

**VYDÁVÁ
ČESKÁ
LÉKAŘSKÁ SPOLEČNOST
J. E. PURKYNĚ**

**V NAKLADATELSTVÍ
ApS BRNO, spol. s r. o.**

**REDAKCE:
Masarykův onkologický ústav Brno
Žlutý kopec č. 7
656 53 Brno**

**Sekretář redakce:
ing. Zdeněk Bouša**

**Grafická a technická úprava:
Bohuslav Havlíček**

**Tiskne Moravská typografie, a. s.
Brno, Moravské náměstí 13**

Vychází 6krát ročně

**Expedici na základě roční objednávky
vyřizuje redakce**

**Podávání novinových zásilek
povoleno Oblastní správou pošt Brno
čj: P/2-3057/94
ze dne 6. 9. 1994**

**F 5158 Mič 46-772
ISSN 0862-495 X**

**INTERNET – vstupní adresa:
<http://www.linkos.cz>**

INDEXED IN EXCERPTA MEDICA

**ČASOPIS ČESKÉ ONKOLOGICKÉ SPOLEČNOSTI
A SLOVENSKEJ ONKOLOGICKEJ SPOLOČNOSTI**

**THE JOURNAL OF THE CZECH AND SLOVAK
ONCOLOGICAL SOCIETIES**

VEDOUcí REDAKTOR: REJTHAR ALEŠ

**ZÁSTUPCE VEDOUcíHO
REDAKTORA: KOZA IVAN
VÝKONNÝ REDAKTOR: FAIT VUK**

REDAKTOŘI:

BEDNAŘÍK OTAKAR	SHEARD MICHAEL
MAYER JIŘÍ	KOCÁK IVO
ČOUPEK PETR	NĚMEC JAROSLAV
	ŽALOUĐÍK JAN

REDAKČNÍ RADA

ADAM ZDENĚK, Brno
BABUŠÍKOVÁ OLGA, Bratislava
BEDNAŘÍK OTAKAR, Brno
BEŠKA FRANTIŠEK, Ostrava
BILDER JOSEF, Brno
ČOUPEK PETR, Brno
DRBAL JOSEF, Brno
ECKHARDT SANDOR,
Budapešť
FAIT VUK, Brno
CHODOUNSKÝ ZDENĚK,
Praha
JURGA LUDOVIT, Trnava
KALLAY JOZEF, Bratislava
KAUŠITZ JURAJ, Bratislava
KLASTERSKÝ JAN, Brusel
KLENER PAVEL, Praha
KOCÁK IVO, Brno
KOUTECKÝ JOSEF, Praha

KOVAŘÍK JAN, Brno
KOZA IVAN, Bratislava
LAGINOVÁ VIERA, Bratislava
MAYER JIŘÍ, Brno
MĚCHL ZDENĚK, Brno
NĚMEC JAROSLAV, Brno
ONDRUŠ DALIBOR, Bratislava
PAČOVSKÝ ZDENĚK, Brno
PLEŠKO IVAN, Bratislava
PETRUŽELKA LUBOŠ, Praha
REJTHAR ALEŠ, Brno
SIRACKÝ JÁN, Bratislava
SPURNÝ VLADIMÍR, Brno
UJHÁZY VILIAM, Bratislava
VORLÍČEK JIŘÍ, Brno
VYZULA ROSTISLAV, Brno
WAGNEROVÁ MÁRIA, Košice
ŽALOUĐÍK JAN, Brno

MNOHOČETNÁ LÉKOVÁ REZISTENCE V KLINICKÉ ONKOLOGII

Obsah

Mirossay L., Mojžíš J.: EDITORIAL	1
Talač R., Žaloudík J., Hajdúch M. et al.: Hodnocení lékové rezistence in vitro a její klinické aplikace	2
Nosková V., Hajdúch M., Mihál V., Cwierka K.: Mechanismy mnohočetné lékové rezistence a jejich význam pro klinickou praxi. I. Typická MDR	4
Nosková V., Hajdúch M., Mihál V., Cwierka K.: Mechanismy mnohočetné lékové rezistence a jejich význam pro klinickou praxi. II. Atypická MDR	10
Chumchalová J., Kovařík J.: Metodiky testování chemosenzitivity/ chemorezistence nádorů in vitro	18
Dušek L., Koptíková L., Hajdúch M. et al.: Příspěvek biostatistiky k standardizaci hodnocení testů chemorezistence nádorů in vitro	22
Regner B., Dušek L., Hajdúch M. et al.: Software chemorezist (verze 1.0) – komplexní nástroj pro analýzu dat a management testů chemorezistence nádorů	30
Ludková A., Hajdúch M., Nosková V. et al.: Střední hodnoty citlivosti na jednotlivá cytostatika u nádorů různého histogenetického původu	33
Žaloudík J., Hajdúch M., Vyzula R. et al.: Výsledky MTT testů chemorezistence u karcinomů plic, kolorekta a sarkomů měkkých tkání	37
Mihál V., Hajdúch M., Janošťáková A. et al.: Využití in vitro analýzy lékové rezistence v léčbě leukémií dětského věku	39
Krásná L., Matoušková E., Janoušek M. et al.: Využití buněk získaných z maligních výpotků k vedení léčby pacientů s pokročilým nádorem	43
Chumchalová J., Dušek L., Kovařík J.: Analýza chemosenzitivity buněčných linií maligního původu a primokultur lidského maligního melanomu na panel protinádorových chemoterapeutik	49
Škarda J., Hajdúch M., Bouchal J. et al.: Vztah mezi expresí proteinů asociovaných s lékovou rezistencí a výsledky in vitro cytotoxického MTT testu u pacientů s NSCLC ..	55
Cwierka K., Hajdúch M., Pilka R. et al.: Chemoterapie ovariálního karcinomu s ohledem na stanovení in vitro chemosenzitivity – vybrané kazuistiky	58
Kiss I., Žaloudík J., Vyzula R. et al.: Hlavní klinické indikace pro testování chemorezistence nádorů in vitro	62

MULTIDRUG RESISTANCE IN CLINICAL ONCOLOGY

CONTENTS

Mirossay L., Mojžíš J.: EDITORIAL	1
Talač R., Žaloudík J., Hajdúch M. et al.: Evaluation of Drug Resistance in Vitro and Its Clinical Implications	2
Nosková V., Hajdúch M., Mihál V., Cwierka K.: Mechanisms of Multidrug Resistance and Their Clinical Implications. I. Typical MDR	4
Nosková V., Hajdúch M., Mihál V., Cwierka K.: Mechanisms of Multidrug Resistance and Their Clinical Implications. II. Atypical MDR	10
Chumchalová J., Kovařík J.: Methods for the Evaluation of Human Tumor Drug Resistance in Vitro	18
Dušek L., Koptíková L., Hajdúch M. et al.: Contribution of Biostatistics to the Standardized Evaluation of Tumor Drug Resistance Tests	22
Regner B., Dušek L., Hajdúch M. et al.: Software Chemoresist Version 1.0- a Complex Tool for Data Analysis and Management of Tumor Drug Resistance Testing	30
Ludková A., Hajdúch M., Nosková V. et al.: Mean Values of in Vitro Chemosensitivities in Tumors of Different Histogenic Origin to Individual Anti-Cancer Drugs	33
Žaloudík J., Hajdúch M., Vyzula R. et al.: Results of the MTT Chemoresistance Testing in Carcinomas of Lung, Colon and Rectum and Soft Tissue Sarcomas	37
Mihál V., Hajdúch M., Janošťáková A. et al.: Application of in Vitro Drug Resistance Assays in Treatment of Childhood Leukemia	39
Krásná L., Matoušková E., Janoušek M. et al.: Use of Malignant Effusions for Guidance in the Treatment of Advanced Cancer	43
Chumchalová J., Dušek L., Kovařík J.: Chemosensitivity of Malignant Cell Lines and Primary Human Malignant Melanoma Cultures to Anticancer Drugs	49
Škarda J., Hajdúch M., Bouchal J. et al.: Relation between Expression of Drug Resistance Associated Proteins and Results of Cytotoxic in Vitro MTT - Assay in NSCLC Patients	55
Cwierka K., Hajdúch M., Pilka R. et al.: Chemotherapy of Ovarian Cancer with Respect to Results of in Vitro Chemosensitivity Assay - Selected Case Reports	58
Kiss I., Žaloudík J., Vyzula R. et al.: Principal Clinical Indications for in Vitro Chemoresistance Testing of Malignant Tumors	62

EDITORIAL

Budúcnosť chemoterapie nádorových ochorení z pohľadu testovania liekovej rezistencie na bunkových kultúrach.

MIROSSAY L., MOJŽIŠ J.
ÚSTAV FARMAKOLOGIE, LEKÁRSKA FAKULTA
UNIVERZITY P. J. ŠAFÁRIKA, KOŠICE, SLOVENSKO

Nové technológie a rýchle narastajúce znalosti o molekulárnej podstate malígnych ochorení poskytujú dôležité možnosti pre budúcnosť chemoterapie. Onkológia dnes lieči širokú škálu geneticky odlišných jedincov podobnými liečebnými protokolmi, ktoré nie sú rovnako účinné pre všetkých pacientov. Naviac v čase, keď nádorová bunka získava metastatický fenotyp, získava aj mnoho genetických zmien, ktoré ju robia rezistentnou na protinádorové lieky. Pochopenie základov malígnych ochorení a mechanizmov rezistencie na molekulárnej úrovni umožní oveľa efektívnejšiu liečbu rakoviny. Preto dnes hovoríme v tejto súvislosti o individualizácii terapie malígnych ochorení.

Najsľubnejším prístupom k individualizácii terapie sa v súčasnosti javí testovanie liekovej rezistencie na bunkových kultúrach (TLRBK). Tento postup na bunkách ľudských nádorov je laboratórnym testom, ktorý sa realizuje na čerstvých vzorkách tkaniva alebo populáciách leukemických buniek. Postup sa skladá z nasledujúcich krokov: i) izolácia nádorových buniek zo vzoriek, ii) vystavenie nádorových buniek pôsobeniu liečiv počas krátkodobej kultivácie, iii) určenie účinku liečiv stanovením bunkovej proliferácie alebo bunkovej smrti. V súčasnosti existujú stovky publikácií pojednávajúcich o výsledkoch TLRBK a ich korelácii s výsledkami terapie a prežívaním pacientov. Časť týchto výsledkov nenašla takúto koreláciu. Táto skutočnosť sa stala príčinou toho, že použitie TLRBK v klinickej onkológii bolo v minulosti

kontroverzné. Druhá časť získaných výsledkov však dokazuje, že zistené súvislosti sú vysoko-pozitívne. Výsledky jasne naznačujú, že ak sú pacienti liečení liekmi, ktoré neboli účinné v laboratórnych testoch, zomierajú signifikantne skôr ako keď sú v liečbe použité lieky, ktoré boli v testoch aktívne. Niektorí vedci sú naviac na základe výsledkov multivariačnej analýzy hlboko presvedčení, že výsledky z testovania liekovej rezistencie sú „oveľa dôležitejšie ako ktorýkoľvek iný klinický alebo laboratórny prognostický ukazovateľ“.

Všetky tieto zistenia tvoria štartovaciu líniu pre návrh, aby bol TLRBK prijatý ako poisťovňami plne hrađený, výberový, a už nie len experimentálny postup pri diagnostike a liečbe malígnych ochorení. Najväčší pokrok sa na tomto poli objavil v Spojených štátoch. Nedávno bolo na zasadnutí Medicare deklarované (Social Security Administration Docket Number 96-1936, Decision rendered April 24, 1998), že „počínajúc 30. júnom 1996 bolo jasne dokázané a akceptované všeobecnou medicínskou komunitou, že testovanie liekovej rezistencie na bunkových kultúrach je súčasťou všeobecne akceptovanej lekárskej praxe. Od tohto dátumu nie je tento postup považovaný za výlučne experimentálny“.

In vitro TLRBK, ako napr. MTT metóda, môžu slúžiť ako hodnotný prostriedok pre predvídanie individuálneho výsledku terapie. Napriek tomu, že ešte existuje reálna potreba získať viac príkladov korelácie in vitro senzitivity v klinickom výsledkom, už dnes je známych prinajmenšom niekoľko príčin alebo situácií, kde by mohli byť výsledky testov užitočné. Sme presvedčení, že pacienti s relapsom rezistentného malígneho ochorenia, nádormi neodpovedajúcimi na zaužívanú terapiu, neoplastickými procesmi, kde dnes neexistuje adekvátna protokolárna liečba, sú kandidátmi pre individualizovanú terapiu, založenú na TLRBK. Ak už pre nič iné, tak v prípade in vitro rezistencie na niektoré protinádorové lieky je možné aspoň eliminovať vysoko toxické vedľajšie účinky nepoužitím týchto neúčinných látok v liečebných protokoloch.

EDITORIAL

The future of chemotherapy in cancer with regard to cell culture drug resistance testing

MIROSSAY L., MOJŽIŠ J.
DEPT. PHARMACOL., MED. FAC., P. J. ŠAFÁRIK
UNIV., KOŠICE, SLOVAKIA

New technologies and the rapidly increasing knowledge about the molecular basis of malignant diseases provide important opportunities for the future of chemotherapy. Oncology is used today to treat a whole range of genetically different individuals with similar treatment protocols which are no equally effective for all. Moreover, by a time a cancer cell acquires a metastatic phenotype it has acquired many genetic changes which make it resistant to anticancer drugs. A molecular understanding of the basis of malignant diseases and mechanisms of resistance will allow the cancer to be treated much more effectively. We are talking now in this content about individualized chemotherapy in malignant diseases.

The most promising approach for therapy individualization is nowadays cell culture drug resistance testing (CCDRT). This human tumor cell assay is a laboratory test performed on fresh tissue specimens or leukemic blood cell populations. The procedure includes following steps: i) isolating tumor cells from the samples, ii) exposing the tumor cells to drugs during short-term culture, iii) assessing drug effects by measuring either cell proliferation or cell death. There exist hundreds of publications with dealing the results of CCDRT and their correlation with therapy outcome and patient survival. One part of results did not find such a correlation. This is why the application of CCDRT in clinical oncology has been controversial in the past. The other

part of obtained results is indicating the associations are highly positive.

The results clearly demonstrate that if the patients are treated with drugs which are not active in these assays, the patients die significantly sooner than when they are treated with drugs which are active in the assays. Moreover, some researchers on the basis of the results of multi-variate analysis are highly persuaded, that drug resistance assay results are „far more important than any other clinical or laboratory prognostic factor“.

All these findings form the start point for proposal CCDRT to be a fully-reimbursable, selective, non-investigational service in malignant diseases diagnosis and treatment. The greatest progress in this field appeared in the United States. More recently, it was determined in a Medicare Hearing (Social Security Administration Docket Number 96-1936, Decision rendered April 24, 1998) that „By June 30, 1996, Cell Culture Drug Resistance Testing was sufficiently proven and accepted by the general medical community to be part of the generally accepted medical practice. From that time forward it is no longer considered as experimental“.

In vitro CCDRT like the MTT assay may provide a valuable tool for prediction of individual therapy outcome. Even there exists a real need for more examples in in vitro sensitivity correlated with overall clinical outcome, there exist at least several reasons or situations in which it could be actually useful. We are persuaded that patients with relapsed, resistant malignant diseases, with tumors non responding to usual chemotherapy and neoplasms where the treatment protocols are not established today, are the candidates for individualized therapy based on CCDRT. If nothing else, in the case of in vitro resistance to selected anticancer drugs, the highly toxic side effects could be eliminated by avoiding the use of such noneffective agents in treatment protocols.

HODNOCENÍ LÉKOVÉ REZISTENCE IN VITRO A JEJÍ KLINICKÉ IMPLIKACE

EVALUATION OF DRUG RESISTANCE IN VITRO AND ITS CLINICAL IMPLICATIONS

¹TALACH R., ²ŽALOUDEK J., ²HAJDÚCH M., ²MIHÁL V., ¹CHUMCHALOVÁ J., HANKEL., KOVAŘÍK J.
UNIVERZITNÍ ONKOLOGICKÉ CENTRUM, MASARYKOVA UNIVERZITA BRNO A MASÁŘKŮV ONKOLOGICKÝ
ÚSTAV V BRNĚ

²LABORATOR EXPERIMENTÁLNÍ MEDICÍNY PŘI DĚTSKÉ KLINICE LF UNIVERSITY PALACKÉHO A FN V OLOMOUCI
*Korespondující autor: Laboratoř experimentální medicíny Dětské kliniky LF UP a FN Olomouc, Puškinova 6, 775 20 Olomouc.
E-mail: hajduchm@atlas.cz

Souhrn: Práce diskutuje problematiku individualizace chemoterapie u nemocných se zhoubnými novotvarami s použitím prediktivních testů. Zvláštní pozornost je věnována testům in vitro chemosensitivity a možnostem jejich uplatnění v klinické praxi. Rozebrány jsou možnosti respektování výsledků chemorezistence v různých klinických situacích.

Klíčová slova: chemorezistence, prediktivní onkologie, mnohočetná léková rezistence

Summary: Review article discusses area of individualized chemotherapy in patients suffering from malignant diseases. Special attention is focused on tests of in vitro chemosensitivity and their value in clinical practice. The list of clinical situations where patient can profit from results of in vitro assays is listed in this paper.

