

Naše päťročné výsledky *in vitro* testovania chemorezistencie u onkologických pacientov

Five Year-Results of Chemoresistance Testing in Cancer Patients

Hatok J.¹, Matáková T.¹, Jurečeková J.¹, Chudej J.², Chudý P.², Huľo E.³, Dzian A.³, Strelka Ľ.³, Dobrota D.¹, Račay P.¹

¹ Ústav lekárskej biochémie, JLF UK Martin, Slovenská republika

² Klinika hematológie a transfuziológie, JLF UK a UNM Martin, Slovenská republika

³ Chirurgická klinika, JLF UK a UNM Martin, Slovenská republika

Súhrn

Východiská: Translačná medicína predstavuje medicínsky odbor, ktorý zahŕňa základný výskum a vývoj nových diagnostických a terapeutických stratégií pre klinickú prax. Tento vedecký príspevok je zameraný na naše doterajšie skúsenosti v oblasti testovania chemorezistencie onkologických pacientov. **Materiál a metódy:** Od roku 2005 sme odobrali vzorky 71 pacientov s leukemickým ochorením (AML, ALL a CML) a 92 pacientov so solídnymi tumormi (bronchogénne karcinómy a karcinómy GITu). Testovanie *in vitro* rezistencie malígnych buniek na liečivá sme vykonávali pomocou cytotoxického metyl-tiazol tetrazoliového (MTT) testu. **Výsledky:** Na základe stanovenia LC₅₀ (letálna koncentrácia liečiva, ktorá usmrčuje 50 % bunkovej populácie) sme zistili, že pacienti s akútnou myeloblastickou leukémiou vykazujú väčší stupeň rezistencie oproti pacientom s akútnou lymfoblastickou leukémiou. U pacientov s bronchogénnymi karcinómami sa primárna rezistencia prejavila pri cisplatine v 28 percentách, paklitaxelu (36 %), vinkristíne (50 %), etopozide (56 %), vinorelbíne (57 %), topotekane (62 %), gemcitabíne (77 %) a dakarabazíne v 86 % prípadov testovaných vzoriek. **Záver:** Z výsledkov MTT testu karcinómov GITu (karcinóm hrubého čreva, rektosigmoidálneho spojenia a konečníka) vyplýva predovšetkým relatívna úspešnosť cisplatiny (okrem karcinómu žalúdka, ktorá je porovnateľná so základným cytostatikom 5-fluorouracilom. Samotný MTT test sa aj napriek niektorým limitujúcim faktorom (nedostatočný počet vitálnych buniek, možná kontaminácia nenádorovými bunkami a pod.) ukazuje za spoľahlivú *in vitro* metódu stanovenia rezistencie nádorových buniek na klinicky používané liečiva.

Kľúčové slová

translačná medicína – chemorezistencia – *in vitro* testovanie – malignita

Summary

Backgrounds: Translational medicine is a medical field encompassing basic research and development of new diagnostic and therapeutic strategies for clinical practice. The present scientific paper focuses on our previous experience in the field of chemoresistance testing in patients with oncological diseases. **Material and Methods:** Since 2005, we sampled 71 patients with a leukaemia (AML, ALL and CML) and 92 patients with a solid tumour (lung and gastrointestinal tract cancer). Malignant cell *in vitro* drug resistance testing was carried out using cytotoxic methyl-thiazol tetrazolium (MTT) assay. **Results:** Based on the LC₅₀ (lethal concentration of a drug killing 50% of cell population), we found that patients with acute myeloblastic leukaemia exhibit a greater degree of resistance than patients with acute lymphoblastic leukaemia. In patients with bronchogenic carcinomas, primary resistance to cisplatin was identified in 28 % of tested samples, paclitaxel 36%, vincristine 50%, etoposide 56%, vinorelbine 57%, topotecan 62%, gemcitabine 77% and dacarbazine 86%. **Conclusion:** *In vitro* tests with gastrointestinal tract cancers also suggested high effectiveness of cisplatin (with the exception of gastric carcinoma) that was comparable with 5-fluorouracil. Even though the MTT assay has some limitations (insufficient number of vital cells, possible contamination by non-malignant cells, etc.), this *in vitro* method proved very effective in testing malignant cell resistance to clinically used cytostatics.

Key words

translational medicine – chemoresistance – *in vitro* testing – malignity

Táto práca bola podporená projektom Centrum translačnej medicíny, spolufinancovaným zo zdrojov ES a Európskeho fondu regionálneho rozvoja.

