

SOUČASNÝ STAV TESTOVÁNÍ CHEMOREZISTENCE NÁDORŮ EX VIVO V MASARYKOVĚ ONKOLOGICKÉM ÚSTAVU V BRNĚ

ACTUAL STATE OF EX VIVO CHEMORESISTANCE TESTING OF MALIGNANT TUMORS IN MASARYK MEMORIAL CANCER INSTITUTE BRNO

POPRACH A.¹, MICHALOVÁ E.², PAVLÍK T.³, LAKOMÝ R.¹, VYSKOČIL J.¹, NĚMEČEK R.¹, ŽALOUDEK J.⁴, VYZULA R.¹, KOCÁK I.¹, KOCÁKOVÁ I.¹

¹ KLINIKA KOMPLEXNÍ ONKOLOGICKÉ PÉČE, MASARYKŮV ONKOLOGICKÝ ÚSTAV, BRNO

² ODDĚLENÍ ONKOLOGICKÉ A EXPERIMENTÁLNÍ PATOLOGIE, MASARYKŮV ONKOLOGICKÝ ÚSTAV, BRNO

³ INSTITUT BIostatistiky A ANALÝZ, MASARYKOVA UNIVERZITA, BRNO

⁴ ODDĚLENÍ CHIRURGICKÉ ONKOLOGIE, MASARYKŮV ONKOLOGICKÝ ÚSTAV, BRNO

Souhrn

Testování chemorezistence nádorů *ex vivo* přináší výsledky, které mohou být aplikovány při rozvaze o podání chemoterapie. V srpnu 2006 byl na našem pracovišti (Masarykův onkologický ústav) stanoven protokol o provádění testu chemorezistence a definovány skupiny diagnóz a stádií onemocnění, u kterých se bude test provádět. Jedná se o metastazující maligní melanom, sarkom měkkých tkání primární a/nebo recidivující či metastatický, renální karcinom primární nebo metastatický, relabující karcinom ovaria a tzv. „skupina diagnóz na přání klinika“. V období od září 2006 do listopadu 2007 bylo odebráno k testování chemorezistence celkem 25 vzorků maligního melanomu (u 9-ti z nich byly získány reprodukovatelné výsledky), 29 vzorků sarkomu (výsledky získány u 11-ti odběrů), 36 vzorků renálního karcinomu (výsledky získány u 20-ti z nich) a 16 vzorků ovariálního karcinomu (výsledky získány u 11-ti vzorků). *Ex vivo* zachycená citlivost k určitému cytostatiku nemusí ještě nutně znamenat citlivost nádoru *in vivo*, zatím však nebyla zaznamenána situace zjištěné rezistence *ex vivo* a následné citlivosti nádoru *in vivo*. Obecným problémem při aplikaci výsledků chemorezistence je polyklonálnost solidních tumorů, složitost metabolismu člověka a nejistota kultivace právě maligních buněk a nikoliv např. buněk stromálních, benigních. Řádnému statistickému zhodnocení a klinické aplikaci výsledků testu chemorezistence na našem pracovišti zatím brání malý počet hodnotitelných vzorků.

Klíčová slova: chemorezistence, MTT test, cytostatika, maligní melanom, sarkom měkkých tkání, renální karcinom, karcinom ovaria

Summary

Chemoresistance assay results may play a role in cancer management decision process. Since August 2006 testing chemoresistance has been tested according to a protocol that was designed for this reason in our institute (Masaryk Memorial Cancer Institute). Five groups of different types of cancer in particular clinical stages were defined for chemosensitivity testing with: 1. metastatic malignant melanoma, 2. soft tissue sarcoma (STS), either primary or recurrent/metastatic, 3. primary or metastatic renal cancer, 4. recurrent ovarian cancer and 5. other diagnosis „on clinician's request“. In the period from September 2006 to November 2007, 25 samples of malignant melanoma (reproducible results in 9 cases), 29 samples of STS (relevant data in 11 cases), 36 samples of renal cancer (relevant results in 20 samples) and 16 samples of ovarian cancer (reproducible results in 11 cases) were acquired. Sensitivity to certain chemotherapy agent observed *ex vivo* does not necessarily mean that the cancer would also be sensitive to the same agent *in vivo*, however, *ex vivo* resistance with following *in vivo* sensitivity of the tumour has not been observed to date. The cultivation of malignant cells is very uncertain in solid tumours, which consist of several malignant cell multiclones (benign/stromal cells may out-grow malignant cells). This cultivation uncertainty as well as the unique complexity of human metabolism makes clinical application of chemoresistance testing at least very questionable. The small number of successfully evaluated samples has not yet provided us to carry out proper statistical evaluation and clinical application.

Keywords: chemoresistance, MTT test, cytostatics agents, malignant melanoma, soft tissue sarcoma, renal carcinoma, ovarian carcinoma

Úvod, metoda a výsledky

Testování chemorezistence vzorků *ex vivo* za pomoci tetrazoliového testu (MTT test) probíhá v Masarykově onkologickém ústavu v Brně (MOÚ) již po dobu několika let. V srpnu 2006 byl ustanoven protokol a byly určeny diagnózy v určitých stádiích, u kterých se bude MTT test provádět. Ve spolupráci s Institutem biostatistiky a analýz Masarykovy univerzity v Brně byly určeny tzv. kritické scénáře, které umožní

lepší statistické zpracování výsledných klinických dat. V neposlední řadě došlo k optimalizaci vlastního zpracování vzorků nádorů a hodnocení získaných laboratorních dat.

Stanovení citlivosti k vybraným chemoterapeutikům je nyní prováděno u následujících 5-ti skupin diagnóz:

1.) Metastazující maligní melanom u pacientů s předpokladem podání chemoterapie, u nichž je k dispozici ložisko nebo výpotek vhodný k vyšetření.