Key words: chemoresistance, predictive oncology, multidrug resistance

Všeobecně akceptovaným základem současné diagnostiky, léčby i prognózování maligních nádorů je dnes TNM klasifikace. Tento systém stratifikuje pacienty podle morfologického rozsahu nádorového onemocnění. Morfologická klasifikace je nesporně přínosem v léčbě onkologických pacientů, poskytuje ale pouze minimální informace o biologické povaze nádorového onemocnění. Narůstající znalosti v oblasti biologie nádorů ukazují, že právě vlastnosti jako instabilita genomu, proliferační aktivita, pohotovost k apoptóze, metastatický potenciál nádorových buněk, jakož i kvalita protinádorové imunitní odpovědi významně určují klinický průběh nemoci (1,2). V literatuře lze najít mnoho publikací popisujících výskyt různých biologických znaků v rámci určitého histologického typu nádoru. Klinické interpretace těchto informací ve vztahu k cílené léčbě jsou však zatím sporadické.

Současná klinická onkologie staví na výsledcích randomizovaných klinických studií. Za léčebný standard je přijímán statisticky nejlepší léčebný postup. Realitou chemoterapie většiny solidních nádorů přitom zůstává, že významnou odpověď na tento statisticky nejlepší postup lze pozorovat jen u části nádorů. Hodnocení léčebné odpovědi navíc nemusí znamenat vyléčení nebo prodloužení života nemocného. Větší část léčebných odpovědí je klasifikována jako parciální, což znamená, že podstatná část nádoru není léčbou postížena a dále progreduje. Přitom se nebere ohled na skutečnost, že i chemoterapie dosahující statisticky horšího výsledku může být individuálně účinnější. Důvod je absence prediktivních testů v klinické onkologii a tudíž i minimální individualizace léčby (tailoring), k níž se uchylujeme obvykle až po vyčerpání léčebných možností tak zvané standardní, tedy paušalizované terapie.

Ačkoliv chemoterapie představuje dnes jedinou standardně používanou systémovou protinádorovou léčbu, jaké jsou možnosti predikce její účinnosti? Populace nádorových buněk vykazuje vysoký stupeň heterogenity prakticky ve všech svých biologických vlastnostech (3). Z toho také plyne, že nádor často obsahuje populace s rozdílnou citlivostí na danou chemoterapii. Onkologický pacient se tak stává subjektem individuálního klinického pokusu, jehož výsledek je nejasný a lékař neví zdali podal „správný lék správnému pacientovi“. Považujeme za důležité si uvědomit, že je-li daný nádor vůči podávanému cytostatiku rezistentní, pak bez ohledu na statistické výsledky randomizovaných studií:

1. nelze u daného jednotlivce očekávat léčebný efekt
2. pacient je zbytečně zatěžován toxickou látkou a trpí zcela zbytečně nežádoucími účinky
3. jde o zcela neúčelné vynakládání finančních prostředků i sil zdravotnických pracovníků
4. průběh onemocnění může být dokonce i zhoršen oslabením metabolismu a přirozených obranných mechanismů nemocného, případně vznikem dalších mutací v nádoru, perturbací jeho proliferace a vývojem nepříznivých diverzifikačních změn.

Nezanedbatelným rozměrem onkologické péče jsou náklady spojené s neefektivní léčbou. Tyto informace jsou publikovány pouze v posledních několika letech a v České republice zatím chybí. Recentní analýza přímých nákladů efektivní a neefektivní iniciální chemoterapie v USA ukázala, že neefektivní léčba je ve srovnání s léčbou účinnou dva- až pětikrát dražší. Rozdíl přímých léčebných nákladů se pohyboval v rozmezí od 7000 do 25000 dolarů (4).

Myšlenka individualizace terapie na základě testování citlivosti in vitro není nová. Podobné testy jsou nejen rutinní součástí léčby infekcí, nýbrž představují první krok v racionální volbě léku. Výběr preparátu závisí na jeho předpokládané účinnosti, farmakokinetických vlastnostech a spektru nežádoucích účinků. Jsou-li k dispozici dva preparáty srovnatelných vlastností, je preferován ten levnější (5). Ačkoliv uvedená pravidla jsou všeobecně akceptována pro racionální léčbu infekcí, názory na jejich smysl v rámci racionalizace protinádorové léčby se různí.

Prvním krokem k individualizaci terapie je logicky predikce rezistence dané populace vůči panelu dostupných léků. Léčíme-li infekci jde o bakterie, u maligních nádorů jsou to nádorové buňky. V obou případech rezistence nebo citlivost dané populace není homogenní, nýbrž heterogenní. Navíc populace nádorových buněk má k dispozici četné mechanismy jak se „bránit“ před toxickými účinky cytostatika. Prediktivní testy u antibiotik umožňují odhadnout rezistenci či citlivost individuální bakteriální populace vůči danému spektru léků a tím nasměrovat lékaře k efektivnější léčbě (5). Prediktivní testy u cytostatik mohou stejně tak pomoci onkologovi odhadnout rezistenci nebo citlivost konkrétní populace nádorových buněk vůči danému spektru cytostatik a zvýšit tak pravděpodobnost účinnosti léčby. Problematika testování maligních nádorů je nesporně složitější než u infekcí. Tento fakt je dostatečným důvodem k pečlivému hodnocení jednotlivých testů, nelze jej však považovat za argument proti snahám o zavedení in vitro testů do protinádorové léčby. Kdy používat prediktivní testy v léčbě nádorů? Obecně je prediktivní test užitečný vždy, kdy existuje legitimní volba mezi alespoň dvěma typy chemoterapie nebo při volbě mezi chemoterapií a jinou léčebnou modalitou (6). Klinická praxe ukazuje, že to nastává u většiny onkologických pacientů. Máme sledovat rezistenci nebo citlivost? Z biologického i praktického hlediska je stanovení rezistence in vitro daleko jednodušší a také přesnější nežli predikce citlivosti. Vykazuje-li nádor rezistenci in vitro, tedy za situace, kdy jsou nádorové buňky arteficiálně vystaveny přímému účinku testovaného cytostatika, lze předpokládat, že daný preparát bude neúčinný in vivo, kdy kromě buněčných mechanismů brání průniku cytostatika k nádorovým buňkám řada biologických faktorů (heterogenní perфуze nádorového ložiska, přítomnost četných A-V spojek, vysoký intersticiální tlak v nádorovém ložisku a pod). Eliminace neúčinných preparátů tak dále zvyšuje šance léčebného úspěchu. Weisenthal uvádí pravděpodobnost účinku určitého cytostatika zařazeného podle výsledku testu rezistence do jedné ze čtyř skupin (Tabulka 1) (6).

Informace, že nádorová populace nevykazuje in vitro rezistenci vůči testovanému cytostatiku však neznamená, že nádor bude na dané cytostatikum citlivý. Predikce citlivosti populace nádorových buněk vůči určitému cytostatiku na základě in vitro testů představuje daleko obtížnější úkol. Důvodem je nemožnost in vitro testů dostatečně napodobit situaci v lidském těle. Navíc mnohé biologické interakce mezi nádorovými buňkami a hostitelem jsou zatím neznámé. I v této oblasti je však popisován určitý pokrok. Testy citlivosti kombinují informace o rezistenci vůči určitým cytostatikům se stanovením cyto-kinetických parametrů testované nádorové populace (7,9,10). Tyto informace mají stěžejní význam, protože nádorové buňky se z hle-

diska své cytokinetiky nechovají stejně. Baker rozděluje každou populaci nádorových buněk do tří funkčních skupin: (a) buňky terminálně diferencované, které ztratily reprodukční potenciál, (b) buňky mající reprodukční potenciál, které se nachází v určité fázi buněčného dělení a (c) buňky, které reprodukční potenciál mají, ale nedělí se (8). Na základě tohoto rozdělení dále zavádí pojem terapeutický index (TI = procento buněk s reprodukčním potenciálem které se aktuálně dělí / všechny buňky s reprodukčním potenciálem). Protože cytostatika účinkují převážně na dělící se nádorové buňky, čím vyšší je terapeutický index, tím bude zásah chemoterapie do reprodukční frakce nádorové populace hlubší a léčba bude účinnější (11). Jaký je účinek chemoterapie na nedělící se buňky s reprodukčním potenciálem není úplně jasné. Klinicky poměrně často pozorovaná získaná rezistence reziduální nádorové populace může být jednak výsledkem selekce rezistentních buněk v době iniciální léčby, ale také důsledkem mutagenního vlivu cytostatik na nedělící se buňky. Tyto buňky si zachovávají schopnost reprodukce, ale tím že se v době léčby nedělí unikají jejímu cytotoxickému účinku (16). Otázce zda-li tyto účinky mají nějaký vliv na změnu biologických vlastností nádoru a projeví se následnou změnou klinického průběhu onemocnění byla zatím věnována pouze minimální pozornost (12). Testování chemorezistence nádorů je nesporně komplexním problémem. Kromě in vitro cytotoxických testů existuje celá řada molekulárních bioparametrů a prediktorů odrážejících s různou spolehlivostí a specifitou pravděpodobnou neúčinnost chemoterapie. Tyto znaky je možno seřadit do několika kategorií. Mezi parametry vzešlé z nepřímých testů a jen volně asociované s obecnou chemorezistencí lze zařadit celou řadu biologických charakteristik nádorů jako jsou proliferace, mitotická aktivita, pohotovost nádorových buněk k apoptóze, genomová instabilita vyjádřená DNA ploiditou, kapacitou reparace DNA nebo specifickými supresorovými mechanismy jako je p53, dále overexpresi některých onkoproteinů (HER2/neu), telomerázová aktivita, ovšem i typ metabolismu nebo věk nemocného. Jde o slabší prediktory, jejichž uplatnění, můžeme očekávat pouze v kombinacích a sofistikovanějších matematických modelech. Další skupinou jsou parametry volně asociované avšak založené již na specifickém vztahu k určitému typu cytostatik, které reprezentují především detoxikační buněčné mechanismy. Typickým představitelem je produkt genu mnohočetné lékové rezistence (MDR) p170 označovány také jako P-glykoproteinová detoxikační pumpa. Predikuje především rezistenci na cytostatika s velkou a komplexní molekulou jako jsou antacyklyny, taxany nebo inhibitory topoisomerázy. Jiným příkladem může být transportní protein lékové rezistence MRP u platinových derivátů.

Podstatně silnější prediktivní hodnotu mohou mít i v univariační analýze parametry přímo asociované s mechanismem působení dané skupiny cytostatik jako je tymidilát syntáza v případě fluoropirimidinů, glutathion-S-transferáza u alkylacích látek, mutace beta-tubulinu v případě taxanů, estrogenové receptory v účinnosti kompetitivních antiestrogenů nebo aromatázová aktivita u inhibitorů aromatázy. Přímé testy chemorezistence in vivo na nádorových xenotransplantátech u nu/nu a SCID myši nejsou v běžné praxi proveditelné a zůstanou omezeny na experimentální onkologii. Nedočeným testem in vivo je ovšem vlastní klinické podávání cytostatika za předpokladu, že lze exaktně zhodnotit jeho účinnost, což je u časných stádií nádorů možné v případě neoadjuvantní chemoterapie. V případě, že se v biopsii před a po chemoterapii daří stanovit podrobnější změny bioparametrů než pouze změnu velikosti, lze hovořit o monitorované neoadjuvantní chemoterapii, která se však bohužel objevuje ve formě klinických studií jen vzácně. Je zřejmé, že interpretace těchto dat jsou náročnější a vyžadují nejen znalost technických detailů jednotlivých testů, ale také schopnost interpretovat výsledky v kontextu biologie nádorového onemocnění. I když existují pracoviště poskytující komplexnější informace o biologických vlastnostech daného nádoru (6), jejich klinické aplikace jsou zatím stále hledány.

V současné době je k dispozici několik prediktivních testů, které byly použity v rámci několika klinických studií (13,14,15,17). Detailní analýza výsledků přesahuje rámec této publikace. Souhrnně však tyto studie ukázaly, že prediktivní testy umožňují individualizovat protinádorovou léčbu a zlepšit tak její výsledky. Žádný z použitých testů však nemůže považovat za optimální nebo standardní, nicméně na základě současných klinicko-laboratorních zkušeností a literárních referencí doporučujeme respektovat výsledky in vitro testů chemosenzitivity v klinických situacích shrnutých v Tabulce 2. V následující sérii článků budou diskutovány jednotlivé problé-

my prediktivních analýz, jakož i první výsledky a zkušenosti s prediktivními testy v České Republice. Prediktivní testy jsou tedy realitou dneška. Zatím nejsou optimální, nicméně jejich zdokonalení si lze jen stěží představit bez aktivního přispění všech odborníků zabývajících se maligními nádory.

Tabulka 1: Pravděpodobnost terapeutické odpovědi na základě testu in vitro chemosenzitivity.

Pravděpodobnost účinku	Skupina
20:1	4 versus 1
10:1	3 versus 1
2: 1	2 versus 1
2:1	4 versus 3
7: 1	4 versus 2
4: 1	3 versus 2

Skupina 1 - lék, který virtuálně nemá žádnou šanci být účinný
 Skupina 2 - lék, který má nižší šanci být účinný než se předpokládá
 Skupina 3 - lék, který má průměrnou šanci být účinný
 Skupina 4 - lék, který má vyšší šanci být účinný než se předpokládá

Tabulka 2: Souhrn klinických situací, ve kterých lze doporučit respektování výsledků testu in vitro chemosenzitivity.

- Diagnóza umožňuje výběr standardního režimu obsahujícího maximum senzitivních cytostatik.
- Nemocní, kteří vyčerpalí standardní protinádorovou léčbu.
- Nemocní s nádorem, jehož biologické vlastnosti jej řadí do prognosticky špatné skupiny s minimální pravděpodobností na léčebnou odpověď (např. neuroblastom gr. IV s amplifikací n-myc).
- Nemocní se vzácnými nádory, kde nejsou dostatečné zkušenosti s chemoterapií.
- Pacienti s nádorem neznámého původu.
- Aplikace nových léčiv, zatím klinicky nezkoušených pro danou diagnózu, jsou-li vyčerpaný standardní postupy.

PODĚKOVÁNÍ

Práce na projektu lékové rezistence jsou v Laboratoři experimentální medicíny LF UP a FN v Olomouci podporovány granty IGAMZ 4132-5, MŠMT VZ J14/98 151100001, VS 96152 a Nadací pro výzkum rakoviny v Olomouci.

Literatura:

1. Liu E. Cancer Biology. Curr Opin Oncol 1999; 11(1):49.
2. Talač R, McConnell EJ. Monitorace imunitního systému u onkologických nemocných. V monoklonální protilátky v onkologické léčbě. (Ed: kolektiv autorů), Brno 2000, v tisku.
3. Lichý JH, Dalbergue F, Washington C, a kol. Genetic heterogeneity in ductal carcinoma of the breast. Lab Invest 2000; 80(3): 291-301.
4. Dickinson K D, Myers TJ. Cost savings in cancer care from the selection of effective vs. ineffective initial chemotherapy. In: Advances in Cancer Control: Screening and Prevention Research. Wiley-Liss New York 1990:465-476.
5. Myček MJ, Harvey RA, Champe PC. Principles of Antimicrobial therapy, in Lippincott's Illustrated Pharmacology, 2 edition Ed. Myček MJ, Harvey RA, Champe PC. Lippincott Williams and Wilkins, Philadelphia, PA 2000; 279-288.
6. Weisenthal I. Cell Culture Drug Resistance Testing. <http://www.virtualtrials.com/assay.html>
7. Baker FL. Cell kinetics and the in vivo vs. in vitro response of human tumors to chemotherapy drugs. Oncology Reports 1995; 2: 1125-1126.
8. Baker FL, Sanger LJ, Rodgers RW, Jabboury K, Mangini OR. Cell proliferation kinetics of normal and tumor tissue in vitro: quiescent reproductive cells and the cycling reproductive fraction. Cell Prolif. 1995; 28:1-15.
9. Lamb JR, Friend SH. Which guesstimate is the best guesstimate? Predicting chemotherapeutic outcomes. Nature Medicine 1997; 3: 962-963.
10. Waldman T, Zhang Y, Dillehay L, Yu J, Kinzler K, Vogelstein B, Williams J. Cell-cycle arrest versus cell death in cancer therapy. Nature Medicine 1997; 3: 1034-1036.
11. Baker FL. Predictive in vitro analyses.
12. Žaloudík J, Fait V, Vermousek I, Vagunda V, Janáková L, Chrenko V, Sheard M, Talač R, Pačovský Z. Léčbou navozená diverzifikace karcinomu prsu. Klinická onkologie 1997; 10: 2-5.
13. Bosanquet AG, Bell PB. Novel Ex vivo analysis of nonclassical, pleiotropic drug resistance and collateral sensitive induced by therapy provides a rationale for treatment strategies in chronic lymphocytic leukemia. Blood 1996; 87 (5): 1962-1971.
14. Weisenthal L M. Clinical correlations for cell culture drug resistance assays based on the concept of total tumor cell kill. In Koechli, et al (eds) Chemosensitivity Testing in Gynecologic Malignancies and Breast Cancer, Contrib Gynecol Obstet, Basel, Karger, 1994; 19: 82-90.
15. Nagourney RA. A new paradigm for cancer chemotherapy. Cope 1993; (May/June issue): 44-46.
16. Jackson RC. The problem of the „quiescent“ cancer cell. Adv. Enzyme Reg. 1989; 29: 27-46.
17. Kawamura H, Bceda K, Takiyama I, Terashima M. The usefulness of the ATP assay with serum-free culture for chemosensitivity testing of gastrointestinal cancers. Eur J Cancer 1997; 33(6): 960-966.