This project has been supported by the Centre for Translational Research co-financed by the EU and European Regional Development Fund.

Autoři deklaruji, 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 zaslané do biomedicínských časopisů.

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



RNDr. Jozef Hatok, PhD.

Univerzita Komenského v Bratislave

Jesseniova lekárska fakulta v Martine

Ústav lekárskej biochémie

Malá Hora 4

036 01 Martin

Slovenská republika

e-mail: hatok@jfm.uniba.sk

Obdrženo/Submitted: 17. 1. 2011

Přijato/Accepted: 21. 11. 2011

Úvod

Jedným z perspektívnych trendov modernej medicíny je translačná medicína (TM) predstavujúca nový medicínsky odbor, ktorý zahŕňa základný výskum a vývoj nových diagnostických a terapeutických stratégií pre klinickú prax. TM sa zaoberá prenosom a aplikáciou najnovších poznatkov základného výskumu v oblasti genetiky, molekulárnej biológie, biochémie a biotechnológií do klinickej praxe. V tomto článku uvádzame výsledky v oblasti testovania chemorezistencie leukemických buniek a buniek získaných od pacientov so solídnyimi tumormi.

Rezistencia malígnych ochorení predstavuje v súčasnosti hlavnú príčinu, ktorá obmedzuje efektivitu chemoterapie. Malignity môžu byť primárne rezistentné na cytostatiká (geneticky podmienená rezistencia) alebo k vývoju rezistencie dochádza počas liečby (získaná rezistencia). Predpokladá sa, že rezistencia na cytostatiká, či už geneticky podmienená, alebo získaná, je zodpovedná za zlyhanie liečby u viac ako 90 % pacientov s metastázami a rezistentné mikrometastatické tumory môžu tiež znižovať efektivitu chemoterapie v adjuvantnej liečbe [1].

Testovaním chemorezistencie pomocou rôznych metód je teoreticky možné vybrať optimálne zloženie chemoterapie z viacerých možností štandardnej liečby [2]. Na základe prediktívneho *in vitro* testu (MTT) sme prispeli k určeniu najúčinnějších cytostatík pre individualizovanú terapiu, a tým sme sa priradili k špecializovaným pracoviskám nielen na Slovensku.

Materiál a metódy

Biologický materiál

Od leukemických pacientov ($n = 71$, vek: 19–84 rokov) sme získavali heparizovanú periférnu krv (PK) alebo kostnú dreň (KD). Jednotlivé zastúpenia diagnóz boli v tomto počte: AML (45), ALL (18) a CML (8). Izoláciu leukocytov sme realizovali pomocou hustotného gradientu (Lymphocyte Separatium Medium 1077, PAA – Austria), po ktorej boli bunky kultivované v kultivačnom médiu (RPMI 1640, 15 % FBS, 2 mM L-glutamín, 1 % ATB a 0,005 % ITS) pri 37 °C a 5 % CO₂.

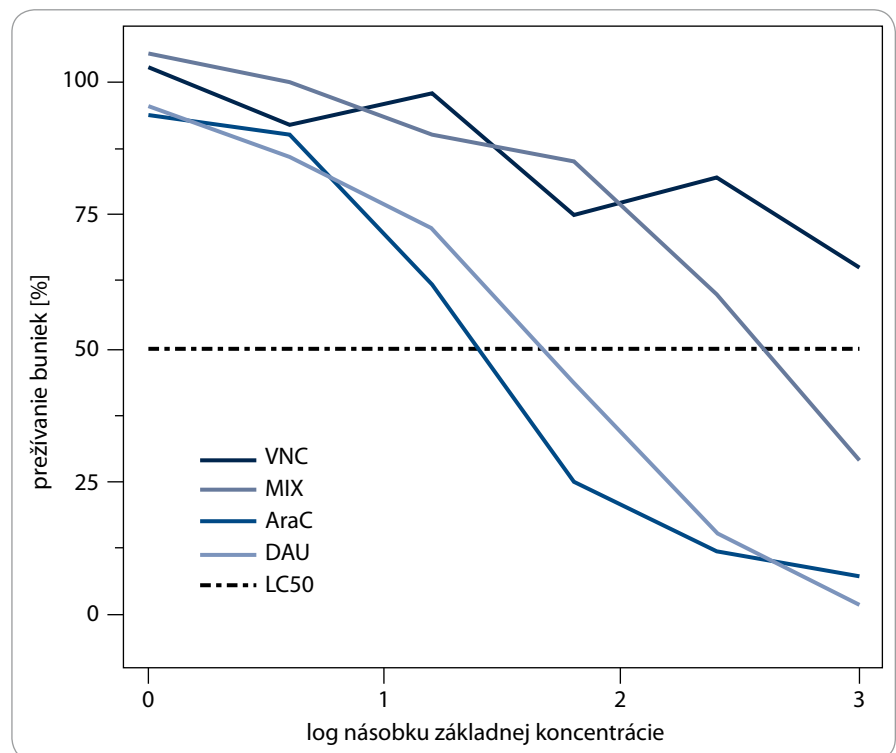
Od pacientov so solídnyimi tumormi ($n = 92$, vek 25–82 rokov) sme odobrali vzorky tkaniva s explantačnou účinnosťou 75 %. V skupine boli pacienti s bronchogénnymi karcinómami (15) a karcinómami gastrointestinálneho traktu (GITu – 77). Separáciu nádorových buniek daného biologického materiálu sme vykonali pomocou mechanickej a enzymatickej fragmentácie (0,05% kolagenáza) s následnou purifikáciou nádorových buniek technikou centrifugácie v hustotnom gradiente. Takto získané bunky sme ďalej kultivovali obdobne ako leukocyty, len sme zvýšili obsah ATB na 2 %.