2.) Sarkom měkkých tkání primární a/nebo recidivující či metastatický, opět u pacientů s předpokladem podání chemoterapie.

3.) Renální karcinom primární nebo metastatický.

4.) Karcinom ovaria. Zde se původní požadavek omezující provádění MTT testů pouze u relabujícího karcinomu postupně změnil na testování vzorků u všech patientek s karcinomem ovaria, u nichž se předpokládá podání chemoterapie (tj. od stádia FIGO IIIa a výše).

5.) Zvláštní skupinu tvoří „diagnózy na přání klinika“. Do této skupiny se řadí vzorky pacientů, u nichž si okolnosti v průběhu léčby vyžádaly stanovení citlivosti k vybraným chemoterapeutikům. (Blíže bude zmíněno v další části článku.)

Metoda stanovení chemorezistence *ex vivo* začíná odběrem dostatečného množství materiálu (co největší objem nádorové tkáně, nebo až 500 ml výpotku - ascites, fluido-thorax). Vzorek je dále upravován za sterilních podmínek s cílem získat suspenzi obsahující $0,5-1 \times 10^6$ uvolněných živých buněk v 1 ml. Suspenze je barvena roztokem Trypan Blue (Invitrogen Corp.) a počítáním buněk v Bürkerově komůrce (Meopta) je hodnocen počet živých izolovaných buněk (živé buňky nejsou barveny a v mikroskopu se jeví světle žluté; do mrtvých buněk barva proniká a jsou tedy modré). Buňky jsou následně kultivovány s cytostatiky v 96-ti jamkové desce po dobu tří dnů při 37°C s 5 % CO_2 . Každé cytostatikum je hodnoceno v šesti sestupných koncentracích v duplikátu vždy v přítomnosti negativní (samotné kultivační médium) a pozitivní kontroly (kultura buněk bez cytostatika). Pro každou diagnózu bylo zvoleno spektrum testovaných cytostatických látek a jejich preference a to pro případ, že množství izolovaných buněk není dostačující pro hodnocení všech cytostatik.

Maligní melanom: 1. dakarbazin, 2. cisplatina, 3. karmustin, 4. bleomycin, 5. vinblastin, 6. karboplatina.

Renální karcinom: 1. 5-fluorouracil, 2. gemcitabin, 3. vinblastin, 4. karboplatina.

Karcinom ovaria: 1. paklitaxel, 2. cisplatina, 3. karboplatina, 4. topotekan, 5. gemcitabin, 6. doxorubicin.

Sarkom měkkých tkání: 1. doxorubicin, 2. cisplatina, 3. etoposid, 4. docetaxel, 5. vinkristin, 6. dakarbazin.

Po skončení kultivace je do každé jamky přidán roztok substrátu MTT (3-[4,5-dimethylthiazol-2-yl]-2,5-diphenyltetrazolium bromid) (Sigma-Aldrich Inc.) nebo WST-1 (4-[3-(4-iodophenyl)-2-(4-nitrophenyl)-2H-5-tetrazolio]-1,3-benzen disulfonát), který je u živých buněk redukován na temně červenohnědý formazan. Intenzita zbarvení je finálně hodnocena spektrofotometricky při vlnové délce 570 nm (MTT) nebo 450 nm (WST-1). Reakce probíhá na mitochondriální membráně živých buněk a hodnota absorbance tedy odpovídá množství buněk přežívajících v prostředí účinné látky. Získaná data pro každé cytostatikum jsou následně vyhodnocena v programu Chemorezist 1.0 a znázorněna jako křivka dávkové závislosti, z níž lze odečíst hodnotu efektivní koncentrace smrtící 50 % buněk (EC_{50}). Z grafu lze rovněž odečíst, jaký podíl populace přežívá i nejvyšší hodnocenou (terapeuticky nepoužitelnou) koncentrací cytostatika. Vlastní interpretace nálezů je pak udávána v číselné podobě a to:

- Rezistentní: $\text{EC}_{50} > 1/16 \times \text{maximální hodnocená koncentrace použitého cytostatika } (c_{\text{max}})$

- Částečně citlivý: $\text{EC}_{50} = 1/16 - 1/32 \times c_{\text{max}}$
- Citlivý: $\text{EC}_{50} < 1/32 \times c_{\text{max}}$ nebo též citlivost celé populace buněk