MECHANIZMY MNOHOČETNÉ LÉKOVÉ REZISTENCE A JEJICH VÝZNAM PRO KLINICKOU PRAXI

I. TYPICKÁ MDR

MECHANISMS OF MULTIDRUG RESISTANCE AND THEIR CLINICAL IMPLICATIONS

I. TYPICAL MDR

NOSKOVÁ V.¹, HAJDÚCH M.¹, MIHÁL V.¹, CWJERTKA K.²

¹LABORATOŘ EXPERIMENTÁLNÍ MEDICÍNY PŘI DĚTSKÉ KLINICE LF UP A FN OLMOUC

²ONKOLOGICKÁ KLINIKA LF UP A FN OLMOUC

Souhrn: Chemoterapie nádorových onemocnění je dnes rovnocenná s chirurgickou léčbou a radioterapií. Jednou z nejzávažnějších komplikací a příčinou jejího selhání je schopnost nádorových buněk odolávat účinkům cytotoxických látek. Článek podává přehled současných znalostí o problematice lékové rezistence maligně transformovaných buněk se zaměřením na mnohočetnou lékovou rezistenci (MDR). Jsou popsána kritéria dle kterých se MDR dělí na typickou (klasickou) a atypickou. Typická MDR je způsobena membránovým P-glykoproteinem (Pgp) o molekulové hmotnosti 170 kDa patřícího do rodiny ABC-transportních proteinů. Je popsán jeho výskyt u široké škály organismů, jeho struktura a funkce i hypotézy snažící se osvětlit jeho širokou substrátovou specifičnost. Pozornost je věnována i přirozené expresi Pgp v lidských tkáních. V druhé polovině jsou uvedeny studie zabývající se významem Pgp pro klinickou MDR a to jak u hematologických nádorových onemocnění, tak u solidních tumorů.

Clíčová slova: mnohočetná léková rezistence, P-glykoprotein, ABC-transportní proteiny, chemosenzitory, mdrl gen, chemoterapie

Summary: Surgery, radiotherapy and chemotherapy are 3 most effective ways to treat malignant diseases today. One of the most serious complications and also reason of chemotherapy failure is an ability of tumor cells to resist cytotoxic agents. This paper reviews drug resistance issue of malignant cells and is focused on multidrug resistance (MDR). Criteria are given to divide MDR to 2 groups: typical (classical) MDR and atypical MDR. Classical MDR is caused by membrane P-glycoprotein (Pgp). This 170 kDa protein belongs to a superfamily of ABC-transport proteins. Pgp molecule is described here as for its structure, functions, and natural expression in human tissues. Hypothesis trying to explain its broad specificity are given as well as its presence in organisms ranging from bacteria to man. Studies dealing with significance of Pgp for clinical MDR in hematological malignancies and solid tumors are also reported.

Keywords: multidrug resistance, P-glycoprotein, ABC-transport proteins, chemosensors, mdrl gene, chemotherapy

I. Obecný úvod k MDR

Ačkoliv se chemoterapie nádorových onemocnění stala na přelomu 60. a 70. let rovnocennou s chirurgií a radioterapií, zůstává stále klíčovým problémem odhad účinnosti cytostatické léčby v eradikaci nádoru a současně míry její toxicity pro pacienta. Definovat všechny okolnosti ovlivňující účinnost cytostatické léčby a příčiny variabilní odpovědi onkologických pacientů na ni je velmi obtížné. V zásadě je však můžeme rozdělit do dvou skupin:

1. závislé od pacienta (věk, pohlaví, renální a jaterní funkce, vazebná kapacita plazmatických proteinů, souběžná léčba jinými medikamenty... atd),
2. závislé od nádoru (typ, lokalizace, rozsah, agresivita, metastatická aktivita, předchozí léčba... atd).

Jednou z nejzávažnějších komplikací protinádorové léčby a nejdůležitější příčinou jejího selhání je schopnost nádorových buněk odolávat účinkům cytotoxických látek. Maligní buněčné populace mohou být vůči chemoterapii rezistentní již při první léčbě. V tomto případě jde o tzv. přirozenou (primární) rezistenci. Získaná (sekundární) rezistence vzniká až v průběhu cytostatické léčby, kdy se původně citlivé buňky stávají rezistentními a účinnost cytostatické léčby se snižuje. Při ztrátě citlivosti k určitému cytostatiku může však být zachována citlivost k jiným léčivům. Pokud při ztrátě citlivosti k jednomu přípravku vzniká současně rezistence na jiné, většinou strukturálně příbuzné cytostatikum, hovoříme o zkřížené rezistenci. Byly však popsány případy zkřížené rezistence mezi protinádorovými léčivy lišícími se jak strukturálně, tak mechanismem účinku. Takové případy rezistence pak nazýváme mnohočetná léková rezistence (multidrug resistance, MDR). MDR vysvětluje případy necitlivosti některých nádorů k alternativním léčebným režimům, obsahujícím nové druhy cytostatik, nepoužitých v původní léčbě.

Mechanismy, kterými vzniká rezistence nádorových buněk na protinádorovou léčbu, jsou komplexnější povahy. Vznik rezistence je nejčastěji vázán na

1. **změny farmakokinetiky:** snížená resorpce cytostatika, urychlení biotransformace, rychlejší inaktivace nebo urychlené vylučování.
2. **změny cytokinetiky:** narůstání nádoru je doprovázeno přechodem větší části nádorových buněk do klidového stavu G_0 , v němž je citlivost k chemoterapii omezená. Rovněž s přibývajícím nádorovou masou vznikají spontánní mutace buněk - zvyšuje se heterogenita buněčné populace, která zakládá vznik klonu s odlišnou citlivostí k léčbě. Léčba tak ničí jen citlivou frakci buněk a dochází k selekci a následnému pomnožení rezistentní populace.

3. **strukturální a funkční změny buňky:** jde o vůbec nejčastější způsob vzniku rezistence zahrnující sníženou/zvýšenou expresi či aktivitu enzymů, porušení intracelulární distribuce cytostatika (např. vazbou na lysozom), ovlivnění transportu cytostatika buněčnou membránou, zvýšenou intenzitu oprav DNA.

II. Typická a atypická mnohočetná léková rezistence (MDR)

Mnohočetná léková rezistence byla poprvé popsána v roce 1970¹⁵ na plicní buněčné linii izolované z čínské křečky a na buněčné linii myši leukémie P388. Autoři zde pozorovali zkříženou rezistenci aktinomycin D rezistentních buněk s vinblastinem a daunomycinem. Další pracovní skupiny prokázaly, že tato zkřížená rezistence se vztahuje i na vinca alkaloidy, antracykliny, etopozid⁽¹⁵⁾ a dokonce i na mitomycin C⁽⁴⁶⁾, tedy poměrně hydrofobní léčiva s mírně zásaditým charakterem.

Vzhledem ke skutečnosti, že MDR je výraznou komplikací protinádorové léčby, probíhá na tomto poli v posledních dvou desetiletích intenzivní výzkum. Byly popsány mechanismy s jejichž pomocí je nádorová buňka schopná úspěšně odolávat chemoterapii, identifikována cytostatika po jejich podání se může vyvinout MDR a cytostatika, která nejenže nevyvolávají MDR, ale jsou účinná i u nádorových buněk s MDR fenotypem (Tab. 1).

Mnohočetná léková rezistence se tak rozděluje do dvou skupin. Typická (klasická) MDR je způsobena membránovým glykoproteinem, který je produktem mdrl genu. Tento P-glykoprotein (Pgp) je ATP dependentní membránová pumpa exportující toxické látky z buňky a způsobující tak sníženou intracelulární akumulaci léčiva. Z terapeutického hlediska je důležitou vlastností typické MDR možnost jejího obejití pomocí chemosenzitorů - látek, obnovujících vnímavost MDR buněk k protinádorové léčbě^(7-55,84,114,146,183,185). Za všechny jmenujme alespoň verapamil, cyklosporin A a jeho neimunosupresivní a méně toxický derivát PSC-833. Přehled chemosenzitorů uvádí Tab.2.

V současnosti však bylo popsáno, že MDR modulatory kromě přímé vazby na Pgp, mají společný i zásah do metabolismu lipidů - v MDR rezistentních buňkách blokuje konverzi ceramidů na glykosylceramidy. Glykosylceramidy jsou prekurzory pro syntézu glykosfingolipidů a podílí se i na regulaci buněčné proliferace. Naopak ceramidy mohou aktivovat transkripční faktory - nukleární faktor κB (NF- κB) a AP-1. Mají tedy klíčovou úlohu v signalizaci apoptózy. Na základě těchto pozorování autoři konstatují, že zvýšená schopnost některých nádorových buněk konvergovat toxické ceramidy na netoxické glykosylceramidy a následná pří-

Tab. 1: Výskyt mnohočetné lékové rezistence u některých cytostatik

MDR častá	MDR vzácná
Aktinomycin D	bleomycin
doxorubicin	cisplatina
daunorubicin	cyklofosfamid
vepesid	cytosin arabinosid
mitoxantron	5-fluorouracil
taxol	ifosfamid
vinkristin	metotrexát
	topotekan

Tab. 2: Látky obnovující *in vitro* vnímavost MDR nádorových buněk na cytostatika

Blokátory kalciového kanálu	Imunosupresivní látky
Verapamil (6-10 uM)	Cyklosporin A (0,8-2 mM)
Nifedipin (35 uM)	11-Methyl-leucine-cyclosporine (1uM)
Nikardipin (3-10uM)	SDZPSC833 (0,1uM)
Niguldipin (10 uM)	SDZ 280-446 (0,1 uM)
Bepiridil (4 uM)	FK506 (3 uM)
PAK-200 (5 uM)	Rapamycin (3 uM)
Antagonists kalmolulinu (CaM)	Antibiotika
Trifluoperazin (3-5uM)	Cefoperazon(1000uM)
Prochlorperazin (4 uM)	Ceftriaxon(1000uM)
Fluphenazin (3uM)	Erythromycin (650 uM)
rans-Flupenthixol (3-5 uM)	Tetracyklin (4000 uM)
Necytotoxické antracykliny a vinca alkaloidy	Různé hydrofobní a kationické sloučeniny
Vindolin (20-50 mM)	Dipyridamol (5-10 uM)
	BIBW22(1uM)
Steroidy a hormonální antagonisté	Quanidin (10 mM)
Progesteron 2 uM)	Chloroquin 10-50 uM)
Tamoxifen (3-10 uM)	Terfenadin (3-6 uM)
Toremifen(5-10uM)	Reserpin (5 uM)
Megestrol acetát (5 uM)	Yohimbin (5 uM)
	Amiodaron (5 uM)
	SolutolHS14(4-14uM)

Pozn.: Koncentrace uvedené v závorkách obnovují vnímavost *in vitro*

tomnost zvýšeného množství glykosylceramidů v buňce jsou rozhodujícími činiteli MDR^(82,116).

Jako atypická MDR (at-MDR) jsou souhrnně označovány všechny mechanismy mnohočetné lékové rezistence na kterých se neúčastní Pgp. Atypická MDR může být způsobena změnou subcelulární distribuce léčiva, poškozením cílové struktury léčiva, rozdílnou kapacitou DNA opravných procesů či změnami detoxifikačních metabolických drah buňky. Od typické se odlišuje především tím, že nezahrnuje rezistenci na vinca alkaloidy. Z klinického hlediska nebyly k obejití at-MDR nalezeny žádné spolehlivé preparáty. Atypická MDR je asociována zejména s následujícími proteiny: multidrug resistance associated protein (MRP), lung resistance related protein (LRP) a sp izoformou enzymu glutathion-S-transferazy (GST-p).

111. Změny u MDR buněk

Změny, které pozorujeme u MDR buněk lze rozdělit do 3 hlavních skupin:

1. fyziologické změny MDR buněk ovlivňující strukturu plazmatické membrány, cytoplazmatické pH, ve zvýšené míře probíhá intracelulární transport a exocytóza přes plazmatickou membránu; rovněž je pozorována zvýšená vakuolizace buněk a změny struktury i funkce lyzozomů
2. změny v expresi a aktivitě některých buněčných proteinů
3. snížená schopnost MDR buněk akumulovat cytotoxická léčiva. Většina cytotoxických léčiv jsou slabé zásady jejichž pH se pohybuje v rozmezí 7,4 - 8,2^(45,129,156). V neutrálním prostředí jsou tyto látky hydrofobní, snadno prostupují plazmatickou membránou. Dojde-li intracelulárně k okyselení léčiva, stane se pro něj cytoplazmatická membrána nepropustná. Po prostupu buněčnou membránou se cytotoxická látka kumuluje primárně v kyselých buněčných organelách, např. Golgiho aparát, lyzozomy (11.54.182) Mechanismus, který způsobí zvýšený záchyt sloučenin v příslušných organelách vyústí ve snížení jejich koncentrace v cytoplaz-

mě i v jádře a tím umožní přežití buňky. Změny buněčného pH ovlivňují míru jak intracelulárního transportu, tak vlastní exocytózy⁽¹⁷⁵⁾. Relativní poměr mezi neutrální a okyselenou formou léčiva tedy určen koncentrací protonů. Bylo prokázáno, že pH v nádorových buňkách je výrazně kyslejší (pohybuje se v rozmezí 5,8-6,4) v porovnání s nenádorovými buňkami⁽¹²³⁻¹⁵⁴⁾. Rovněž bylo pozorováno, že MDR buňky mají zásaditější pH oproti nádorovým buňkám vnímavým na cytotoxické látky⁽⁹¹⁾. Navíc, u senzitivních buněk byl pozorován posun jejich intracelulárního pH do zásadité oblasti poté, co byly transfekovány P-glykoproteinem⁽¹⁷⁶⁾. Tento posun byl sám o sobě (bez přítomnosti kteréhokoliv z proteinů asociovaných s MDR) dostačující ke snížení akumulace i léčiva v buňce pozorované při MDR⁽¹⁵⁴⁾. U látek okyselujících cytoplazmu (např. amilorid) byla popsána schopnost zvrátit MDR⁽²⁰⁾.

Fyziologickými změnami MDR buněk však nebylo možno spolehlivě objasnit všechny případy MDR a výzkum se zaměřil na analýzu proteinů buněk s MDR fenotypem. Bylo posáno několik proteinů, lokalizovaných ať už přímo v buněčných membránách, cytoplazmě či v jádru buňky, jejichž nadměrná exprese je asociována s MDR. Prvním objeveným, nejznámějším a dnes zřejmě klinicky nejvýznamnějším je P-glykoprotein (Pgp, P170). Později byly na modelech rezistentních buněčných linií selektovány na rezistenci vůči různým cytostatikům identifikovány i další proteiny, jejichž exprese či aktivita je proti vnímavým buňkám změněna. Mezi tyto proteiny patří např. multidrug resistance protein (MRP), lung resistance protein (LRP), p izoenzym glutathion-S-transferazy (GST-π), thymidylát syntetáza, alkyltransferáza (DNA reparační enzym), metalothionein, jaderný enzym topoizomeraza II (Topo II)⁽¹⁵⁵⁾ a další.

V poslední době se množí údaje, že kromě uvedených mechanismů se na vzniku nádorové rezistence podílí také skupina genů/proteinů kontrolujících buněčný cyklus, DNA reparaci a apoptózu. Nejznámějším z nich je protein p53. Tento onkosupresor je transkripčním faktorem jehož exprese je aktivována poškozením DNA. Aktivace p53 kaskády vede následně k transkripci p53 dependentních genů např: p21^{WAF1}, bax, GADD45. Je obecně známou skutečností, že mutace v genu p53 zhoršují prognózu nemocného, zvyšují jeho rezistenci k chemoterapii a radiačnímu záření. Předpokládá se, že v takto mutovaných buňkách vystavěných genotoxickým vlivům nedochází k expresi pro-apoptotického genu bax a současně buňky ztrácejí kontrolu nad G1/S přechodem buněčného cyklu v důsledku nízké exprese proteinu p21^{WAF1}^(63,168). Rovněž bylo zjištěno, že buněčné linie s homozygotní delecí proteinu p21^{WAF1} jsou hypersenzitivní k chemoterapeutikům *in vitro*⁽¹⁸⁰⁾. Z těchto literárních údajů vyplývá, že přinejmenším dva proteiny ze skupiny regulátorů buněčného cyklu, t.j. p53 a p21^{WAF1}, jsou přímo asociovány se vznikem nádorové rezistence. Doposud však existuje málo informací o vzájemném propojení těchto dvou proteinů i o způsobu, kterým se podílejí na vzniku MDR.