Testovanie chemorezistencie

Na *in vitro* testovanie chemorezistencie sme použili päťdňový metyl-tiazol tetrazoliový (MTT) test [3]. Princíp testu je založený na schopnosti živých buniek redukovať žltú rozpustnú tetrazoliovú soľ mitochondriálnym enzýmom sukcinátdehydrogenázou na nerozpustný modrý formazán. Suspenziu vitálnych buniek v koncentračnom rozpätí 1–1,5 × 10⁶/ml sme kultivovali 72 hodín ako bez cytostatík (kontrola),

tak spolu so študovanými cytostatikami v zostupných koncentráciách na 96-jamkovej platni. Na záver kultivácie sme do každej jamky pridali MTT soľ (5 mg/ml) a nechali 4–6 hodín pôsobiť. Vzniknuté formazánové kryštály sme rozpustili pomocou roztoku laurylsulfátu sodného (pH = 5,5). Na druhý deň sme na čítači platní (Microplate reader, Bio-Rad – Germany) merali optickú densitu (OD) pri 540 nm. Na základe získaných hodnôt sme určili koncentráciu LC₅₀ (letálna koncentrácia liečiva, ktorá usmrčuje 50 % bunkovej populácie – najúčinnější). Nakoniec sme definovali výsledky testovania chemorezistencie, resp. citlivosti do troch skupín podľa hodnôt LC₅₀ a percenta prežívajúcich buniek pri maximálnej koncentrácii cytostatík:

1. **citlivá** skupina predstavovala prežívanie buniek pri maximálnej koncentrácii od 0 do 25 % a hodnota LC₅₀ sa pohybovala okolo strednej koncentrácie testovanej škály cytostatika, po prípade bola nižšia;
2. **vnímavá** skupina bola charakterizovaná prežívaním buniek pri maximálnej koncentrácii od 25 do 50 % a hod-



Obr. 1. Grafické znázornenie závislosti prežívania buniek od rastúcej koncentrácie používaných cytostatík.

nota LC₅₀ bola stanovená pri vyšších koncentráciách;

3. **rezistentná** skupina predstavovala prežívanie buniek pri maximálnej koncentrácii nad 50 % a hodnota LC₅₀ vo väčšine prípadov nebola stanovená.

Výsledky a diskusia

Leukemickí pacienti

Celkovo sme v tejto skupine pacientov mali 31 mužov a 40 žien. Pri porovnávaní získaných hodnôt LC₅₀ v závislosti od typu materiálu (PK vs KD) sme nezistili žiadny rozdiel. Ak sme porovnávali hodnoty LC₅₀ (n = 42) od štyroch párov leukemických pacientov, t.j. spolu 8 vzoriek periférnej krvi a kostnej drene, zistili sme lineárnou regresiou pozitívnu koreláciu (R = 0,9844; p < 0,0001). Stanovenie výsledkov chemorezistencie leukemických buniek z kostnej drene a periférnej krvi sa ukazuje za výhodný praktický význam, keďže môžeme vychádzať z rôzneho materiálu a pritom zachovať takmer identický výstup. Podobné zistenia namerali aj Kaspers et al ešte v roku 1991, kde testovali 14 liečiv na vzorkách PK a KD od 12 leukemických pacientov [4].