Podrobnosti o metodě přináší článek Michalová a kol. (1). Hlavním úskalím testu chemosenzitivity u solidních nádorů je větší či menší polyklonálnost buněčné populace ve vzorku a tedy určitá nejistota, zda je skutečně finálně hodnocena metabolická aktivita pomnožených maligních buněk a nikoliv například fibroblastů nebo jiných mezenchymálních či epiteliálních buněk. Vzhledem k faktu, že vzorky pocházejí většinou od pacientů s pokročilým solidním tumorem, je jasné, že hodnocená nádorová populace je již značně početná a tudíž i heterogenní (2). Došlo tedy již ke klonální divergenci a nádor je složen z mnoha různých více či méně agresivních klonů v odlišných fázích buněčného cyklu. V literatuře se uvádí dělení buněk nádorové populace do tří skupin: 1. buňky diferencované, které ztratily další reprodukční potenciál, 2. buňky schopné dělit se, nacházející se v určité fázi buněčného cyklu a 3. buňky schopné dělit se, ale spočívající ve fázi G0 buněčného cyklu (3, 4). Dle obecného předpokladu působí chemoterapie především na dělící se buňky, vliv na klidové buňky s potenciálem dělení není znám. Tyto buňky jsou však vystaveny mutagenním vlivům cytostatik a vzhledem ke klidovému stavu unikají přímému testování. Navíc MTT testem není možno rozeznat, zda v rámci kultivace nádorových buněk s cytostatiky došlo jen k inhibici buněčného metabolismu nebo k definitivní nevratné destrukci buňky. Požadavek na co možná největší uniformitu buněk solidních nádorů v kultivačním médiu je zatím technicky nemožný, ale i bezpředmětný. Pokud by se izolačním krokem podařilo zachytit jen jeden určitý klon z mnoha jiných, byl by výsledek testu zatížen značnou selekcí uvnitř populace a v žádném případě by neodrážel skutečné vlastnosti nádoru jako celku. Polyklonálnost jako obecná vlastnost solidních tumorů tedy představuje limitaci MTT testu. Na druhou stranu se zřejmě již každý onkolog ocitl v situaci, kdy zvažoval výběr cytostatik a jejich kombinací u pacienta a v takové chvíli by uvítal výsledky MTT testu, které by mohly pomoci alespoň přibližně směřovat jeho další léčebné úsilí. Diagnózy, u kterých je na MOÚ citlivost k chemoterapeutikům stanovována, byly vybrány na základě jejich obecné rezistence vůči chemoterapii a tedy omezené možnosti vybrat z obecně doporučených schémat kombinací cytostatik (karcinom ovaria je sice nádor primárně chemosenzitivní, ale jeho recidiva již většinou citlivost vůči chemoterapii ztrácí).

Maligní melanom

Maligní melanom je onemocnění chemorezistentní, v počátečních stádiích dosahuje výborných výsledků důsledně chirurgické řešení. Ve fázi diseminace má však onemocnění velmi špatnou prognózu a je téměř vždy fatální. Medián přežití nemocných se pohybuje mezi 6-ti a 9-ti měsíci, 1-2 % případů přežívá do 5-ti let. V rámci paliativních režimů se jako neúčinnější jeví imunochemoterapie kombinující cisplatinu, vinblastin a dakarbazin (CVD) s interferonem alfa a interleukinem-2. Její response rate (RR), neboli míra odpovědi na léčbu, se pohybuje mezi 18 % (5) až 48 % (6), resp. 64 % (6), medián přežití pak kolí-

sá mezi 9-ti, resp. 12-ti měsíci (5, 6). Druhou používanou kombinací cytostatik je bleomycin, vinkristin, lomustin a dakarbazin (BOLD). Její účinnost je menší, RR 20 % (6), medián přežití 3 měsíce. V monoterapii se často používá dakarbazin (RR cca 20 %), fotemustin (RR až 24 %) a ve vybraných případech temozolomid (RR 17 %) (6). Od září 2006 do listopadu 2007 bylo v MOÚ odebráno k MTT testu celkem 25 vzorků maligního melanomu (2 výpotky, 23 vzorků uzlinových nebo orgánových metastáz), jen u 9-ti se však podařilo získat výsledek citlivosti k vybraným cytostatikům. K cisplatině byla prokázána úplná citlivost u 4 vzorků (44 %), 4 vzorky byly k cisplatině rezistentní, 1 vzorek nebyl hodnocen. Citlivost ke karboplatině byla detekována u 1 vzorku, rezistence pak u 1 vzorku, u 7 vzorků nemohla být citlivost ke karboplatině vyhodnocena. Výsledky citlivosti k dakarbazinu (hodnoceno celkem 8 vzorků), karmustinu (6 vzorků), bleomycinu (8 vzorků) a vinblastinu (2 vzorky) prokázaly rezistenci všech testovaných vzorků. Výsledky potvrzují fakt, že maligní melanom je onemocnění chemorezistentní, jeho buňky jsou navíc *ex vivo* obtížně kultivovatelné.

Citlivost stanovená *ex vivo* se však nepotvrdila *in vivo* u pacienta (30 let) s maligním melanomem diseminovaným do plic, jater a uzlin. Dle výsledku MTT testu byl vzorek odebraný z uzlinové metastázy velmi citlivý ke karboplatině, citlivý k cisplatině a melfalanu. Pacient po odstranění primárního nádoru (primum bylo v oblasti hýždě, Breslow 2 mm, ale stádium IIIA - pozitivní regionální uzliny) absolvoval adjuvantní imunoterapii interferonem alfa, při které došlo po 10-ti měsících k progresi do výše uvedených orgánů. Do 1. linie paliativní chemoterapie byl indikován režim kombinující cisplatinu, vinblastin, dakarbazin a interleukin-2 s efektem progresse onemocnění. Následně byla indikována 2. linie paliativní chemoterapie v režimu bleomycin, vinkristin a lomustin, opět s efektem rychlé progresse. Pacient posléze do 1 měsíce exitoval.

Sarkom měkkých tkání

Dalším testovaným druhem nádoru je sarkom měkkých tkání (soft tissue tumour / sarcoma - STT/STS). i v případě této diagnózy je na prvním místě operační řešení, pokud je možné. Operace by se však měla provádět na pracovišti s dostatečnými zkušenostmi, jež zaručí výkon radikální, ale i bezpečný pro pacienta. Bohužel i tento typ nádoru je často diagnostikován již lokálně pokročilý nebo až ve stádiu diseminace. V takových případech je operace vyloučena nebo má pouze paliativní charakter. Problematika adjuvantní či paliativní chemoterapie je předmětem řady studií. Obecně se předpokládá benefit adjuvantní chemoterapie u pacientů s STT uloženými v hloubce, většími než 5 cm a s vysokým histologickým gradem. Nejčastěji užívanými cytostatiky jsou doxorubicin a ifosfamid (7, 8, 9, 10). Výsledky paliativní chemoterapie jsou špatné, medián přežívání pacientů se pohybuje mezi 7-11-ti měsíci (9). Solitární metastázy jsou odstraněny chirurgicky, pokud je to možné. Z nejčastěji užívaných cytostatik v případě diagnózy STT lze jmenovat především doxorubicin (jeho podání je ale limitováno kardiotoxicitou, liposomální forma je indikována jen u Kaposiho sarkomu), ifosfamid nebo cyklofosfamid, dakarbazin, vinkristin a cisplatinu. Response rate udávaný při monoterapii doxorubi-