V další části této práce se budeme věnovat pouze čtyřem nejdůležitějším proteinům, jejichž nadměrná exprese je asociována s MDR a které se jeví z klinického hlediska jako významné - Pgp, MRP, LRP a GST-7L

IV. Rodina ABC-transportních proteinů

Toxické sloučeniny jsou součástí životního prostředí organismů. Z evolučního hlediska bylo důležité aby si organismy vyvinuly strategie umožňující přežití v takovýchto podmínkách. Součástí těchto mechanismů jsou proteiny plazmatické membrány umožňující transport toxinů z buňky. Tyto membránové transportní proteiny nacházíme na všech úrovních organismů od bakterií po člověka⁽¹⁷⁹⁾ a obecně se podílí na transportu širokého spektra látek (iontů, aminokyselin, cukrů, peptidů a proteinů) přes buněčnou membránu. Mezi takové transportní proteiny se širokou substrátovou specifiitou a obsahující ATP-vazebnou kazetu patří tzv. ABC-transportní proteiny (z angl. ATP-binding cassette). ABC-transportní proteiny tvoří superrodinu, která v současné době zahrnuje přes 50 bílkovin vykazujících rozsáhlou sekvenční homologii funkčních domén. Jejich dalším společným znakem je využívání energie fosfátových vazeb k exportu toxických látek z buňky⁽⁷⁰⁾. Z hlediska seskupení aminokyselinových zbytků v ATP-vazebné kazetě, topologie proteinů a substrátové specifity se nadrodina ABC-transportních proteinů dělí do dvou podskupin: Pgp podskupina a MRP podskupina.

Bílkoviny patřící do Pgp podskupiny mají klíčovou úlohu v rezistenci mikroorganismů na neutrálně či pozitivně nabitě amfifilní sloučeniny. Nacházíme je v lidských patogenech např. *Plasmodium falciparum* (pMDR1 gen jehož mutace odpovídá za rezistenci vůči antimalarické léčbě), *Entamoeba histolytica* (enhPgp), *Leishmania donovani* (IdMDR), *Saccharomyces cerevisiae* (STE6 exportující sexuální feromon)⁽¹⁴³⁾. Pgp podskupina ABC-transportních proteinů byla dále identifikována u bakterií, např. *Streptomyces* (DrrAB), *Lactococcus lactis* (LmrA), *Escherichia coli* (a-hemolysin transportní protein HlyB)^(31,36); u hmyzu - *Drosophila melanogaster* (mdr49, mdr65, mdr50)⁽¹⁸⁶⁾; u vyšších rostlin - *Arabidopsis thaliana* (atpgpl, který byl nalezen ve všech zkoumaných částech rostliny včetně listů, kořenů, květních pupenů a květu)⁽⁴⁷⁾; u nižších živočichů - *Caenorhabditis elegans* (Celpgp). Z lidských genů/proteinů sem kromě Pgp⁽⁶¹⁾ patří i gen pro cystickou fibrózu - CFTR (cystic fibrosis transmembrane conductor regulator)⁽¹⁴⁰⁾. Rovněž transportní proteiny TAP1 a TAP2 asociované se zpracováním antigenů molekulami hlavního histokompatibilního komplexu I. třídy a jeho prezentací jsou součástí Pgp podskupiny nadřodiny ABC transportních proteinů⁽¹³⁰⁾.

Bílkoviny MRP podskupiny umožňují mikroorganismům exportovat různé organické anionty, např. deriváty karboxyfluoresceinu, bis(glutathion) kadmium a jiné glutathion-S konjugáty. K nejlépe charakterizovaným proteinům z této skupiny patří Ycf1 (yeast cadmium factor) a Yor1 protein v *S. cerevisiae*, cMRP1 (*Caenorhabditis elegans*), BCECF (*L. lactis*)⁽¹⁷⁹⁾ a lidský MRP⁽³⁵⁾.

V poslední době k nim přibýly i Multispecific Organic Anion Transporter (MOAT), Epithelial Basolateral Conductance Regulator (EBCR) - pravděpodobně jde o králičí ortolog proteinu MOAT, sulphonylurea receptor (SUR protein) korigující průchodnost K⁺ iontového kanálu a uvolňování inzulínu⁽²⁴⁶⁾.

Kvasinkový STE6 a savčí Pgp vykazují 57% homologii v uspořádání aminokyselin, rovněž mají podobnou sekundární strukturu a membránovou topologii⁽¹¹⁷⁾. Tato strukturální podobnost mezi různými typy ABC-transportních proteinů může vyústit v podobnost funkční. Bylo zjištěno, že myši Pgp homolog mdr3 či plasmodiální pMDR může zastoupit funkci STE6 v kvasinkách s mutantním a tudíž nefunkčním proteinem⁽¹³⁷⁾. Funkční substituce ABC-transportních proteinů není vázána pouze na eukaryotické transportní proteiny. Bylo prokázáno, že bakteriální LmrA je schopný funkčně zcela zastoupit lidský Pgp v lidské línii plicních fibroblastů. Navíc byl LmrA lokalizován do plazmatické membrány stejně jako Pgp⁽¹⁷⁹⁾. Na základě této pozoruhodné funkční shody různých typů ABC-přenašečů byla vyslovena domněnka o velmi podobném mechanismu působení těchto proteinů v prokaryotických i eukaryotických buňkách.

Bylo vysloveno několik hypotéz o mechanismech, kterými probíhá transport toxických látek přes ABC-transportní proteiny sázející se vysvětlit jejich širokou substrátovou specifiitu. První z nich je tzv. hypotéza konvenčního transportu (conventional transport hypothesis)⁽⁴⁾. Transport substrátu z cytoplazmy buňky probíhá přes vodní poruš s velice příznivým vazebným místem pro substrát. Druhá hypotéza je označována jako „model hydrofobního vakuového čističe“, (vacuum cleaner hypothesis)⁽¹³⁵⁾. Podle ní mají ABC-přenašeče schopnost rozeznat lipofilní sloučeniny díky jejich interkalaci do lipidové dvojvrstvy plazmatické membrány. Z ní jsou následně transponovány mimo buňku aniž dosáhnou cytoplazmy. Třetí model, tzv. „flippase hypothesis“,^(19,71) předpokládá transport toxických sloučenin z vnitřní strany lipidové dvojvrstvy plazmatické membrány na vnější (Obr.1). Detailněji byl studován bakteriální ABC-přenašeč LmrA a LmrP⁽¹⁸⁾. Ve studii bylo použito amfifilní membránové próby TMA - DPH (1-(4-(trimetylaminofenyl)-6-fenylhexa-1,3,5-trien) a ze způsobu jejího prostupu membránou byl učiněn závěr, že oba sledované ABC-přenašeče vylučují TMA - DPH próbu z vnitřní strany lipidové dvojvrstvy. Toto pozorování tedy podpořilo výše uvedený model hydrofobního vakuového čističe.

V. P-glykoprotein (Pgp)

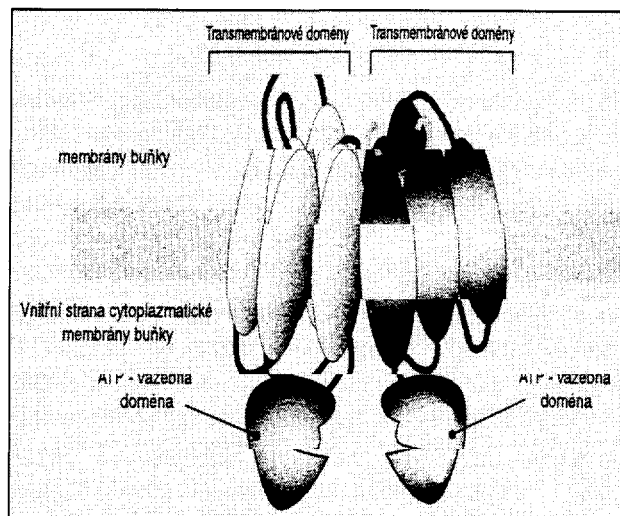
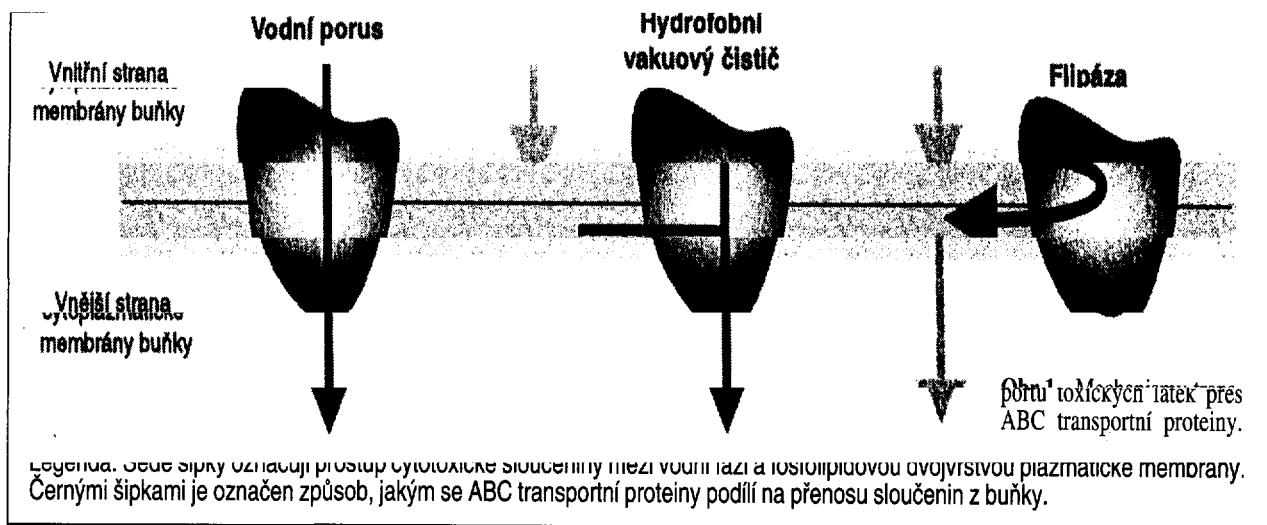
V roce 1976 demonstrovala Torontská skupina⁽⁸⁵⁾ že zkřížená rezistence je způsobena sníženou akumulací léčiva v buňce. Následně bylo pozorováno, že tento jev koreluje s výskytem glykoproteinu plazmatické membrány nazvaného P-glykoprotein, kde P označuje zvýšenou permeabilitu⁽⁸⁶⁾, neboť jeho původně předpokládanou funkcí byla regulace propustnosti buněčné membrány. Molekulová hmotnost P-glykoproteinu je 170 kDa. Zvý-

šená exprese P-glykoproteinu byla u některých MDR linií v souladu s amplifikací genu mdr1 kódujícího Pgp⁽¹³⁹⁾. Molekulu Pgp tvoří 1280 aminokyselin⁽³⁰⁾. Strukturně je Pgp multifunkční polypeptid složený ze dvou homologních polovin z nichž každá má ABC doménu i membránovou doménu. Obě poloviny jsou odděleny vysoce nabitým „spojovačem“, - oblastí, která je na několika místech fosforylována protein kinázou C *in vitro* i *in vivo*⁽⁷²⁾. Všechny transmembránové domény Pgp molekuly vytváří obrovský vodní porus mající v průměru 5 nm. Je tedy zřejmé, že obě homologní poloviny molekuly musí spolupracovat, aby vytvořily jednu funkční transportní bílkovinu (Obr.2, Obr.3). ABC domény jsou lokalizovány do cytoplazmy buňky, tedy na vnitřní straně membrány a navzájem vykazují 30-40% aminokyselinovou homologii. Zhruba stejná homologie je nacházena i v ABC doménách dalších přenašečů patřících do nadřodiny ABC transportních proteinů. Studie s fotoaktivním analogem ATP prokázaly, že P-glykoprotein váže ATP na malý tryptický fragmen své ATP vazebné domény⁽¹⁵¹⁾. Mutace indukované v tomto umístění měly za následek ztrátu funkce P-glykoproteinu. Rovněž delece provedené na C- či N-konci molekuly Pgp měly za následek ztrátu jeho membránové funkce. Obě koncové oblasti mají tedy klíčový význam pro správnou funkci molekuly⁽³⁹⁾. Membránová doména se skládá ze 6 transmembránových segmentů (α-helixů). Ty formují vazebná místa pro transponovaný substrát a alosterické regulátory. Nicméně není ještě přesně známo, které aminokyselinové zbytky se přímo podílí na interakci se substrátem. Fosforylované „spojovač“, není potřebný pro vlastní aktivní transport⁽⁶²⁾, spíše upravuje schopnost Pgp regulovat heterologní iontové kanály. Molekula P-glykoproteinu je v rámci posttranslačních úprav glykosylována a fosforylována. Jediné glykosylační místo je lokalizováno extracelulárně na N-polovině Pgp molekuly (Obr.3)⁽¹⁴⁾.

V závislosti na glykosylaci může molekulová hmotnost Pgp kolísat v rozmezí 135-180 kDa⁽⁴⁹⁾. Neproběhnutí glykosylace však nemá žádný efekt na míru lékové rezistence buněčných linií⁽¹⁰⁾. Kromě glykosylace je Pgp v plazmatické membráně rovněž fosforylován a defosforylován a to na několika místech včetně Ser a Thr zbytků⁽⁶⁶⁾. Na rozdíl od glykosylace však fosforylace moduluje aktivitu Pgp a tedy i míru lékové rezistence. Bylo demonstrováno⁽⁶⁶⁾, že chemosenzitivizační látky zvyšují míru fosforylace Pgp u MDR buněk. Na fosforylaci P-glykoproteinu se podílí protein kináza C a cAMP - dependentní protein kináza A^(1,18,16,1). Defosforylace probíhá za přispění Ser/Thr fosfatáz PPI a 2A⁽²⁵⁾ (Horio et al⁽⁷⁵⁾) studovali rychlost transportu přes plazmatickou membránu. U dobře propustné membrány byla maximální rychlost transportu 5 pmol přenesené látky na 1mg váhy všech membránových proteinů za 10 minut. Autoři vyhodnotili podíl Pgp v celkovém zastoupení všech membránových proteinů jako 1%⁽⁵⁾ což by znamenalo, že molekula Pgp transponuje jednu molekulu substrátu za 1,9 hodiny. MDR buňky kultivované s 6mM koncentrací kolchicinu (koncentrace jen o málo vyšší, než jaká se používá v léčebných protokolech) však vykazovaly podstatně nižší rychlost transportu - molekula Pgp přenesla molekulu substrátu za 10 hodin. Tato rychlost je o mnoho řádů pomalejší v porovnání s dalšími transportními proteiny a rovněž neodpovídá relativně rychlému hromadění léčiva v buňce.

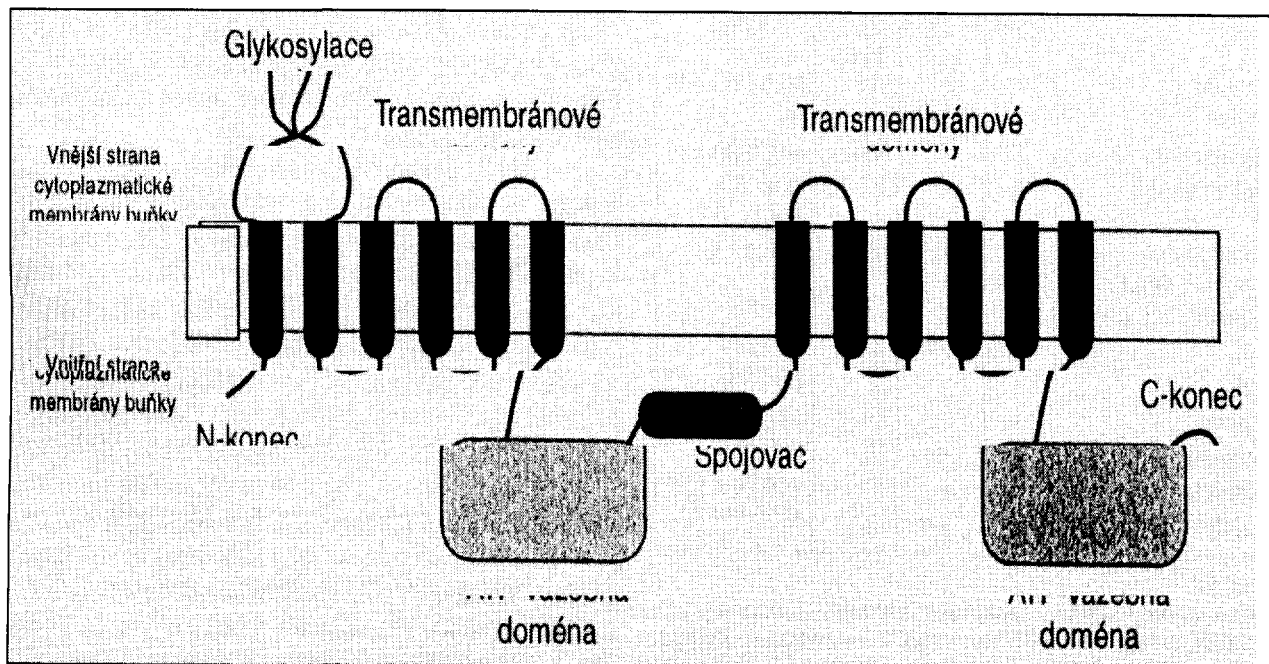
Dle struktury P-glykoproteinu a rovněž s přihlédnutím k faktu, že do skupiny Pgp homologních proteinů patří CFTR protein, jehož nadměrná exprese koreluje se zvýšeným počtem iontových kanálů⁽¹⁷⁴⁾, lze usuzovat, že Pgp má v buňce dvojí funkci. Jednak coby ATP-dependentní membránová pumpa odstraňuje toxické látky z buňky a rovněž se podílí na regulaci iontových kanálů. V epitelu tenkého střeva byla pozorována záměna exprese CFTR za Pgp jak buňky migrovaly přes hranici krypty-kilky⁽¹⁷²⁾. Tentýž jev byl pozorován i v epitelu dělohy na počátku těhotenství. Zjištění, že nadměrná exprese Pgp je průvodním jevem zvýšené aktivity chloridového kanálu⁽¹⁾ nebylo překvapující. Obě funkce P-glykoproteinu v buňce však probíhají nezávisle na sobě, jak bylo prokázáno v mutagenních studiích⁽⁶⁾. Na buněčné línii P388 bylo zjištěno, že Pgp exprese rovněž koreluje se zvýšenou mírou exocytózy lysozomálních enzymů⁽¹³⁵⁾.