Na základe priebehu krivky a hodnôt LC₅₀ sme mohli posúdiť vplyv cytostatík

na populáciu leukemických buniek, kde sme výsledok rozdelili do troch skupín, vid. časť Materiál a metódy. Reprezentatívnu ukážku výstupu testovania chemorezistencie môžeme vidieť na obr. 1. Bunky od pacienta s akútnou myeloblastickou leukémiou (denovo, M0-1) sú citlivé na mitoxantrón (MIX) a daunorubicín (DAU), vnímavé na cytarabín (Ara-C) a rezistentné na vinkristín (VNC), kedy bunky prežívajú aj pri maximálnej koncentrácii.

Pri porovnaní výsledkov testovania chemorezistencie medzi akútnymi leukémiami sme zistili štatistický významné rozdiely pri niektorých testovaných cytostatikách. V skupine AML vzoriek (n = 45) sme určili vyššie hodnoty LC₅₀ pre etopozid, metylprednizolón, mitoxantrón, prednizón a vinkristín oproti skupine ALL vzoriek (n = 18). Naopak, ALL vzorky boli rezistentnejšie na cytarabín, daunorubicín a doxorubicín (tab. 1). Lymfoblasty získané od CML pacientov nepreukazovali žiadne štatistický významné rozdiely v porovnaní s bunkami od pacientov s akútnymi leukémiami aj z dôvodu, že ich počet v súbore nebol postačujúci.

Zlyhávanie terapie leukémií je pravdepodobne spôsobené tým, že leukemický klon nie je možné dostatočne odstrániť.

Veľký význam k pochopeniu zlyhania terapie sa preto nakláňa k porozumeniu mechanizmom liekovej rezistencie pred zasiahnutím cieľa liečivom (farmakologická rezistencia) a po liekovej interakcii s miestom ataku (bunková rezistencia) [5].

Výsledky našej *in vitro* štúdie prezentujú, že dospelí pacienti s AML dosiahli vyššiu rezistenciu na niektoré testované liečivá (dexametazón, etopozid, prednizón a vinkristín) v porovnaní s ALL pacientmi. Odlišné *in vitro* výsledky medzi študovanými diagnózami (tab. 1) vysvetľujú rozdielne biologické aspekty jednotlivých typov leukemických ochorení, ktorými si môžeme vysvetľovať aj ich rozdielne prognózy. Medzi vzorkami od novo diagnostikovaných a pacientov v relapse sme nezistili štatistický významné rozdiely, ale vysoká variabilita hodnôt LC₅₀ indikuje k individuálnemu prístupu *in vivo* chemoterapie.

Pacienti so solidnými tumormi

Výsledky v tejto časte sme rozdelili podľa diagnóz do dvoch oblastí: bronchogénne karcinómy a karcinómy gastrointestinálneho traktu (GITu).

Chemoterapia pokročilých bronchogénnych karcinómov je relatívne málo úspešná už niekoľko rokov. Najlepšie výsledky pri hodnotení percenta pacientov prežívajúcich jeden rok po liečbe sú dosahované cisplatinovou monoterapiou (24 %), alebo kombináciou s etopozidom (35 %), vinorelbínom (36 %), paklitaxelom (36 %) a gemcitabínom (39 %). Minimálne 2/3 karcinómov sú však k chemoterapii rezistentné a liečba je v týchto prípadoch záťažou pre pacienta, ako aj zdravotný systém [6]. Otestovali sme celkovo 15 vzoriek získaných z nádorového tkaniva. Primárna rezistencia explantovaných buniek bronchogénnych karcinómov sa prejavila v 28,5 % pri cisplatine, 62,5 % (topotekan), 57,1 % (vinorelbín), 50 % (vinkristín), 35,7 % (paklitaxel), 77,7 % (gemcitabín), 55,5 % (etopozid) a v 85,7 % pri dakarbazíne. Najvyššiu rezistenciu sme zaznamenali v prípade antimetabolitu gemcitabínu a dakarbazínu. Relatívne najlepšiu citlivosť nádorových buniek sme zistili na cisplatinu a paklitaxel. Úplnú polychemorezistenciu sme zaznamenali v jednom prípade.

Tab. 1. Prehľad výsledkov testovania chemorezistencie hematologických malignít.