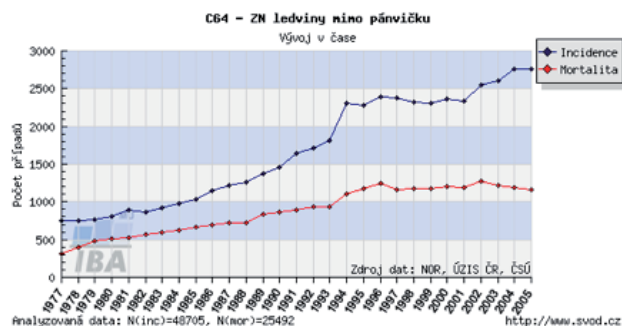
cinem je okolo 20 %, při použití ifosfamidu pak 18 % (7). Režim MAID (doxorubicin, dakarbazin, ifosfamid+mesna) dosahuje v některých studiích RR až 32 %, režim ifosfamid + doxorubicin pak 17 % (9). Nevýhodou režimu MAID je však jeho toxicita. Dříve často užívaný režim CYVADIC (vinkristin, doxorubicin, dakarbazin a cyklofosfamid) je ale přibližně stejně „účinný“ (9). Účinnost druhé či další paliativní linie chemoterapie je u STT ještě nižší (zde je třeba podotknout, že míra odpovědi na chemoterapii záleží i na histologických subtypech STT a lokalizaci tumoru) (8, 9). Výše uvedených výčet odpovědi na cytostatickou léčbu umožňuje přihlídnout k výsledkům MTT testu při podání chemoterapie s paliativním účelem od 2. linie, v určitých případech i v rámci 1. linie. V období 09/2006 – 11/2007 bylo v laboratoři chemorezistence MOÚ zpracováno celkem 29 sarkomů, u 11 vzorků se podařilo plně nebo částečně zhodnotit citlivost k vybraným cytostatikům (citlivost k některým cytostatikům nemohla být vyhodnocena pro nestandardní průběhy křivek dávkové odpovědi v programu Chemorezist). Testovány byly nejčastěji vzorky primárních nádorů (15 vzorků) a na druhém místě recidiva tumoru (14 vzorků). Paradoxně byla u 3 vzorků (27 %) prokázána úplná citlivost k cisplatině (RR monoterapie cisplatinou se udává mezi 10-13 %) (10), 1 vzorek byl částečně citlivý (9,1 %), 4 vzorky byly k cisplatině rezistentní u 2 vzorků (18 %) byla prokázána úplná citlivost k vinkristinu, 3 vzorky byly k vinkristinu rezistentní (27 %). Všech 9 vyhodnocených vzorků bylo rezistentních k doxorubicinu (82 %). Stejně tak u docetaxelu a dakarbazinu nebyla u žádného hodnoceného vzorku zaznamenána částečná nebo úplná citlivost. Citlivost k oxazafosforinům není možné v rámci MTT testu stanovit (oxazafosforiny jsou teprve až v těle metabolizovány na účinnou látku fosforaminomustard).

Modelovým případem využití výsledku MTT testu byl pacient (věk 40 let) se sarkomem levé horní končetiny. Před příchodem na naše pracoviště byl pacient opakovaně operován pro recidivující tumor předloktí, nádor byl opakovaně histologicky hodnocen jako nízce diferencovaný sarkom, diferenciálně diagnosticky maligní melanom. Dlužno podotknout, že pacient dlouhodobě odmítal radikální zákrok typu amputace. V dubnu 2005 byl pacient poprvé operován v MOÚ, výsledky histologického vyšetření byly opět nejednoznačné: nízce diferencovaný sarkom, maligní melanom. Velmi brzy došlo u pacienta k recidivě onemocnění a byla opět provedena exstirpace. Vzorek nádorové tkáně byl poslán do referenční patologické laboratoře, kde bylo vysloveno podezření na non-hodgkinský lymfom. Pacient následně absolvoval 2 cykly chemoterapie v režimu CHOP (cyklofosfamid, vinkristin, adriamycin + prednison) s efektem progresse. V červnu 2005 byla provedena tru-cut biopsie, histologický nálezn byl definitivně uzavřen jako nízce diferencovaný sarkom. Pacient posléze absolvoval hypertermickou perfúzi s melfalanem a následně intraarteriální aplikaci doxorubicinu s embolizací. V září 2005 došlo k progresi tumoru a znovu byl proveden pokus o co možná nejradiálnější exstirpaci (pacient stále odmítal amputaci). Vzorek byl hodnocen pomocí MTT testu s výsledkem úplné rezistence k doxorubicinu, cisplatině, etoposidu, docetaxelu, vinkristinu a dakarbazinu. Za dva měsíce byl pacient znovu operován pro recidivu tumoru, dle 2. MTT testu byl však nádor nově citlivý k vinkristinu a cisplatině, stále však rezistentní k doxorubicinu, etoposidu a docetaxelu. V období od prosince 2005 do února 2006 pacient podstoupil radioterapii, LD 60Gy.