V rámci evolučních studií byla identifikována řada izoforem Pgp, které jsou kódovány rodinou příbuzných genů. Tyto genové rodiny se označují jako pgp geny u křečků a krys, mdr geny u lidí a myši⁽¹⁵⁷⁾. U člověka byly identifikovány 2 izoformy Pgp (mdr1 a mdr3), které vykazují 80% homologii na úrovni aminokyse-



Obr2. - Model sekundární struktury ABC transportního proteinu patřícího do Pgp podskupiny.

lin^(42,65). Oba lidské *mdr1* a *mdr3* byly lokalizovány na dlouhém raménku 7. chromozómu (oblast *a36*)⁽¹³⁾ a jejich vzájemná vzdálenost je 1,4 kb (Obr.4). Funkce obou genů *mdr1* a *mdr3* v navození kompletního MDR fenotypu po transfekci buněčné linie expresním vektorem se zaklonovanou *mdr1* cDNA⁽⁶⁵⁾. Nicméně kázaly účast tohoto genu v navození lékové rezistence⁽¹⁴⁹⁾. Rovněž myší gen *mdr2* není schopen navodit lékovou rezistenci. Lid-jeden z nich není nadměrně exprimován v nepřítomnosti *mdr1/mdr1a*, *mdr1b* genů⁽¹³⁶⁾, mezi oběma geny existuje 95% podobné, že oba geny budou mít ve svých mateřských orga-nismech podobnou funkci. Myší *mdr2* proteiny se přirozeně vysky-úspěšně provedené nulové mutaci *mdr2* lokusu⁽¹⁵⁹⁾ byly na mutantních myších pozorovány patologické změny jater zapříči-řvali, že sledovaný protein se může podílet na transportu fosfoli-pidů. Pozorování bylo podpořeno zjištěním, že lidský *mdr3* protein je specifický přenašeč fosfolipidů⁽¹⁷⁷⁾. K analýze přirozené exprese *mdr* genů v lidských tkáních bylo použito *mdr1* cDNA prob nebo Pgp specifických protilátek. Nej-



Obr3 - Sekundární struktura glykoproteinu.



vyšší hladina exprese mdrl P-glykoproteinu byla pozorována v nadledvinkách, v lumen ledvin, jater a střeva⁽⁵³⁾. V menší míře lat⁽³⁸⁾, v placentárních trofoblastech⁽¹⁶³⁾ a rovněž na některých CD34+ hemopoetických kmenových buňkách. Nejvyšší hladina reč⁽¹⁷⁶⁾. PCR analýza však odhalila nízkou expresi mdrl3 produktu rovněž v ledvinách, slezině, kostní dřeni a nadledvinkách⁽³¹⁾.

Jeden z prvních důkazů klinické MDR demonstrovaný na pr-
cím nádorem prsu či ovária poskytl opět Ling, který pozoroval
sníženou schopnost těchto buněk akumulovat cytotoxická léči-
v⁽⁹⁾. Později byly tyto údaje potvrzeny až v letech 1985 v cyto-
ních nádorových buňkách odebraných od pacientů, kteří klinicky
projevovali všechny znaky MDR⁽¹²⁾. Od té doby začal vzrůstat
zájem lékařů o nádory, u kterých byla prokázána rezistence. Dan-

Z důvodu stanovení potenciální úlohy mdrl v predikci odpovědi na cytostatickou léčbu byla podrobně studována jeho exprese v klinické lékové rezistenci vůči cytotoxickým látkám, transportovaným Pgp, a zvýšenou expresí mdrl mRNA nebo přímo bu Pgp netransportovanými léčivý či pro použití chemosenzitorů. K detekci se používají mdrl cDNA próby nebo anti-Pgp protilátky⁽⁵⁴⁾. První velká studie, která prokázala, že nadměrná exprese Pgp je častěji nalézána v již léčených nádorech. Výjimkou z tohoto pravidla je zvýšená exprese mdrl v neléčených nádorech odvozených z tkání s jeho přirozenou expresí, jako jsou např. kolorektální karcinom, nádory ledvin, pankreatu, hepatomy či tumory z kůže a ucha, které nemají žádný přírůstek Pgp. Nádory, u nichž není zjistitelnou hladinu mdrl mRNA (karcinomy prsu, nemalobuněčné nádory plic, karcinom žaludku, karcinom prostaty, chronická mve-

Tab. 3: Lidske nádory exprimující P-glykoprotein

Nádor	Přidání	Poslech	Metoda	Léčba
Ovariální	-	+	WB	MLP, CYC, DOX,
Prsní	+	ND	WB	-
Trusového střeva	+	+	NB	5FU, MMC
Čekání	-	-	WB	ACY-D, DTIC, CYC
Akutní nelymfatické	-	+	Ic	DNR. VP-16
Sekundární akutní nelymfatické leukémie	+	ND	Ic	DOX, VCR, BUS
CML – blastická krize	-	+	If, NB	BUS, VCR, DOX
NHL	-	+	Ic	Dox, VCR
Neuroblastom	-	+	NB	VCR, DOX
Nadledvin	+	ND	NB	-
				MTX, ARA-C
Ledvin	+	ND	NB	-

+ pozitívni, – negatívni, ND nedetekováno, WB western blot, NB nothern blot, Ic imunocytochemie, If imunofluorescence, ACT-D aktinomycin D, platina, DNR daunorubicin, DOX adriamycin, DTIC dakarbazin, 5FU 5-fluorouracil, MLP melfalan, MMC mitomycin C

vídavost na léčbu u Pgp pozitivních pacientů je pozorována v důsledku specifického uplatnění Pgp v navození klinické rezistence a následným léčebným selháním, nebo zda je Pgp pouze indikátor více maligního fenotypu a tedy špatným prognostickým znakem. Rada studií zahájená na začátku 90. let se snaží prozkoumat význam Pgp v mnohočetné lékové rezistenci měřením jeho množství při diagnóze a v relapsu po léčbě cytostatiky, které se uplatňují v mechanismech MDR. Studie se prováděly na mnohočetném myelomu^(50,145) či na ovariálních a malobuněčných plicních karcinomech⁽⁷⁴⁾. Ve studiích na ovariálních a malobuněčných plicních karcinomech byla nalezena vysoce signifikantní korelace mezi nepřítomností Pgp mRNA a odpovědí nemocného na chemoterapii. Na druhé straně byla pozorována klinická rezistence vůči látkám, které nejsou transponovány Pgp, což svědčí pro koexistenci několika různých mechanismů odpovídajících za lékovou rezistenci v rámci heterogenní nádorové populace. Nejlepším modelem pro studium klinického významu Pgp, zejména jeho významu v navození MDR jsou hematologické malignity a to vzhledem k možnosti snadných a opakovaných odběrů. Zvýšená exprese mdrl byla prokázána u 19% nemocných trpících ALL, AML⁽¹⁴¹⁾, nebo CML v blastické krizi v iniciační fázi nemoci a u 50% nemocných v relapsu. Přítomnost Pgp byla prokazatelně špatným prognostickým faktorem. Rovněž byla zjištěna statisticky významně nižší pravděpodobnost dosažení kompletní remise v přítomnosti zvýšené exprese mdrl⁽¹¹³⁾. Za zmínku stojí také studie provedená na leukemických klonách izolovaných od 22 pacientů s AML, ve které byla analyzována chemosenzitivita nádorových buněk *in vitro* testem a současně exprese mdrl. Byla pozorována asociace mezi rezistencí na daunorubicin a pozitivitou buněk na mdrl, ačkoliv 40% vzorků exprimujících mdrl bylo *in vitro* senzitivních na daunorubicin. Pirker et al⁽¹³¹⁾ vyšetřovali přítomnost mdrl mRNA s použitím slot blot hybridizace u 63 pacientů s čerstvě diagnostikovanou AML. Zjistili, že kompletní remise s použitím antracyklin obsahujících léčebných protokolů bylo dosaženo u 53% pacientů pozitivních na mdrl a u 89% pacientů, jejichž myeloblasty byly negativní ($P < 0,008$). Bezpriznakové období a délka celkového přežití byly rovněž signifikantně delší u mdrl negativní skupiny. Opakovaně byly pozorovány signifikantní rozdíly v procentech dosažených kompletních remisí mezi skupinami nemocných s nebo bez zvýšené exprese Pgp. S poněkud menším zájmem byla studována přítomnost mdrl

mRNA v lymfoblastech u ALL. V několika studiích se popisuje nižší prevalence Pgp pozitivních lymfoblastů. Studie zahrnující 59 pacientů s *de novo* ALL (36 dětí a 23 dospělých) potvrdila expresi Pgp jako negativní prognostický faktorů. Rovněž byly nalezeny signifikantní rozdíly mezi skupinou Pgp pozitivních a Pgp negativních dospělých pacientů v navození remise (56% proti 93%), v trvání bezpriznakového období a v tendenci k navození druhé kompletní remise (15% proti 38%) u nemocných exprimujících Pgp ve více než 1% leukemických buněk (38%).

Výše uvedené studie potvrdily prognostický význam Pgp exprese u nemocných s leukémií avšak neposkytly důkaz o funkčním významu Pgp v primární nebo navozené klinické lékové rezistenci. Je důležité si uvědomit, že renální, adrenální a kolorektální karcinomy jsou klinicky rezistentní také vůči látkám, které nejsou transponovány Pgp (bleomycin, antimetabolity, alkylující látky). V těchto případech primární rezistence se zřejmě uplatňují jiné mechanismy vedoucí k MDR. Na druhé straně, Pgp exprese bývá zvýšena také u pacientů se sekundární (navozenou) MDR a řada z nich je současně rezistentní vůči cytostatikům, která nejsou přenášena Pgp.

Lze konstatovat, že výše zmíněné studie potvrzují přítomnost Pgp jak v normálních, tak v nádorově transformovaných lidských tkáních a ukazují, že s použitím molekulárně biologických postupů může být tato exprese v klinických vzorcích úspěšně monitorována. Při současném stavu našich vědomostí o významu Pgp v MDR lze konstatovat, že jeho exprese signalizuje pouhou přítomnost řady mechanismů lékové rezistence. K potvrzení asociace mezi primární nebo sekundární lékovou rezistencí a přítomností Pgp bude nezbytné provést analýzu vazby mezi množstvím Pgp v nádoru a odpovědí nemocného na specifická cytostatika v prospektivní studii s průběžným stanovováním kvantity Pgp u jednotlivých pacientů před léčbou a po léčbě.

PODĚKOVÁNÍ

Práce na projektu, lékové rezistence jsou financovány granty IGAMZ4132-5, MŠMT VZJ14/98151100001, VS 96154 a Nadací pro výzkum rakoviny v Olomouci.

Literatura:

Souhrnný seznam literatury použité v obou částech přehledového článku je uveden na konci části II zabývající se atypickou MDR.

MECHANISMY MNOHOČETNÉ LÉKOVÉ REZISTENCE A JEJICH VÝZNAM PRO KLINICKOU PRAXI

II. ATYPICKÁ MDR

MECHANISMS OF MULTIDRUG RESISTANCE AND THEIR CLINICAL IMPLICATIONS

II. ATYPICAL MDR

NOSKOVÁ V.¹, *HAJDÚCH M.¹, MIHÁL V.¹, CWIERTKA K.²

¹LABORÁTOR EXPERIMENTÁLNÍ MEDICÍNY PŘI DĚTSKÉ KLINICE LF UP A FN OLMOUC

²ONKOLOGICKÁ KLINIKA LF UP A FN OLMOUC

Souhrn: Článek se podrobně zabývá třemi proteiny, které způsobují atypickou lékovou rezistenci (atMDR) v nádorových buňkách. Multidrug resistance protein (MRP) je ATP-dependentní membránová pumpa patříci stejně jako P-glykoprotein (Pgp) do rodiny ABC-transportních proteinů. Lung resistance protein (LRP) je hlavní komponenta ribonukleoproteinových částic vaults, které jsou schopné transponovat toxické látky z jádra neoplastických buněk do lyzozómů. Zvýšená aktivita detoxifikačního enzymu glutathion-S-transferázy (GST-p) a následně zvýšená koncentrace redukovaného glutathionu (GSH) chrání buňku především před působením volných radikálů. Jsou uvedeny základní charakteristiky každého z výše jmenovaných proteinů (jejich struktura, funkce, přirozený výskyt v lidských tkáních) a studie zabývající se významností exprese každého z nich pro klinickou MDR.

Klíčová slova: mnohočetná léková rezistence, atypická mnohočetná léková rezistence, multidrug resistance protein, MRP, lung resistance protein, LRP, glutathion-S-transferáza (GST-p), glutathion, GSH, ABC transportní proteiny, chemoterapie

Summary: This paper deals with three proteins known to associate with atypical multidrug resistance (atMDR) of tumor cells. Multidrug resistance protein (MRP) works as an ATP-dependent membrane „pump” and belongs, together with P-glycoprotein (Pgp), to a superfamily of ABC-transport proteins. Lung resistance protein (LRP) is a major component of organelles called „vaults”. Vaults are able to transport toxic agents from the nuclei of neoplastic cells to lysosomes. Additionally increased activity of glutathion-S-transferase enzyme (GST-p) followed by increased concentration of reduced form of glutathion (GSH) protects tumor cells from oxidative damage. Basic characteristics of MRP, LRP and GST-p are given including their structures, functions and expressions in normal/malignant human tissues. Studies focused on the significance of mentioned proteins for clinical MDR are reported as well.

Keywords: multidrug resistance, atypical multidrug resistance, multidrug resistance protein, lung resistance protein, glutathion-S-transferase, glutathion, ABC-transport proteins, chemotherapy

Předkládaná část přehledového článku o mnohočetné lékové rezistenci je věnována atypické MDR, zejména proteinům MRP, LRP a GST- π . Ke každému mechanismu je podán výklad jeho funkce a příklady využití v klinické praxi.

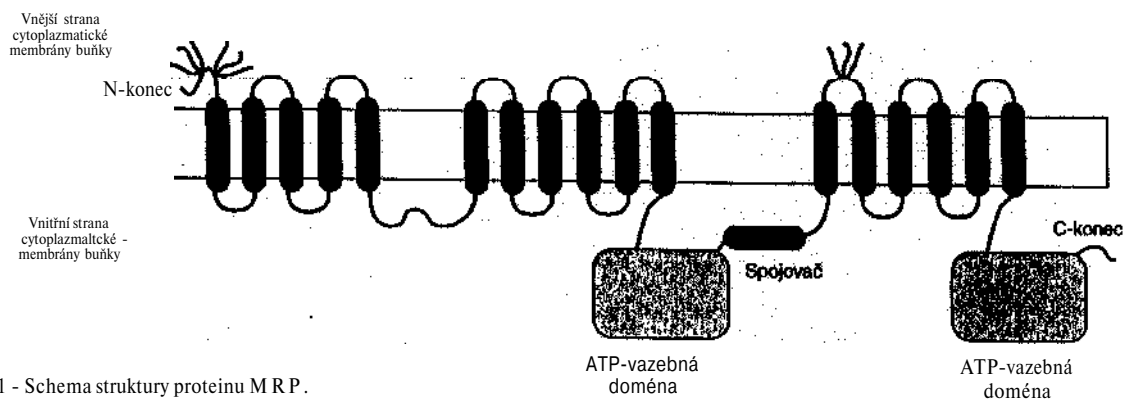
I.1) Multidrug resistance protein (MRP)

V roce 1992 Cole et al.⁽³⁵⁾ objevili na buněčné linii lidského malobuněčného karcinomu plic H69 rezistentní na adriamycin gen kódující další z ABC transportních bílkovin a pojmenovali ho MRP (multidrug resistance associated protein). Po detailnějším prozkoumání transfekovaných buněčných linií bylo zjištěno, že: 1) snížení exprese MRP je doprovázeno obnovením chemosensitivity, 2) transfekce buněčných linií MRP cDNA vedoucí k nadměrné expresi MRP prokazatelně zvyšuje rezistenci transfektantů vůči antracyklinům, vinkristinu a etoposidu⁽⁶⁴⁾, 3) MRP je exprimován, stejně jako Pgp, na cytoplazmatické membráně⁽¹⁸⁷⁾ a na membránách endoplazmatického retikula, 4) v buňce plní funkci jednosměrné ATP-dependentní membránové pumpy pro glutathion-S-konjugáty⁽¹²²⁾.