Cytostatiká (testované rozpätie)	Medián LC ₅₀ hodnôt [µg/ml]		
	AML (n = 45)	ALL (n = 18)	CML (n = 8)
6-merkaptopurín, 6-MP (15–500)	423,8	ns	ns
6-tioquanín, 6-TG (1,5–50)	6,32	ns	ns
cytarabín, Ara-C (0,01–10)	1,21	2,57	3,12
kladribín, 2-CdA (0,004–40)	0,035	0,018	ns
dakarbazín, DAK (0,5–500)	289,3	ns	100
daunorubicín, DAU (0,002–2)	0,28	0,4	ns
dexametazón, DEX (0,0002–6)	0,38 *	0,12 *	0,12
doxorubicín, DOX (0,008–8)	0,7	1,06	1,26
etopozid, VP-16 (0,05–50)	8,15 *	1,67 *	ns
idarubicín, IDA (0,002–2)	0,15	ns	ns
metylprednizól, m-Pred (0,006–200)	15,0	11,32	8,14
mitoxantrón, MIX (0,001–1)	0,095	0,06	0,06
prednizón, Pred (0,008–250)	193,9 ***	1,85 ***	ns
vinkristín, VNC (0,05–50)	17,35 *	6,15 *	15,92

Štatistické vyhodnotenie pomocou Willcoxonovho testu:

*** P < 0,0005;

* – P < 0,05; ALL – akútna lymfoblastická leukémia, AML – akútna myeloblastická leukémia, CML – chronická myeloidná leukémia, ns – nebolo stanovené

Tab. 2. Prehľad výsledkov testovania chemorezistencie najpočetnejších skupín pacientov so solidnými tumormi.

Cytostatiká	Počet rezistentných výsledkov / celkový počet [%]			
	BronCa (n = 15)	CaCo (n = 16)	CaRektosigma (n = 28)	CaRekta (n = 11)
5-fluorouracil, 5-FU	ns	4/11 [36]	17/28 [60,7]	3/9 [33]
cisplatina, cis-Pt	5/14 [28,5]	5/11 [45]	12/25 [48]	3/9 [33]
dakarbazín, DAK	6/7 [85,7]	2/5 [67]	16/19 [84]	ns
doxorubicín, DOX	ns	5/5 [100]	ns	ns
etopozid, VP-16	5/9 [55,5]	5/11 [45]	13/15 [81]	1/3 [33]
gemcitabín, GEM	7/9 [77,7]	6/11 [56]	19/25 [76]	3/9 [33]
irinotekan, IRT	ns	ns	4/4 [100]	ns
navelbin, NVB	ns	ns	ns	2/3 [66]
paklitaxel, TAX	5/14 [35,7]	7/11 [64]	11/18 [61]	2/7 [29]
topotekan, TPT	5/8 [62,5]	ns	6/18 [34]	ns
vinkristín, VNC	4/8 [50]	ns	9/10 [90]	1/4 [25]
vinorelbín, VRB	8/14 [57,1]	ns	3/4 [75]	ns

BronCa – bronchogénny karcinóm, CaCo – karcinóm kolorekta, CaRektosigma – karcinóm rektosigmoidálneho spojenia, CaRekta – karcinóm konečníka

Kolorektálny karcinóm v ostatných 30 rokoch obsadzuje prvé miesto v rebríčku zhubných ochorení. Na Slovensku je kolorektálny karcinóm druhým najčastejšie sa vyskytujúcim zhubným nádorom – u mužov za karcinómom pľúc a u žien za karcinómom prsníka. Incidencia kolorektálneho karcinómu na Slovensku má už niekoľko rokov stúpajúci trend, každoročne sa zaznamenáva 4-násobný nárast [7]. Účinnosť štandardnej chemoterapie v spomínanej skupine karcinómov je 20–30 % [8]. V období od roku 2005 sme otestovali 77 vzoriek nádorov získaných z karcinómov GITu rôznej etiológie. Vzorky od pacientov s karcinómom žalúdka (n = 3) boli vnímavé na 5-fluorouracil (5-FU), etopozid a paklitaxel. Naopak rezistenciu na cisplatínu sme zistili u všetkých vzoriek. Nádorové bunky pochádzajúce z hrubého čreva boli v *in vitro* podmienkach citlivé na 5-FU, cis-Pt, VP-16 a rezistentné na DAK. Zo 40 vzoriek tkaniva karcinómu rektosigmoidálneho spojenia v 12 z nich sme nezískali potrebné množstvo buniek na analýzu alebo počas kultivácie došlo ku kontaminácii. Na základe porovnania výsledkov MTT testu sa javia subpopulácie nádorových buniek karcinómu rektosigmoidálneho spojenia najmenej citlivé na testované cytostatiká.