Následně bylo indikováno podání celkem 6 sérií „adjuvantní“ chemoterapie v režimu vinkristin a melfalan. Efektem po 6-ti sériích chemoterapie byla sice lokální progresse, ale zjevná recidiva onemocnění nebyla ještě po 3 sériích této chemoterapie patrná, pacient jinak v roce 2005 každé 2 měsíce podstupoval operační výkon. V červnu 2006 byl znovu proveden pokus o co nejradikálnější exstirpaci nádoru. Dle 3. MTT testu byl vzorek stále hodnocen citlivým k vinkristinu, částečně citlivým k cisplatině, nově však citlivým k topotekanu a stále rezistentním k doxorubicinu, docetaxelu a etoposidu. Od června 2006 do srpna 2006 byla provedena interstiální brachyterapie, LD 30Gy. V září 2006 se však objevila nová recidiva onemocnění a pacient konečně svolil k amputaci končetiny. Vzorek nádoru byl opětovně vyšetřen MTT testem (již po 4.) a byl shledán plně citlivý k cisplatině (citlivost k vinkristinu nebyla testována), rezistentní k etoposidu, doxorubicinu, dakarbazinu a docetaxelu. V listopadu 2006 byly diagnostikovány plicní metastázy, které byly inoperabilní a jejich histologická verifikace nebyla možná. Vzhledem k výbornému stavu pacienta (KI, neboli Karnofski index, 100 %) a věku byla indikována paliativní chemoterapie v režimu MAID (dakarbazin, ifosamid+mesna, doxorubicin nebyl pro předléčenost tímto cytostatikem a jeho předešlému efektu podán). Efekt po 3 sériích chemoterapie byl klasifikován jako stabilizace onemocnění (SD) dle kritérií RECIST. Po 6-ti sériích chemoterapie však došlo k progresi onemocnění. V další onkologické rozvaze bylo přihlédnuto k trvajícím dobrému stavu pacienta, jeho přání se dále léčit a výsledkům MTT testu. Byla indikována paliativní chemoterapie v režimu cisplatin v kombinaci s etoposidem. Po 3 sériích chemoterapie byla zaznamenána výrazná parciální remise (PR) a po 6-ti sériích stabilizace onemocnění. Pacient je až do dnešní doby sledován, nadále ve stabilizované fázi onemocnění (trvá zatím 6 měsíců). Jednalo se tedy o pacienta s chemorezistentním onemocněním, opakovaně hodnoceným v rámci MTT testu, který se dostal do stabilizace díky chemoterapii podané s vysoce paliativním záměrem, jejíž složení bylo ovlivněno i výsledky MTT testu.

Karcinom ledviny

Zhoubný nádor ledviny představuje onemocnění rezistentní k chemoterapii, jeho incidence v České republice má rostoucí charakter, viz Graf č. 1 (18).



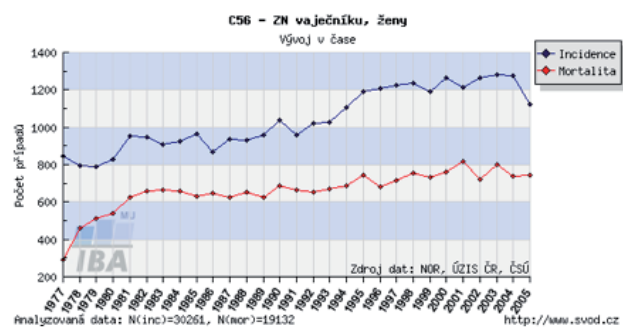
Graf č. 1: Vývoj incidence zhoubného nádoru ledviny v České republice.

Udávaný RR užívaných cytostatik (vinblastin, 5-fluorouracil) se pohybuje mezi 5-10 % (11, 12). Imunoterapie je v případě diagnózy sice účinnější, přesto jsou výsledky léčby málo příznivé (RR interferonu alfa 15 %, pacienti po nefrektomii s plicními metastázami mají RR až

30 %, interleukin-2 má RR 15-20 %, kombinovaná imunochemoterapie dle Atzpodiena - tedy interferon alfa + interleukin-2 + 5-fluorouracil má udávaný RR až 30 %) (13, 14, 15). Základem léčby karcinomu ledviny je tedy opět chirurgické odstranění tumoru, nicméně i toto onemocnění velmi často recidivuje nebo je již zachyceno ve stádiu vzdálené diseminace. Novinkou v léčbě tohoto onemocnění je použití zástupců takzvané biologické léčby - sunitinibu a sorafenibu. Jedná se o inhibitory mnoha receptorových tyrozinkináz (multitarget therapy), které se podílejí na růstu tumoru, angiogenezi a metastazování. V dnešní době jsou indikovány po selhání cytokinové léčby. RR je u sunitinibu až 36 %, time to progression (TTP) pak 38 týdnů, u sorafenibu jsou výsledky podobné (16, 17). Posloupnost léčby – operace → imunoterapie → biologické léčba vedla ke snížení podávání cytostatik u této diagnózy. Pacienti jsou po selhání biologické léčby jen zřídka ve stavu, který by umožňoval podání cytostatik. Diagnóza karcinomu ledvin byla vybrána k testování chemorezistence *ex vivo* v době, kdy léčba sunitinibem a sorafenibem ještě nebyla schválena. Ve sledovaném období (od 09/2006 do 11/2007) bylo testováno celkem 36 vzorků karcinomu ledviny (30 vzorků primárního nádoru, 5 vzorků metastázy, 1 výpotek), u 20 z nich byl získán reprodukovatelný výsledek. Úplná citlivost byla zaznamenána u 3 vzorků (15 %) k 5-fluorouracilu, u 4 vzorků (20 %) ke gemcitabinu a 5 vzorků (25 %) k vinblastinu. 2 vzorky (10 %) byly částečně citlivé ke gemcitabinu, rezistence byla prokázána u 11 nádorů (55 %) k 5-fluorouracilu, u 6 vzorků (30 %) ke gemcitabinu a 5 vzorků (25 %) k vinblastinu. Výsledky v zásadě potvrdily rezistenci karcinomu ledviny k chemoterapii, překvapující je pouze poměrně četná zaznamenaná citlivost k vinblastinu, u jehož použití není RR udáváno vyšší než 10 % (11, 12).