Bylo identifikováno 6 multidrug resistance proteinů (MRP 1-6), z nichž pouze protein MRP1 má význam pro navození lékové rezistence⁽⁶⁾. MRP protein se skládá z 1531 aminokyselin a jeho molekulová hmotnost je 190 kDa⁽¹⁰⁶⁾. Hybridizací *in situ* bylo zjištěno, že MRP gen je lokalizován na 16. chromozómu v oblas-

ti p13.1⁽³⁵⁾. V MDR rezistentních buněčných liniích nadměrně exprimujících MRP bývá gen rovněž amplifikován⁽⁴⁸⁾.

Zcela překvapivě je MRP spíše vzdálený příbuzný genu mdrl a je více podobný CFTR genu. Největší sekvenční homologie mezi MRP a Pgp byla nalezena v oblasti ATP vazebných domén, které jsou také v rámci celé nadrodiny nejvíce evolučně konzervovány. Avšak terciární struktura obou proteinů je rozdílná. Topologický model MRP znázorňuje obr. 1. Na N-konci molekuly je membránová doména složená z 5 transmembránových segmentů (a-helixů), následují 2 homologní části každá složená z 6 transmembránových segmentů (a-helixů) a ABC domény^(106,173). Má se za to, že obě homologní části proteinu se v průběhu evoluce vyvinuly ze společného genového předka kódujícího ABC-transportní proteiny. V případě MRP podskupiny zřůzňoval tento gen s jiným genem/geny kódujícím jiný membránový protein, čímž se k oběma homologním polovinám připojilo 5 transmembránových domén na N-konci molekuly. N-konec MRP proteinu je umístěn extracelulárně, což je velmi atypická topologie pro nadrodinu ABC transportních proteinů. Avšak současná data naznačují, že právě extracelulárně umístěný N-konec může být charakteristickým znakem MRP podskupiny⁽⁷³⁾. Obě poloviny molekuly MRP jsou glykosylovány. Čerstvě nasyn- tetizovanému 170 kDa velkému MRP polypeptidu trvá zhruba 90 minut než se glykosyluje na svoji 190 kDa formu. Glykosylovány



Obr. 1 - Schema struktury proteinu MRP.

protein má poločas rozpadu 20 hodin, což je pro membránové proteiny typické⁽⁶⁸⁾. Ma et al.⁽¹¹¹⁾ rovněž prokázali *in vivo* fosforylacii MRP několika různými kinázami především na setinových zbytcích. Dalším rozdílem, kterým se MRP liší od Pgp, je velmi nízká transportní specifická pro paklitaxel a kolchicin přesto, že obě zmíněná Protinádorová léčiva náleží mezi nejlepší „substráty“ pro Pgp⁽³⁶⁾. Na druhé straně MRP způsobuje rovněž sníženou akumulaci léčiva v buňce a jeho zvýšený export mimo buňku⁽¹¹⁶⁾. MRP transportuje široké spektrum hydrofobních, záporně nabitých substrátů, ačkoliv jeho afinita k cysteinu 1 leukotrienu (LTC₄) je ze všech zkoušených substrátů nejvyšší⁽¹⁰³⁾. LTC₄ je syntetizován z leukotrienu A₄ poté, co je leukotrien A₄ konjugován s GSH. Samotný leukotrien C₄ se podílí na kontrole kontrakce hladkých svalů a na vaskulární permeabilitě. Fyziologická funkce MRP jako přenašeče leukotrienu C₄ v leukocytech syntetizujících leukotrieny dává vznik dohadu, že inhibitory MRP by mohly hrát úlohu v regulaci zánětlivých procesů⁽¹⁸⁴⁾. LTC₄ je tedy konjugát glutathionu. Bylo prokázáno, že MRP může transportovat široké spektrum látek patřících do skupiny glutathione konjugátů, od samotné oxidované formy glutathionu přes kyselinu ethakrynovou, záporně nabitě sulfáty, glukuronidy a některé žlučové soli až po aktivovaný aflatoxin B₁⁽¹⁰⁷⁾. Ukazuje se, že spektrum substrátů přenášených MRP se velmi shoduje s přenašečem MOAT (či MRP2) nacházejícím se mimo jiné v tkáni intrahepatálních žlučodův⁽¹¹⁵⁾ a v cytoplasmatické membráně žírných buněk⁽¹⁰⁴⁾. Předpokládá se, že MRP je alespoň částečně zodpovědný za MOAT aktivitu v buňkách mimo intrahepatální žlučodovy⁽⁹²⁾.

Důkaz, zda se MRP podílí v buňce i na regulaci iontových kanálů, nebyl ještě podán. Nicméně u H69/ADR buněk exprimujících MRP byla pozorována zvýšená aktivita Cl⁻ a K⁺ kanálů⁽⁸³⁾. Navíc, stejně jako Pgp, obsahuje struktura MRP „spojovač“, který je fosforylován několika Ser/Thr proteinkinázami (např. proteinkináza C). Uvedený fakt rovněž podporuje domněnku o možné regulační roli tohoto proteinu v iontovém transportu⁽¹¹¹⁾.

K inhibici rezistence asociované s MRP bylo použito stejných chemosenzitorů jako pro Pgp (verapamil, trifluoperazine, PSC 833), avšak s minimální efektivitou⁽⁸⁾. Schopnost buněk exprimujících MRP transportovat LTC₄ vedlo k návrhu, že sloučeniny ovlivňující množství redukováného glutathionu v buňce (GSH) by mohly modulovat MRP asociovanou rezistenci. Skutečně se ukázalo, že při fyziologické koncentraci GSH v buňce se zvyšuje schopnost vinca alkaloidů inhibovat transport LTC₄ do buněk nadměrně exprimujících MRP⁽¹⁰³⁾. U MDR buněčných linií nadměrně exprimujících MRP vedlo snížení GSH ke zvýšení vnímavosti na některá léčiva včetně vinkristinu, VP-16 a doxorubicinu⁽¹¹²⁾. Buthionin sulfoximid (BSO) je irreversibilním inhibitorem γ-glutamyl-cystein syntetázy (γ-GCS), což je limitující enzym biosyntetické dráhy GSH. Nicméně studie zabývající se touto problematikou došly k rozporuplným závěrům^(34,180). Teprve Kuo et al.⁽³⁷⁾ objasnili asociaci mezi GSH syntézou a MRP expresí. Pozoroval totiž současně nadměrnou expresi proteinů MRP a γ-GCS ve vybraných vzorcích normální tkáně, rezistentních nádorových buněk i buněk, které ještě nepřišly do styku s protinádorovými léčivy. Autoři dokázali, že zvýšená aktivita enzymu γ-GCS je tedy potřebná pro syntézu dostatečného množství GSH, a tedy pro transport běžící přes MRP molekulu.

MRP bylo detekováno v tkáních i buněk pomocí monoklonálních protilátek a cDNA prob. Přirozený výskyt MRP byl pozorován v epitelálních buňkách bronchů, plic, trávicího traktu, močového měchýře, kůže nadledvinek, varlat, v tkáni kosterního a srdečního svalu. Rovněž makrofágy, stromální buňky různých orgánů a hemopoetické buňky byly pozitivní na MRP⁽³²⁾. Vzhledem k přirozenému výskytu MRP v mnoha epitelích se usuzuje, že stejně jako Pgp hraje MRP důležitou úlohu při ochraně buňky před toxiny zevního prostředí. Expres MRP v nádorech různého histogenetického původu je uvedena v Tab. 1.

Jednoznačná asociace MDR s expresí různých genů byla zatím jednoznačně *in vivo* prokázána pouze u Pgp a MRP v modelech knock-out myši. Tato zvířata s delecí obou alel MRP genu bezpečně přežívaly a autoři uzavírají, že jakékoliv potencionální inhibitory MRP mohou být bezpečně použity v léčbě nádorových onemocnění lidí⁽¹³⁴⁾. Hladiny sérových enzymů, proteinů, elektrolytů a dalších biochemických či hematologických parametrů se v modelu s úplným knockoutem MRP nijak nelišily od kontrol. Myši a lidské MRP proteiny sdílejí 88% sekvenční identitu

Tab.1: Lidské nádory exprimující MRP

Hematologické malignity	MRP exprese	Solidní tumory	MRP exprese
Akutní myeloidní leukémie	+/-	NSCLC	+/-
Akutní lymfoblastická leukémie	+/-	Spinocel. ca plic málo/dobře diferencovaný	-/+
Chronická lymfocytární leukémie	+	Ca štítné žlázy	+
Chronická B-lymfocytární leukémie	+	Neuroblastom	+
Trichocelulární leukémie	+/-	Spinocel ca jícnu	+/-
Chronická myelocytární leukémie	-	Sarkomy měkkých tkání	-
Mnohočetný myelom	-	Ca prsu, ledvin, ovaria, střeva	-
Non-Hodgkinský lymfom	-	Melanom, ca prostaty, moč. měchýře, varlat	-

a u obou byla prokázána indukce MDR fenotypu po transfekci jejich cDNA do přirozeně senzitivních buněk⁽¹⁶²⁾. V MRP knock-out buňkách (mrp^{-/-}) byla zjištěna hypersenzitivita kmenových embryonálních buněk *in vitro* na množství přírodních toxinů včetně epipodofylotoxinů, vinkristinu, doxorubicinu a daunorubicinu. Knockoutované myši byly *in vivo* 2krát více vnímavější na vepesid⁽¹⁰⁹⁾. Delece jedné alely (mrp^{-/-}) měla za následek kvantitativní zvýšení vnímavosti oproti mrp^{+/-} buňkám⁽¹⁰⁸⁾. V erytrocytech myši s knockoutem v MRP genu byla pozorována ztráta funkce vysoko afinitní S-glutathionové pumpy. Rovněž mastocyty těchto myši vykazovaly částečný defekt v sekreci leukotrienu C₄⁽¹⁸⁴⁾. Autoři se na tomto myším modelu rovněž pokusili o objasnění vztahu mezi MRP a GSH. V embryonálních kmenových buňkách mrp^{-/-} snížili hladinu GSH na 10% fyziologické koncentrace. Buňky kultivovali v médiu s radioaktivně značeným vepesidem. Zjistili, že intracelulární koncentrace vepesidu v těchto buňkách se zdvojnásobila. Zatímco v embryonálních kmenových buňkách mrp^{-/-} nemělo snížení hladiny GSH žádný vliv na intracelulární koncentraci vepesidu⁽¹³³⁾. V souladu s tímto pozorováním je jiný *in vivo* experiment popisující u MDR rezistentních tumorů nadměrně exprimujících MRP zvýšenou terapeutickou účinností doxorubicinu poté, co byla s pomocí BSO snížena hladina intracelulárního GSH⁽¹⁷⁸⁾. V roce 1997 se Taguchimu et al. (165) podařilo prokázat přímou interakci mezi MRP a GSH dokazující, že MRP je fyziologickým kotransportérem GSH a protinádorových léčiv.

Molekula MRP je tedy ATP-dependentní membránová pumpa exporující z buňky glutathion-S konjugáty v nemodifikované formě i ve formě solí⁽⁴⁾.

2) Výskyt MRP v lidských nádorech

MRP je často exprimován v anaplastických karcinomech štítné žlázy⁽¹⁶⁴⁾, u různých forem akutních a chronických leukémií⁽²⁴⁾. Zajímavou výjimkou jsou některé případy AM L subtypu M4Eo u nichž došlo k inverzi na 16. chromozomu. Tato inverze je považována za dobrý prognostický znak. MRP gen je lokalizován blízko bodu zlomu a v důsledku chromozomální inverze dochází k jeho delecí. V předběžné studii byla tato delece asociována se 4-5krát delším disease free survival obdobím, které následovalo po iniciální terapii⁽⁹⁹⁾.

Zvýšené množství MRP je jednoznačně negativním prognostickým faktorem u dětského neuroblastomu⁽²¹⁾. Tato studie prokázala i signifikantní korelaci mezi MRP expresí v primárním nádoru a amplifikací N-myc onkogenu, nejsilnějšího negativního prognostického faktoru u těchto pacientů⁽¹²⁶⁾.

Už v roce 1995 byly popsány na buněčných liniích případy jež nadměrně exprimovaly jak Pgp tak MRP proteiny^(23,69). Chan et al.⁽¹²⁸⁾ dokumentoval tentýž jev na primárních nádorových buňkách retinoblastomu, které neodpovídaly na chemoterapii. Dokonce exprese jednoho z výše jmenovaných MDR proteinů před zahájením léčby korelovala s neodpovědí na léčbu, zatímco nepřítomnost obou proteinů korelovala s dlouhodobým přežitím.

Snad nejčastěji byla nadměrná exprese MRP studována u malobuněčných karcinomů plic, zvláště u adeno- a spinocelulárních histologických typů⁽¹²⁴⁾. Častěji bývají MRP pozitivní dobře diferencované nádory. Studie prokázaly negativní korelaci mezi nadměrnou expresí MRP a klinickou odpovědí na chemoterapii⁽¹²⁸⁾. U malobuněčných karcinomů plic je však pozitivita MRP podstatně vzácnější⁽⁴⁰⁾.

Přibližně 30% žen s uziňově negativním karcinomem prsu relabuje. Nooter et al.⁽¹²⁵⁾ zjišťovali frekvenci a intenzitu MRP exprese pomocí monoklonální protilátky u 259 vzorků invazivního karcinomu prsu. V tomto souboru bylo 34% vzorků pozitivních na MRP. Po rozdělení pacientů do skupin podle věku, velikosti nádoru, množství estrogenových a progesteronových receptorů či stupně zasažení lymfatických uzlin se objevila asociace MRP se špatnou odpovědí na léčbu především u pacientů s malými nádory, u uziňově negativních pacientek a u žen s pozitivním uziňovým nálezem, kterým byla podána adjuvantní chemoterapie v režimu CMF (cyklofosamid, metotrexát, 5-fluorouracil). Riziko relapsu bylo u pacientů exprimujících MRP statisticky významně vyšší. Rovněž dlouhodobé přežití bylo u MRP exprimujících nemocných kratší. Přítomnost MRP v nádorových buňkách může být tedy nepříznivým znakem u skupiny pacientů s lepší prognózou v rámci TNM klasifikace. Expres MRP se zdá být v případě karcinomu prsu známkou nenormálního chování buňky, agresivnějšího fenotypu a lékové rezistence.

II. 1) Lung resistance-related protein (LRP)

Na začátku 90. let byla MDR asociována zejména s Pgp a MRP. Avšak přibývalo stále více důkazů jak z *in vitro*, tak z klinických studií o tom, že na MDR fenoménu se podílí ještě další mechanismy. Scheper et al.⁽¹⁴⁸⁾ popsali nový protein ze skupiny transportních proteinů uplatňujících se v navození MDR a pojmenovali ho lung resistance protein (LRP), protože byl poprvé identifikován na buněčné linii plicního karcinomu. Tento protein má molekulovou hmotnost 110 kDa. Z výsledků komparativní sekvenční analýzy bylo jasné, že nově objevený LRP má 87,7% identitu s krysím major vault proteinem^(93,147). Nově objevený protein byl tedy identifikován jako lidský major vault protein a tedy jako nejpočetněji zastoupená složka v posledních objevených subcelulárních organelách pojmenovaných „vaults“.

Vaults byly poprvé pozorovány v roce 1986⁽⁸⁷⁾ a následně byly izolovány z mnoha organismů od nižších eukaryot po savce. V souladu s přirozenou distribucí LRP v organismu se vaults vyskytují nejčastěji v epitelálních buňkách, makrofázích... atd. I když je jejich skladba a struktura poměrně komplexní, jsou tyto organely vysoce konzervovány i mezi fylogeneticky nepříbuznými druhy. Jejich funkce je tedy pravděpodobně nezbytná pro všechny eukaryotické buňky⁽⁸⁸⁾.

Vaults jsou ribonukleoproteinové částice skládající se u krys z následujících 3 složek: 1) z major vault proteinu (molekulová hmotnost 104 kDa), který tvoří více než 70% této organely, 2) ze tří typů minor proteinů jejichž molekulová hmotnost je 210,192

a 54 kDa, 3) z malých molekul RNA. Uspořádání jednotlivých složek organel vaults je znázorněno na Obr. 2. Celá organela má molekulovou hmotnost 13 MDa, rozměry 35x65 nm a jde o největší známou ribonukleoproteinovou částici (3krát větší než ribozom). Vaults jsou přítomny v cytoplazmě buňky a buňky jich obsahují řádově tisíce. Na základě strukturálních studií a na základě přítomnosti vaults na jaderné membráně a v jaderných pórech se domníváme, že organely vaults se podílí na nukleocytoplazmatickém transportu širokého spektra substrátů⁽¹⁴²⁾. Zdá se, že tyto organely mohou transponovat toxické látky z jádra neoplastických buněk do lysosomů. U buněk nadměrně exprimujících LRP byla skutečně pozorována snížená schopnost akumulovat daunorubicin v jádře⁽¹⁵⁰⁾. K získání MDR fenotypu je potřebná s největší pravděpodobností celá funkční organela vault⁽¹⁴⁷⁾, což je i důvodem proč buněčné linie transfekované LRP genem nevykazovaly žádnou lékovou rezistenci.