Z výsledkov vyplýva relatívna úspešnosť cisplatíny, ktorá nie je v prípade kolorektálneho karcinómu v terapii na prvom mieste voľby. Citlivosť voči základnému 5-FU je porovnateľná s cis-Pt, ako aj s TAX. Môžeme však uvažovať, že ďalšie liečivá patriace do skupiny antimetabolitov nie sú schopné v krátkodobej kultúre rozvinúť proliferáciu aktivitu v porovnaní s cis-Pt zo skupiny alkylačných látok. Pri vzorkách kolorektálnych karcinómov sme za najúčinnšie cytostatikum označili topotekan. Do skupiny GITu sme zaradili ešte aj karcinómy rekta, kde sme jednoznačne účinné, resp. rezistentné cytostatikum na jednotlivé bunkové populácie (n = 11) nezistili (tab. 2).

Záver

Metyl-tiazol tetrazoliový test poskytuje rýchle určenie liekovej rezistencie pre skúmanú populáciu malígnych buniek s rôznym morfológickým, cytogenetickým a proliferácnym potenciálom. V princípe sa jedná o krátkodobú *in vitro* metódu testovania chemorezistencie, kedy už na 5. deň, od začiatku pokusu, vieme vyhodnotiť výsledok. Vo všeobecnosti sa účinnosť modernej chemoterapie pohybuje medzi 30 a 60 percentami. Tieto *in vitro* prediktívne testy by preto mali byť dostupné na špecializovaných

pracoviskách, kde môžu onkológom poskytnúť možnosť výberu najúčinnjších liečiv pre individualizovanú chemoterapiu. Samotné ich uplatnenie sa v klinickej praxi využíva najmä v prípadoch, kedy neexistujú štandardné chemoterapeutické režimy, definované na základe výsledkov klinických štúdií, a kde ide o recidivujúce a polyrezistentné malignity po predchádzajúcej liečbe. Rovnako tak môžeme testovanie *in vitro* chemorezistenci uskutočniť pri malignitách, kde síce existuje možnosť výberu z viacerých štandardných režimov, avšak ich účinnosť je značne obmedzená.

Aj keď zatiaľ nie sú prediktívne testy chemorezistencie optimálne, ich použitie je v zahraničí realitou súčasnosti. Je potrebné ich naďalej zdokonaľovať, to však nie je možné uskutočniť bez aktívneho príspevku všetkých odborníkov zaoberajúcich sa onkologickými ochoreniami. Rovnako je tak dôležité navodenie intenzívnejšej klinickej diskusie k interpretáciám prediktorov chemorezistencie.

Podakovanie

Za laboratórnu výpomoc pri spracovaní jednotlivých malígnych buniek by sme sa chceli poďakovať pani Jolane Benčatovej.

Literatúra

1. Redmond KM, Wilson TR, Johnston PG et al. Resistance mechanisms to cancer chemotherapy. *Front Biosci* 2008; 13: 5138–5154.
2. Hatok J, Babusikova E, Matakova T et al. *In vitro* assays for the evaluation of drug resistance in tumor cells. *Clin Exp Med* 2009; 9(1): 1–7.
3. Mosmann T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. *J Immunol Methods* 1983; 65(1–2): 55–63.
4. Kaspers GJ, Pieters R, Van Zantwijk CH et al. *In vitro* drug sensitivity of normal peripheral blood lymphocytes and childhood leukaemic cells from bone marrow and peripheral blood. *Br J Cancer* 1991; 64(3): 469–474.
5. Stone RM, O'Donnell MR, Sekeres MA. Acute myeloid leukemia. *Hematology Am Soc Hematol Educ Program* 2004; 98–117.
6. Hajdúch M, Mihál V, Minarík J et al. Decreased *in vitro* chemosensitivity of tumour cells in patients suffering from malignant diseases with poor prognosis. *Cytotechnology* 1996; 19(3): 243–245.
7. Matáková T, Hatok J, Sivoňová M et al. Testovanie chemorezistencie nádorových buniek MTT testom u onkochirurgických pacientov s bronchogénnym karcinómom a nádormi gastrointestinálneho traktu. *Medicina Militaris Slovaca* 2008; 10(1): 15–19.
8. Benson AB. *Gastrointestinal oncology*. Kluwer Academic publisher 1999; 25–36.