Karcinom ovaria

Incidence onemocnění karcinomu ovaria v České republice ukazuje Graf č. 2 (18).



Graf č. 2: Vývoj incidence zhoubného nádoru vaječníku v České republice.

Vzhledem k anatomické lokalizaci vaječníku je tento nádor diagnostikován často (až v 80 %) ve stádiu III nebo IV. Základní léčebnou modalitou je chirurgický zákrok (vzhledem k často zjišťované pokročilosti onemocnění je často možný jen řádně provedený debulking). Podávání cytostatik (především paklitaxelu, karboplatiny, cisplatiny a cyklofosfamidu) má na počátku léčby velmi dobrý

efekt, značné procento pacientek však posléze recidivuje (19). Do první linie paliativní chemoterapie je indikována kombinace paklitaxelu s platinovým preparátem. Zdá se, že není rozdíl v počtu odpovědí na léčbu a přežíváním pacientek při podání cisplatinu nebo karboplatinu (20, 21). Kombinace paklitaxelu s karboplatinou se však vyznačuje nižší gastrointestinální toxicitou (22). Response rate kombinace paklitaxelu s platinovým cytostatikem je 73 %, medián přežívání pacientek pak 35 měsíců (20, 21). Pětileté přežívání se pohybuje od 20 % (III. stádium), do 5-7 % (IV. stádium) (23, 24, 25). V případě recidiv onemocnění se situace stává problematičtější, prognóza záleží do značné míry na době, kdy došlo k relapsu po 1. linii chemoterapie. Pokud dojde k recidivě do 6-ti měsíců od ukončení primární chemoterapie, hovoří se o nádorech rezistentních k paklitaxelu a platině. Odpovědi na léčbu v dalších liniích jsou velmi nízké (přibližně 20 %) a prognóza onemocnění je nepříznivá. V těchto případech se zvažuje aplikace cytostatik typu topotekanu, gemcitabinu nebo etoposidu. Recidiva po 1 roce od ukončení 1. linie chemoterapie umožňuje návrat k preparátům již jednou použitým (nádor je citlivý k paklitaxelu a platině), míra odpovědi a přežívání pacientek je vyšší. Pacientky, které recidivují od 6-ti měsíců do 1 roku po primární chemoterapii, tvoří určitý přechod mezi výše uvedenými skupinami. Jejich šance na léčebné odpovědi jsou vyšší nežli u první skupiny, nezdá se však, že existuje rozdíl mezi účinností cytostatik užitých v 1. linii nebo zcela jinými cytostatiky (23). Na našem pracovišti bylo od 09/2006 do 11/2007 odebráno celkem 16 vzorků karcinomu vaječniku (9 vzorků primárního nádoru, 7 vzorků recidivy tumoru – z toho 2 vzorky solidních metastáz, 5 vzorků ascitu), pouze u 11-ti byl získán reprodukovatelný výsledek citlivosti, resp. rezistence. Ani jeden vzorek nebyl citlivý *ex vivo* k paklitaxelu, 2 (18 %) byly částečně citlivé, 4 (36 %) rezistentní, citlivost 5 (45,5 %) vzorků k paklitaxelu nemohla být hodnocena. U platinových derivátů karboplatinu / cisplatinu byly zjištěny následující výsledky: citlivost celé populace buněk: 0 / 3 (0 / 27 %), částečná citlivost: 0/0, rezistence: 5 / 4 (45 / 36 %), 6 vzorků (54,5 %) nemohlo být zhodnoceno u karboplatinu, u cisplatinu pak 4 (36 %). Dále byla zjištěna úplná citlivost 2 vzorků k topotekanu (18 %) a 2 k doxorubicinu (18 %), žádný vzorek nebyl citlivý k gemcitabinu. Překvapující rezistence vzorků k preparátům podávaným standardně v první linii chemoterapie je zřejmě ovlivněna malým souborem pacientů. K výsledkům získaným MTT testem se našim pracovišti přihlíží až při indikaci druhé linie paliativní chemoterapie. Do 1. linie chemoterapie je indikován, pokud to stav pacientky dovoluje, režim paklitaxel + platinový derivát (ve volbě mezi karboplatinou a cisplatinou je možné odvolat se na výsledky MTT testu, rozhodující je však především stav pacientky, její interkurence, přání event. ambulantního podání chemoterapie, atd.). Pacientka v zásadě dostane 2. linii chemoterapie až po absolvování první linie, kdy je populace nádorových buněk změněna zkušeností s paklitaxelem a platinou. Jen málokdy se nám zatím daří získat vzorek nádoru před podáním druhé linie chemoterapie (např. Z ascitu, hrudního výpotku, či z operace recidivy tumoru), abychom určili aktuální citlivost buněk vystave-

ných cytostatikům 1. linie chemoterapie, které mohly do jisté míry vlastnosti buněk ovlivnit. Naše dosavadní zkušenosti dokazují dlouho známou věc, že ani u diagnózy karcinomu ovaria neznamená citlivost prokázaná *ex vivo* zaručenou citlivost nádoru *in vivo*.