Izquierdo et al.⁽⁷⁹⁾ testovali expresi LRP u 61 nádorových buněčných linií různého histologického původu, které nepodstoupily selekci žádným z protinádorových léčiv. LRP vyšel z této studie jako silný prediktor *in vitro* rezistence (silnější než Pgp a MRP) na léčiva podléhající MDR. Přítomnost LRP ovšem asociovala i s rezistencí na Pgp/MRP netransportovaná léčiva, např. deriváty platiny.

LRP byl s pomocí *in situ* hybridizace lokalizován do krátkého raménka chromozómu 16^(147,158). Ve stejné oblasti jsou lokalizovány i geny pro MRP a proteinkinázu C-b (PKC). Ačkoliv nadměrná exprese LRP jde často ruku v ruce se zvýšenou expresí MRP, jsou oba geny regulovány nezávisle na sobě a nepatří do stejného amplikonu^(78,80). Na druhé straně většina Pgp-pozitivních MDR buněčných linií neexprimuje současně LRP⁽¹⁴⁸⁾. LRP protein je přirozeně exprimován v tkáních vystavených toxickým vlivům (trávicí trakt, keratinocyty, bronchy), v metabolicky aktivních tkáních (kůra nadledvinek), v makrofázích⁽⁸¹⁾. Jeho přirozená distribuce je tedy podobná distribuci Pgp a MRP. Nádory vycházející z tkání přirozeně exprimujících LRP bývají rovněž LRP pozitivní. Z testovaných 27 rozdílných druhů nádorových onemocnění exprimovalo 63% vzorků LRP.

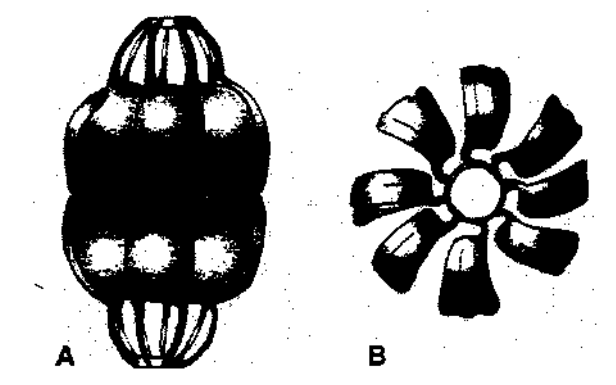
2) Výskyt LRP proteinu v lidských nádorech

Nadměrná exprese LRP byla zjištěna u dospělých pacientů trpících akutní myeloidní leukémií a u pacientek s ovarialním karcinomem. U obou diagnóz předpovídala špatnou odpověď na chemoterapii^(78,103). Na základě silné prognostické hodnoty nadměrné exprese LRP u tak rozdílných diagnóz léčených velmi rozdílnými protokoly můžeme předpokládat, že nadměrná LRP exprese je odrazem rezistence na široké spektrum protinádorových léčiv. Klíčovým zjištěním je, že negativní exprese LRP není v lidských nádorech uniformní, ale odráží vnímavost maligních buněk na léčbu. Relativně chemosenzitivní nádorová onemocnění téměř neexprimují LRP (testikulární nádory, neuroblastom, AML). Nádory tradičně špatně odpovídající na léčbu a refrakterní onemocnění bývají silně LRP pozitivní (karcinomy střeva, ledvin, pankreatu)⁽⁸¹⁾. LRP se tedy zdá být dobrým markerem klinické rezistence na léčbu. Studie zabývající se 30 případy relabující A L L zjistila, že nikoliv exprese Pgp, nýbrž LRP je statisticky signifikantně asociována s *in vitro* rezistencí čerstvých leukemických buněk na daunorubicin⁽⁷⁹⁾. LRP exprese byla rovněž spojená s kratším dlouhodobým přežitím a kratším obdobím do progresu nemoci.

III. 1) π izoenzym glutathion-S-transferázy a glutathion (GSH)

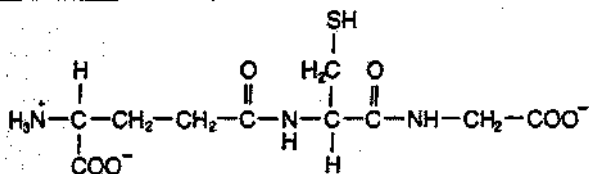
Kromě transportních proteinů se na detoxifikaci cytostatik podílí rovněž zvýšená aktivita detoxifikačních izoenzymů glutathion-S-transferáz (GST). Savčí rodina glutathion-S-transferáz obsahuje několik izoform označovaných α , π , μ a θ (théta)⁽¹⁶⁰⁾. Všechny tyto izoformy GST jsou v cytoplazmě přítomny ve formě monomerních podjednotek a katalytickou aktivitu získávají až jako homodimery. Isoformy GST jsou zodpovědné za konjugaci glutathionu (GSH) se širokým spektrem elektrofilních částic.

Glutathion je klíčovým redukčním činidlem v buňce a účastní se detoxifikace volných radikálových forem, zejména kyslíkových radikálů⁽¹³⁸⁾, podílí se na různých metabolických pochodech včetně syntézy leukotrienů. Leukotrieny jsou syntetizovány leukocyty a zprostředkovávají zánětlivé a alergické reakce. Syntézy se účastní i enzym glutathion-S-transferáza katalyzující adici thiolové skupiny glutathionu na nestálý leukotrien A_4 za vzniku prvního z peptidoleukotrienů, leukotrienů C_4 . Rovnováha mezi redu-



Obr. 2 - Struktura subcelulárních organel vaults.

A - Pohled ze strany na nerozloženou organelu, B - Pohled z vrchu na otevřenou polovinu (podoba „rozvitého květu“). Vault je souměrná, dutá organela. Každá její polovina se může otevřít do podoby „rozvitého květu“ s 8 petálními lístky obklopujícími centrální prstenec⁽⁸⁹⁾. Tato dynamická struktura má pravděpodobně funkční význam.



Obr. 3 - Struktura glutathionu (GSH)

kovanou formou glutathionu (GSH) a oxidovanou formou (GSSG) napomáhá udržovat správný oxidační stav sulfhydrylových skupin proteinů uvnitř buněk.

Glutathion je tripeptid (γ-glutamylcysteinylglycine) obsahující neobvyklou γ-amidovou vazbu (Obr.3). V buňkách je syntetizovaný *de novo* v γ-glutamyllovém cyklu. Gama-glutamyllový cyklus byl objeven Altonem a Meisterem a jde o mechanismus přenosu aminokyselin do buněk tzv. translokací. GSH je při něm syntetizován z glutamátu, cysteinu a glycinu za postupné katalýzy γ-glutamylcysteinsyntetázy (γGCS - limitujícího enzymu této syntézy) a GSH-syntetázy (Obr.4). Volnou energii pro každou z reakcí poskytuje hydrolýza ATP.

GSH má tedy ochrannou roli a patří v buňce mezi nejpočetnější zastoupené thiole nebílkovinné povahy⁽¹²⁷⁾. Ačkoliv některé radikálové formy (např. hydroxylový radikál) mohou přímo reagovat s redukovanou formou glutathionu (GSH), řada dalších je s ním konjugována pomocí záporně nabitých izoenzymů glutathion-S-transferázy (GST). Výsledkem jsou sloučeniny méně toxické, více hydrofilní a tedy snadněji z buňky vylučitelné. Jiné reaktivní molekuly tvořené v rámci oxidačně/redukčních procesů (např. peroxid vodíku) jsou redukovány druhou glutathionovou metabolickou cestou a to pomocí enzymu glutathionperoxidázy (GSH Px) za

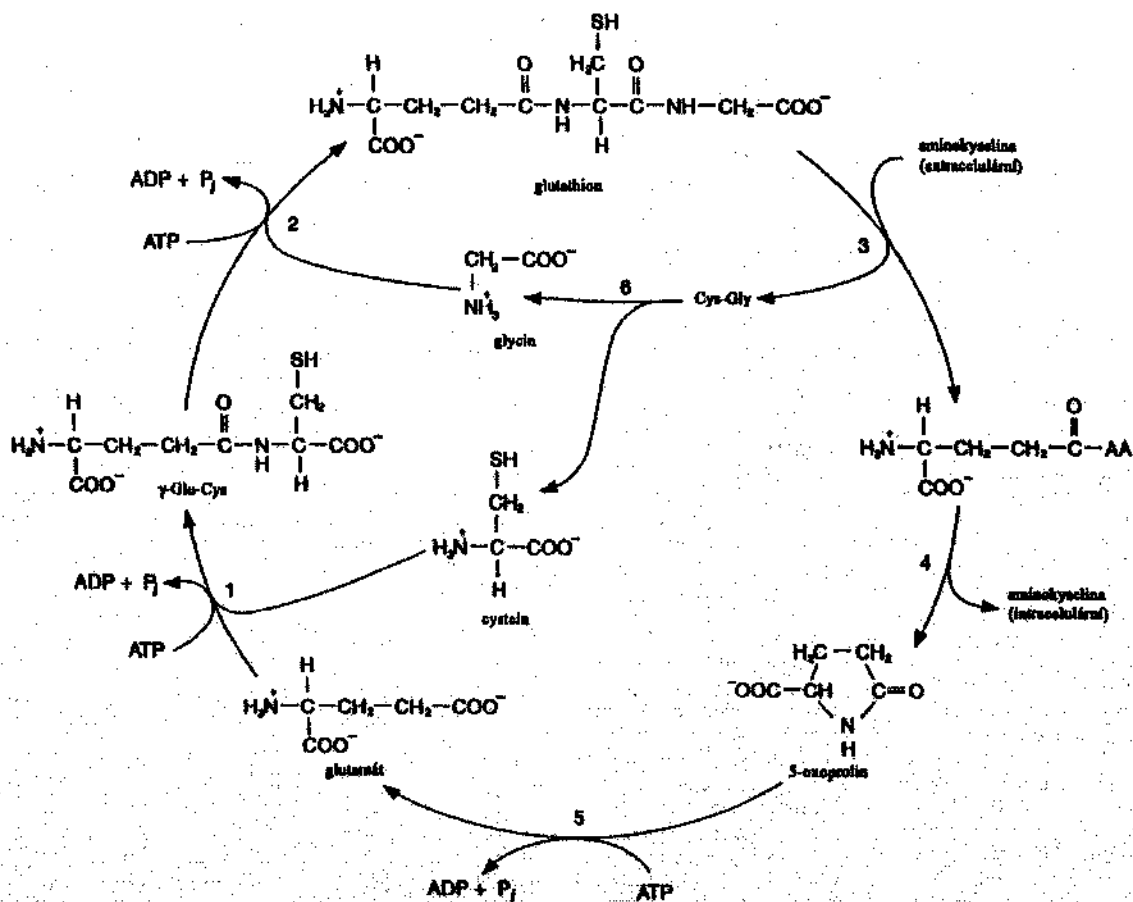
vzniku oxidované, disulfidické formy glutathionu (GSSG, GSSH). GSSG může být následně redukován na svoji monomernickou formu glutathionreduktázou (GR). Tento proces normálně poskytuje GSH a GSSG v poměru 100:1, což umožňuje GSH, aby působil jako vnitrobuněčná redukční látka.

Volné radikálové formy se tvoří v průběhu podávání alkylujících látek nebo při radioterapii. Základní vlastností většiny DNA alkylujících sloučenin je jejich elektrofilita. U některých protinádorových léčiv patřících do této skupiny bylo prokázáno, že skutečně jsou substrátem pro GST (např. chlorambucil, cyklofosamid, BCNU, thiotepa, melfalan...atd). Alkylující látky jsou redukovány buď přímo GSH nebo prostřednictvím GST v glutathionovém redoxním cyklu. Metabolický obrát glutathionu je poměrně rychlý s poločasem kolem 1 hodiny. Inhibice syntézy GSH (např. BSO) vede v krátké době k depleci buněčného GSH a k inhibici glutathionových detoxifikačních mechanismů.

Ne všechny izoformy GST se podílí na lékové rezistenci. GST-α je asociována s detoxifikací hořčičného dusíku, GST-μ s detoxifikací nitrosomočoviny. Zvýšená exprese GST-Π (placentami typ) u MDR buněčných linií vedla k závěru, že právě tato izoforma je klíčová pro lékovou rezistenci. U izoformy α byla pozorována i peroxidázová aktivita⁽³⁷⁾.

Regulace genů GST je multifaktoriální. Podílí se na ní věk, pohlaví, typ tkáně, přítomnost induktorů - chemických sloučenin rozdělitelných do 4 skupin (planární aromatické, oxidanty na bázi fenolu, barbituráty, glukokortikoidy) či metylace genů kódujících GST-azy⁽¹⁰¹⁾.

Schopnost modulovat hladinu GSH či aktivitu GST-π v buňce má BSO (irreverzibilní inhibitor γ-GCS enzymu), který v kombinaci s melfalanem snižuje hladinu GSH^(32,100). Další sloučenina, sulfasalazin, moduluje přímo aktivitu GST-7t a synergicky zvyšovala cytotoxicitu cis-platiny u 2 buněčných linií malobuněčného karcinomu plic⁽⁷⁾.



Obr.4 - γ-glutamyllový cyklus a syntéza glutathionu.

Legenda: Jednotlivé reakce cyklu jsou katalyzovány: (1) γ-glutamylcysteinsyntetázou, (2) glutathionsyntetázou, (3) γ-glutamyltranspeptidázou, (4) γ-glutamylcyklotransferázou, (5) oxyprolinázou, (6) vnitrobuněčnou proteinázou.

V kapitole o MRP proteinu byl již popsán vztah mezi MRP a GSH-xenobiotickou (GSH-X) pumpou. Podtrhněme tedy alespoň fakt, že u množství GSH konjugátů a několika nemodifikovaných léčiv (např. doxorubicinu, etopozidu, vinblastinu) byla pozorována afinita k MRP proteinu. Rovněž byla zjištěna kolokalizace GSH konjugátů do těch oblastí buňky kde se nachází MRP^(22,132).

Zvýšená intracelulární koncentrace GSH či zvýšená aktivita GST- Π má za následek konjugaci GSH s vybranými cytostatiky, čímž se snižuje jejich biologická účinnost a dostupnost. Tento trend byl pozorován u 58 ze 60 nádorových buněčných linií⁽¹⁶⁹⁾. U rezistentních buněk byla nalezena v důsledku 2-krát vyššího množství GST-TC mRNA i zvýšená katalytická aktivita tohoto enzymu. Vyšší množství mRNA však nebylo způsobeno amplifikací GST-p genu⁽²⁹⁾. Jiná studie analyzující 25 buněčných linií rezistentních na doxorubicin a exprimujících GST-TC našla pouze u 10 linií zvýšenou aktivitu GST-TC oproti mateřským liniím. Pouze u 5 linií byla GST-TC aktivita alespoň 2krát větší. Zbýlých 15 sublinií mělo GST-TC aktivitu nezměněnou či dokonce sníženou, tedy přesný opak toho co se očekávalo⁽¹²¹⁾. Sublinie rezistentní na BSO (35-40x rezistentnější v porovnání s mateřskou linií) připravené z buněčné Linie lidských hepatocytů vykazovaly nadměrnou expresi γ -GCS, dále v důsledku snížené transkripční aktivity měly snížené množství GST-TC, tím pádem bylo pozorováno i méně GSH-konjugátů a tedy zvýšená hladina samotného GSH v buňce (v prostředí BSO exprimovaly tyto sublinie až 4krát více GSH). Otázka, zda je snížená exprese GST-TC odpovědí buňky na podání GSH inhibitorů a další otázky vyvstávající z této studie nebyly ještě zcela zodpovězeny⁽¹⁶⁹⁾.

Transformační studie provedené *in vitro* na kvasinkách, kdy byly různé formy GST vneseny do senzitivních buněk, prokázaly jejich účast v lékové rezistenci⁽¹⁶⁾. Transfekce buněčné linie MCF-7 (lidský karcinom prsu) vektory nesoucími geny různých izoforem GST sice zvýšily hladinu GST v buňkách, nicméně hladina rezistence nebyla signifikantně zvýšena⁽¹²⁰⁾. V jiné studii u MCF-7 buněk transfekovaných GST-TC byla pozorována zvýšená míra konjugace thiotepy s GSH v porovnání s kontrolami. Vazba thiotepy na GSH měla za následek snížení cytotoxicity thiotepy⁽³³⁾. Výsledky těchto experimentálních studií jsou natolik rozporuplné, že nedávají dostatečný důkaz o přímém vztahu mezi lékovou rezistencí a GST-TC aktivitou. Změny GST aktivit mohou být specifické pro každou jednotlivou buněčnou linii. Otázkou také zůstává do jaké míry je zvýšená GST-TC aktivita dostačující pro navození MDR. Velmi specifická pro jednotlivá xenobiotika je rovněž míra jejich cytotoxicity ztracená v důsledku konjugace s GSH^(71,119). Proto eliminace konjugátů GS-X pumpou bude zřejmě nezbytná pro kompletní detoxifikaci⁽⁷⁷⁾. Ahmad et al.® popsali různé alelické varianty GST-TC. V roce 1997 byl podán první důkaz o tom, že polymorfismus v GST-TC je odpovědný za různé silnou odpověď buňky na toxický stres⁽⁷⁶⁾. Polymorfismus GST-TC v lidské populaci může tedy alespoň částečně vysvětlit různou hladinu vnímavosti jedinců na sloučeniny konjugující se s GSH.

2) Výskyt GST-TC a GSH v lidských nádorech

Na základě rozporuplných výsledků získaných z experimentů na buněčných liniích není studií zabývajících se klinickou rezistencí v souvislosti s GST-TC aktivitou mnoho. Avšak nadměrná exprese GST-TC a tedy zvýšená míra detoxifikačních procesů s následnou sníženou efektivností léčby byla popsána u mnoha nádorových onemocnění (karcinom ovaria, prsu, CLL, nemalobuněčný karcinom plic, kolorektální karcinom)⁽¹²⁷⁾.

Bylo pozorováno zvýšení exprese GST- Π u buněk neuroblastomu odebraných po léčbě v porovnání se stavem před léčbou⁽⁹⁸⁾. Rovněž u pacienta s chemosenzitivním malobuněčným karcinomem plic byla GST-TC aktivita nižší v porovnání s pozdějším odběrem, kdy se onemocnění vyvinulo v rezistentní formu⁽⁴⁵⁾.

U 240 vzorků karcinomu prsu byla pozorována nepřímá úměra mezi GST-TC expresí a počtem estrogenových receptorů. Navíc byla pozitivita na GST-TC identifikována jako silný prediktor relapsu či smrti v podskupině uzlinově negativních pacientek po chemoterapii⁽⁵⁷⁾. GSH, GST-TC a aldehyd dehydrogenáza jsou asociovány u buněčných linií s rezistencí na karboplatinu a cyklofosfamid. Tanner et al.⁽¹⁶⁷⁾ zjišťovali, zda je přítomnost těchto 3 markerů spojena s rezistencí ovariálního karcinomu na léčebnou kombinaci cyklofosfamid-karboplatina. Studie byla provedena na 139 pacientkách. Nebylo nalezeno žádné spojení mezi

množstvím GSH, přítomností obou proteinů v nádorové buňce a přežitím. Medián přežití byl však signifikantně delší u pacientů, kteří měli intracelulární obsah GSH menší než 4,9 μ -g/mg proteinu. Glutathion se však nejevil jako nezávislý prognostický faktor, nýbrž byl signifikantně asociován se stážením tumoru. Množství GSH v buňce bylo rovněž vázáno s progresí nádoru. Ani u jedné ze sledovaných sloučenin však nebyl prokázán vztah k rezistenci na léčbu cyklofosfamid-karboplatinu. Pozitivní korelace GST-TC exprese s nepříznivými prognostickými znaky lidských sarkomů⁽¹⁷¹⁾, naznačuje, že exprese GST-TC může korespondovat se špatnou klinickou odpovědí některých pacientů. Zvýšenou expresi GST-TC v lidských nádorech spojují se špatnou prognózou i další studie^(29,90).

Literatura uvádí zvýšenou expresi GST-TC v prognosticky nepříznivých lidských nádorech, avšak nepotvrzuje její úlohu v navození MDR. Tento fakt je v souladu s laboratorními pozorováními⁽¹⁴⁴⁾ prohláujícími GST-TC jako znak preneoplastické transformace buňky. Hlubší poznání mechanismů jakými se GST-TC exprese může podílet na maligní transformaci by zřejmě pomohlo lépe pochopit proces samotné onkogeneze⁽⁹⁴⁾.

IV. Další proteiny odpovědné za specifickou rezistenci na některá Protinádorová léčiva či jejich skupiny

V úvodu I. části bylo zmíněno, že kromě mnohočetné lékové rezistence existuje ještě rezistence zkřížená (na skupinu strukturálně příbuzných léčiv či na skupinu léčiv se stejným mechanismem účinku) a rovněž specifická rezistence kjednomu určitému cytostatiku. Tato problematika přesahuje rámec předkládaných prací a bude jí věnována zvláštní pozornost v některém z našich příštích sdělení. Nicméně bychom zde rádi uvedli alespoň jmenovitě některé z nich.

Molekuly enzymů topoizomerázy I a topoizomerázy II jsou cílovou strukturou řady protinádorových léčiv, např. epipodofylotoxinů, antracyklinů, derivátů camptothecinu. Snížené množství topoizomeráz nebo mutace v jejich primární struktuře neumožňuje interakci s inhibitory. Jelikož cytotoxicita většiny inhibitorů topoizomeráz přímo závisí na množství aktivních molekul enzymu, redukce jejich počtu se projeví vznikem lékové rezistence. Rada autorů přiřazuje rezistenci na inhibitory topoizomeráz k atypické mnohočetné lékové rezistenci

Do této problematiky se dále řadí následující mechanismy:

1. rezistence na inhibitory dihydrofolát reduktázy (DHFR), např. metotrexát, způsobená poruchou transportních mechanismů pro foláty a antifolika.
2. zvýšená koncentrace cytidindeaminázy vyúsťující v rezistenci na ARA-C.
3. thymidylátsyntetáza a rezistence na 5-fluorouracil (5-FU).
4. zvýšená aktivita DNA reparačních enzymů např. alkyltransférázy a rezistence na deriváty platiny a další alkylační látky.
5. amplifikace genu pro aspartát transkarbamylázu a rezistence na sůl kyseliny N-fosfonacetyl-L-asparagové (PALA).
6. amplifikace ribonukleotid reduktázy a rezistence na hydroxyureu (HU)...atd.

Poděkování

Práce na projektu *lékové rezistence jsou financovány granty IGAMZ4132-5, MŠMT VZJ14/98151100001, VS 96154 a Nadační pro výzkum rakoviny v Olomouci.*

LITERATURA

1. Abraham E.H., Prat, A.G., Gerweck, L., Seneveratne, T., Arcenci, R.J., Kramer, R., Guidotti, G., Cantello, H.F.: The multidrug resistance (mdr1) gene product functions as an ATP channel. Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 1993, 90(1), pp. 312-316
2. Aguilar-Bryan, L., Nichols, C.G., Wechsler, S.W., et al.: Cloning of the b cell high-affinity sulfonylurea receptor: a regulator of insulin secretion. Science, 1995, 268, pp. 423-426
3. Ahmad, A., Wilson, D.E., Fritz, R.R., Singh, S.V., Medh, R.D., Nagle, G.T., Awasthi, Y.C., Kurosky, A.: Primary and secondary structural analyses of glutathione-S-transferase pi from human placenta. Arch. Biochem. Biophys., 1990, 278(2), pp. 396-408
4. Altenberg, G.A., Vanoye, C.G., Horton, J.K., Reuss, L.: Unidirectional fluxes of rhodamine 123 in multidrug resistance cells: Evidence against direct extrusion from the plasma membrane. Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 1994, 91, pp. 4654-4657
5. Ambudkar, S.V., Lelong, I.H., Zhang, J., Cardarelli, C.O., Gottesman, M.M., Pastan, I.: Partial purification and reconstitution of the human multidrug-resistance pump: characterization of the drug-stimulatable ATP hydrolysis. Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 1992, 89(18), pp. 8472-8476
6. Arcenci, R.J.: Clinical significance of P-glycoprotein in multidrug resistance malignancies. Blood, 1993, 81, pp. 2215-2222

7. Awasthi, S., Sharma, R., Singhal, S.S., Herzog, N.K., Chaubey, M., Awasthi, Y.C.: Modulation of cisplatin cytotoxicity by sulphasalazine. *Br. J. Cancer*, 1994, 70, pp. 190-194
8. Barrand, M.A., Rhodes, T., Center, M.S., Twentyman, P.R.: Chemosensitization and drug accumulation effects of cyclosporin A, PSC 833, and verapamil in human MDR large cell lung cancer cells expressing a 190 kDa membrane protein distinct from P-glycoprotein. *Eur. J. Cancer*, 1993, 29A, pp. 408-415
9. Bech-Hansen, N.T., Sarangi, F., Sutherland, D.J.A., Ling, V.: Rapid assays for evaluating the drug sensitivity of tumor cells. *J. Natl. Cancer Inst.*, 1977, 59, pp. 21-27
10. Beck, W.T., Cirtain, M.: Continued expression of vinca alkaloid resistance by CCR F-CEM cells after treatment with tunicamycin or pronase. *Cancer Res.*, 1982, 42, pp. 184-189
11. Beck, W.T.: The cell biology of multiple drug resistance. *Biochem Pharmacol.*, 1987, 36(18), pp. 2879-2887
12. Bell, D.R., Gerlach, J.H., Kartner, N., Buick, R.N., Ling, V.: Detection of P-glycoprotein in ovarian cancer: a molecular marker associated with multidrug-resistance. *J. Clin. Oncol.*, 1985, 3, pp. 311-315
13. Bell, D.R., Trent, J.M., Willard, H.F., Riordan, J.R., Ling, V.: Chromosomal location of human P-glycoprotein gene sequences. *Cancer Genet Cytogenet.*, 1987, 25, pp. 141-148
14. Bellamy, W.T., Dalton, W.S.: Multidrug resistance in the laboratory and clinic. *Adv. Clin. Chem.*, 1994, 31(1), pp. 1-61
15. Biedler, J.L., Riehm, H.: Cellular resistance to actinomycin D in Chinese hamster cells in vitro: cross-resistance, radioautographic and cytogenetic studies. *Cancer Res.*, 1970, 30, 1174
16. Black, S.M., Beggs, J.D., Hayes, J.D., et al.: Expression of human glutathione-S-transferase in *Saccharomyces cerevisiae* confers resistance to the anticancer drugs adriamycin and chlorambucil. *Biochem. J.*, 1990, 268, pp. 309-315
17. Boesch, D., Muller, K., Pourtier-Manzanedo, A., Loo, F.: Restoration of daunomycin retention in multidrug-resistant P388 cells by submicromolar concentration of SDZ PSC 833, a nonimmunosuppressive cyclosporine derivative. *Exp. Cell Res.*, 1991, 196(1), pp. 26-32
18. Bolhuis, H., van Veen, H.V., Molenaar, D., Poolman, B., Driessen, A.J.M., Konings, W.N.: Multidrug resistance in *Lactococcus lactis*: evidence for ATP-dependent drug extrusion from the inner leaflet of the cytoplasmic membrane. *EMBO J.*, 1996, 15, pp. 4239-4245
19. Borst, P., Schinkel, A.H.: Genetic dissection of the function of mammalian P-glycoproteins. *Trends Genet.*, 1997, 13(6), pp. 217-222
20. Boscoboinik, D., Gupta, R.S., Epand, R.M.: Investigation of the relationship between altered intracellular pH and multidrug resistance in mammalian cells. *Br. J. Cancer*, 1990, 61(4), pp. 568-572
21. Bordow, S.B., Haber, M., Madafiglio, J., Cheung, B., Marshall, G.M., Norris, M.D.: Expression of the multidrug resistance associated protein (MRP) gene correlates with amplification and overexpression on the N-myc oncogene in childhood neuroblastoma. *Cancer Res.*, 1994, 54, pp. 5036-5040
22. Breuninger, L.M., Paul, S., Gaughan, K., et al.: Expression of multidrug resistance associated protein in NIH/3T3 cells confers multidrug resistance associated with increased drug efflux and altered intracellular drug distribution. *Cancer Res.*, 1995, 55, pp. 5342-5347
23. Brock, I., Hipfner, D.R., Nielsen, B.S., et al.: Sequential coexpression of the multidrug resistance genes MRP and mdr1 and their products in VP-16 (etoposide)-selected H69 small cell lung cancer cells. *Cancer Res.*, 1995, 55, pp. 459-462
24. Burger, H., Nooter, K., Zaman, G.J., Sonneveld, P., van Wingerden, K.E., Oostrum, R.G., Stoter, G.: Expression of the multidrug resistance associated protein (MRP) in acute and chronic leukemias. *Leukemia*, 1994, 8(6), pp. 990-997
25. Chambers, T.C., Zheng, B., Kuo, J.F.: Regulation by pnbol ester and protein kinase C inhibitors, and by a protein phosphatase inhibitor (okadaic acid), of P-glycoprotein phosphorylation and relationship to drug accumulation in multidrug resistant human KB cells. *Mol. Pharmacol.*, 1992, 41, pp. 1008-1015
26. Chan, H.S., Thorne, P.S., Haddad, G., Ling, V.: Immunohistochemical detection of P-glycoprotein: prognostic correlation in soft tissue sarcoma of childhood. *J. Clin. Oncol.*, 1990, 8(4), pp. 689-704
27. Chan, H.S.L., Haddad, G., Thorne, P.S., DeBoer, G., Lin, Y.P., Ondrusek, N., Yeger, H., Ling, V.: P-glycoprotein expression as a predictor of the outcome of therapy for neuroblastoma. *N. Engl. J. Med.*, 1991, 325, pp. 1608-1614
28. Chan, H.S.L., Lu, Y., Grogan, T.M., Haddad, G., Hipfner, D.R., Cole, S.P.C., Deeley, R.G., Ling, V., Gallie, B.L.: Multidrug resistance protein (MRP) expression in retinoblastoma correlates with the rare failure of chemotherapy despite cyclosporine for reversal of P-glycoprotein. *Cancer Res.*, 1997, 57, pp. 2325-2330
29. Chao, C.C., Huang, Y.T., Ma, C.M., Chou, W.Y., Lin-Chao, S.: Overexpression of glutathione-S-transferase and elevation of thiol pools in a multidrug resistant human colon cancer cell line. *Mol. Pharmacol.*, 1992, 41(1), pp. 69-75
30. Chen, C.-J., Chin, J.E., Ueda, K., Clark, D.P., Pastan, I., Gottesman, M.M., Roninson, I.B.: Internal duplication and homology with bacterial transport proteins in the mdr1 (P-glycoprotein) gene from multidrug-resistant human cells. *Cell*, 1986, 47, pp. 381-389
31. Chin, J.E., Soffir, R., Noonan, K.E., Choi, K., Roninson, I.B.: Structure and expression of the human MDR (P-glycoprotein) gene family. *Mol. Cell Biol.*, 1989, 9, pp. 3808-3820
32. Ciaccio, P.J., Tew, K.D., LaCreta, F.P.: The spontaneous and glutathione-S-transferase mediated reaction of chlorambucil with glutathione. *Cancer Commun.*, 1990, 2, pp. 279-286
33. Cnubben, N.H., Rommens, A.J., Oudshoorn, M.J., Van Bladeren, P.J.: Glutathione-dependent biotransformation of the alkylating drug thiopeta and transport of its metabolite monogluthionylthiopeta in human MCF-7 breast cancer cells. *Cancer Res.*, 1998, 58(20), pp. 4616-4623
34. Cole, S.P.C., Downes, H.F., Mirski, S.E.L., Clements, D.J.: Alterations in glutathione and glutathione related enzymes in multidrug resistant small cell lung cancer cell line. *Mol. Pharmacol.*, 1990, 37, pp. 192-197
35. Cole, S.P.C., Bhardwaj, G., Gerlach, J.H., Mackie, J.E., Grant, C.E., Almquist, K.C., Steward, A.J., Kurz, E.U., Duncan, A.M.V., Deeley, R.G.: Overexpression of a transporter gene in a multidrug-resistant human lung cancer cell line. *Science*, 1992, 258, pp. 1650-1654
36. Cole, S.P.C., Sparks, K.E., Fraser, K. et al.: Pharmacological characterization of multidrug resistant MRP-transfected human tumor cells. *Cancer Res.*, 1994, 54, pp. 5902-5910
37. Commandeur, J.N.M., Stijntjes, G.J., Vermeulen, N.P.E.: Enzymes and transport systems involved in the formation and disposition of glutathione-S-conjugates. *Pharmacol. Rev.*, 1995, 47, pp. 271-294
38. Cordon-Cardo, C., O'Brien, J.P., Casals, D., Rittman-Grauer, L., Biedler, J.L., Melamed, Bertino, J.R.: Multidrug resistance gene (P-glycoprotein) is expressed by endothelial cells at blood-brain barrier sites. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1989, 86, pp. 695-698
39. Currier, S.J., Ueda, K., Willingham, M.C., Pastan, I., Gottesman, M.M.: Deletion and insertion mutants of the multidrug transporter. *J. Biol. Chem.*, 1989, 264, pp. 14376-14381
40. Deeley, G.R., Cole, S.P.C.: Function, evolution and structure of multidrug resistance protein (MRP). *Semin. Cancer Biol.*, 1997, 8, pp. 193-204
41. Dekant, W.: Biosynthesis and cellular effects of toxic glutathione-S-conjugates. *Adv. Exp. Med. Biol.*, 1996, 387, pp. 297-312
42. Devault, A., Gros, P.: Two members of the mouse mdr gene family confer multidrug resistance with overlapping but distinct drug specificities. *Mol. Cell Biol.*, 1990, 10(4), pp. 1652-1663
43. De Vries, E.G.E., Meijer, C., