., Nekrasov, V.M., Hoekstra, A.G., Maltsev, V.P., *Journal of Theoretical Biology*, **251**, 2008, 93-107
- 19 Islam, M. S., Aryasomayajula A., Selvaganapathy P. R., *Micromachines*, **8**, 2017, 83
- 20 Shen, C., *Diagnostic Molecular Biology*, **2**, 2013, 127-156
- 21 Damjanovich, S., Fidy, J., Szöllősi, J., *Orvosi Biofizika*, Medicina Könyvkiadó Zrt., 2007, 422-435
- 22 Krenács, T., Bödör, Cs., Matolcsy A., *Patológiai és Molekuláris onkodiagnosztikai módszerek*, Medicina Könyvkiadó Zrt., 2021, 265-286
- 23 Azwar, S., Seow, H.F., Abdullah, M., Jabar, M. F., Mohtarrudin, N., *Biology*, **10**, 2010, 854