Příkladem je pacientka se serózním papilárním karcinomem ovaria, iniciačně stádium IIIC. Pacientka prodělala operaci a následně 6 cyklů chemoterapie v režimu paklitaxel a karboplatina s efektem kompletní remise. Za 8 měsíců byla zjištěna recidiva - maligní ascites, postižení peritonea. Ascites byl punktován a výsledky histologie byly shodné s dříve diagnostikovaným karcinomem ovaria. Dle výsledků MTT testu byly buňky citlivé k paklitaxelu, topotekanu a doxorubicinu, rezistentní pak ke karboplatině, cisplatině a gemcitabinu. Pacientka následně absolvovala 2 cykly paliativní chemoterapie v režimu topotekan v monoterapii s efektem rychlé progresse.

Závěr

Vzhledem k dosud nízkému počtu vyhodnocených případů, u nichž bylo srovnáváno laboratorní vyšetření s klinickým průběhem onemocnění a aplikovanou terapií, jsou získané výsledky stále pouze na úrovni kasuistik. Sběr dat u výše uvedených skupin diagnóz probíhá teprve od září 2006 a informace o výsledcích léčby si vyžadují delší časový interval. Vzhledem k faktu, že většina linií standardní chemoterapie zahrnuje aplikaci dvou nebo i více cytostatik, bude testován i vliv vybraných kombinací cytostatik na nádorové buňky *ex vivo*. Jisté možnosti přináší aplikace výsledků MTT testu u skupiny diagnóz „na přání klinika“. Zahrnuje pacienty s nejrůznějšími diagnózami, u kterých již byly vyčerpány možnosti standardní terapie, ale jejichž stav ještě dovolí podání 2., 3., nebo n-té linie paliativní chemoterapie. V těchto případech pak výsledek MTT testu může klinikovi dát určitý směr k výběru cytostatika, ať již v minulosti podaného nebo nového, nikoliv paušálně indikovaného u dané diagnózy, pokud to indikační kritéria v rámci hrazení péče dovolí.

Dále se rozvíjí testování výpotků- ascitu nebo fluidothoraxu, tyto vzorky jsou dobře dostupné, testování se provádí dle techniky uvedené v práci Krásná a kol. (26). Nezanebatelné je také to, že řada pacientů často přichází s výpotkem jako primomaniestace maligního onemocnění a jsou tak testovány „chemonaivní“ buňky.

Velkým problémem metody MTT testu je již zmíněná polyklonálnost solidních tumorů. Není také možno s jistotou říci, zda buňky testované v rámci MTT testu jsou nádorové nebo benigní (např. fibroblasty). Diskutabilní je taktéž, do jaké míry je možno modelovat obecnou, ale i individuální složitost metabolismu člověka v podmínkách *in vitro* / *ex vivo*.

Doposud jsme nezaznamenali situaci, že by se *ex vivo* prokázaná rezistence k určitému cytostatiku projevila citlivostí nádoru *in vivo*, častěji jsme byli svědky *ex vivo* citlivosti, která se bohužel následně *in vivo* nepotvrdila. Výsledky MTT testu citlivosti nádorových buněk k chemoterapeutikům pak představují v myšlení onkologa jen orientační data, vlastní podání cytostatik musí být indikováno na základě doporučených postupů, v nichž

hlavní roli hraje „evidence based medicine“, tedy medicína založená na důkazech. Metoda stanovení citlivosti nádorových buněk *ex vivo* je kontroverzní vzhledem k výše zmíněným limitacím a získané výsledky jsou pochopitelně zdrojem nedůvěry. V případě onkologických pacientů a to zejména těch, kteří nereagují na standardní aplikovanou terapii však představuje naději na vytypo-

vání potenciálně účinné látky a tím i naději na vyšší úspěšnost léčby.

Poděkování:

Tato práce byla podpořena z finančních zdrojů MZ ČR pro výzkumný záměr MOÚ MZOMOU2005 s názvem „Funkční diagnostika zhoubných nádorů“.

Literatura

1. Michalová E., Poprach A., Němečková I. et al. Predikce citlivosti nádorových buněk k chemoterapeutikům *ex vivo* – úskalí a limitace vlastní metody. *Klinická onkologie*, 2008, v tisku.
2. Klener P. et al. Etiologie a patogeneze nádorového procesu. In: Klener P. et al. (eds). *Klinická onkologie*, 1. vydání Praha, Galén, 2002, s. 62-65.
3. Baker F.L., Sanger L.J., Rodgers R.W. et al. Cell proliferation kinetics of normal and tumor tissue in vitro: quiescent reproductive cells and the cycling reproductive fraction. *Cell Prolif*, 1995; 28 (1), s. 1-15.
4. Talač R., Žaloudík J., Hajdúch M. et al. Hodnocení lékové rezistence in vitro a její klinické implikace. *Klinická onkologie*, 2000, 13 (Speciál 2), s. 2-3.
5. Keihholz U., Goey S.H., Punt C.J. et al. Interferon alfa-2a and interleukin-2 with or without cisplatin in metastatic melanoma: a randomized trial of the European Organization for Research and Treatment of Cancer Melanoma Cooperative Group. *J Clin Oncology*, 1997, 15 (7), s. 2578-2579.
6. Balch C.A.M., Atkins M.B., Sober A.J. Cutaneous Melanoma. In: DeVita V.T., Jr., Hellman S., Rosenberg S.A. (eds). *Cancer, Principles and Practice of Oncology*, 7th edition, Philadelphia, Lippincott Williams & Wilkins, 2005, s. 1798-1803.
7. Benjamin R.S., Legha S.S., Patel S.R. et al. Single-agent ifosfamide studies in sarcomas of soft tissue and bone: the M.D. Anderson experience. *Cancer Chemother Pharmacol*, 1993, 31 (Suppl 2), s. 174-179.
8. Tierney J.F., Mosseri V., Stewart L.A. et al. Adjuvant chemotherapy for soft-tissue sarcoma: review and meta-analysis of the published results of randomized clinical trials. *Br J Cancer*, 1995, 72 (2), s. 469-475.
9. Brennan M.F., Singer S., Maki R.G. Sarcomas of the Soft Tissues and bones. In: DeVita V.T., Jr., Hellman S., Rosenberg S.A. (eds). *Cancer, Principles and Practice of Oncology*. 7th edition, Philadelphia, Lippincott Williams & Wilkins, 2005, s. 1624-1631.
10. Thigpen J.T., Blessing J.A., Beecham J. et al. Phase II trial of cisplatin as first-line chemotherapy in patients with advanced or recurrent uterine sarcomas. *J Clin Oncol*, 1991, 9 (11), s. 1962-1966.
11. Yagoda A., Abi-Rached B., Petrylak D. Chemotherapy for advanced renal carcinoma: 1983-1993. *Semin Oncol*, 1995, 22 (1), s. 42-60.
12. Motzer R.J., Russo P., Systemic therapy for renal carcinoma. *J Urol*, 2000, 163 (2), s. 408-417.
13. Atzopdien J., Kirchner H., Hanninen E. et al. Interleukin-2 in combination with interferon-alpha and 5-fluorouracil for metastatic renal cell carcinoma. *Eur J Cancer*, 1993, 29A (Suppl 5), s. S6-S8.
14. Tourani J.M., Pfister C., Tubiana N. et al. Subcutaneous interleukin-2 and interferon alfa administration in patients with metastatic renal cell carcinoma: final results of SCAPP III, a large, multicenter, phase II, nonrandomized study with sequential analysis design - the Subcutaneous Administration Propeukin Program Cooperative Group. *J Clin Oncol*, 2003, 21 (21), s. 3987-3994.
15. Muss H.B. Interferon therapy for renal cell carcinoma. *Semin Oncol*, 1987, 14 (2 Suppl 2), s. 36-42.
16. Motzer R.J., Hutson T.E., Tomczak P. et al. Sunitinib versus Interferon Alfa in Metastatic Renal-Cell Carcinoma. *N Engl J Med*, 2007, 365 (2), s. 115-124.
17. Escudier B., Eisen T., Stadler W.M. et al. Sorafenib in Advanced Clear - Cell Renal - Cell Carcinoma. *N Engl J Med*, 2007, 356 (2), s. 125-134.
18. Dušek L., Mužík J., Kubásek M. et al. Český národní webový portál epidemiologie nádorů [online]. Masarykova univerzita, [2005], [cit. 2008-2-25]. Dostupný z WWW: <http://www.svod.cz>. Verze 7.0 [2007], ISSN 1802 – 8861
19. Cwiertka K., Hajdúch M., Pilka R. et al. Chemoterapie ovariálního karcinomu s ohledem na stanovení in vitro chemosenzitivity - vybrané kazuistiky. *Klinická onkologie*, 2000, 13 (Speciál 2), s. 58-59.
20. Stuart G., Bertelsen K., Mangioni C. et al. Updated analysis shows a highly significant improved overall survival (OS) for cisplatin-paclitaxel as first line treatment of advanced ovarian cancer: Mature results of the EORTC-GCCG, NOCOVA, NCIC CTG and Scottish intergroup trial. *Proc Am Soc Clin Oncol*, 1998, 17, s. 361a.
21. Piccart M.J., Bertelsen K., Stuart G. et al. Is cisplatin-paclitaxel the standard in first-line treatment of advanced ovarian cancer? The EORTC-GCCG, NOCOVA, NCI-C and Scottish intergroup experience. *Proc Am Soc Clin Oncol*, 1997, 16, s. 352.
22. Ozols R.F., Bundy B.N., Fowler J. et al. Randomized phase III study of cisplatin/paclitaxel versus carboplatin/paclitaxel in optimal stage III epithelial ovarian cancer: a Gynecologic Oncology Group trial. *Proc Am Soc Clin Oncol*, 1999, 18, s. 365a.
23. Karlan B.Y., Markman M., Eifel P.J. Ovarian Cancer, Peritoneal Carcinoma and Fallopian Tube Carcinoma. In: DeVita V.T., Jr., Hellman S., Rosenberg S.A. (eds). *Cancer, Principles and Practice of Oncology*, 7th edition, Philadelphia, Lippincott Williams & Wilkins, 2005, s. 1364-1388.
24. Klener P. et al. Nádory Vaječníků a vejcovodů. In: Klener P. et al. (eds). *Klinická onkologie*, 1. vydání Praha, Galén, 2002, s. 481-488.
25. Kalábová, R., Čechovský, P. Maligní nádory vaječníků. In Adam Z. et al. *Diagnostické a léčebné postupy u maligních chorob*. Praha: Grada Publishing, 2002, s. 213-221.
26. Krásná L., Matoušková E., Janoušek M. et al. Využití buněk získaných z maligních výpotků k vedení léčby pacientů s pokročilým nádorem. *Klinická onkologie*, 2000, 13 (Speciál 2), s. 43-48.

Korespondenční adresa:

A. Poprach
Masarykův onkologický ústav
Žlutý kopec 7, 656 53 Brno
e-mail: poprach@mou.cz

Došlo / Submitted: 23. 4. 2008

Přijato / Accepted: 30. 4. 2008

Autoři deklarují, že v souvislosti s předmětem studie nemají žádné komerční zájmy. The authors declare they have no potential conflicts of interest concerning drugs, products, or services used in the study.

Redakční rada potvrzuje, že rukopis práce splnil ICMJE kritéria pro publikace zasílané do biomedicínských časopisů.

The Editorial Board declares that the manuscript met the ICMJE „uniform requirements“ for biomedical papers.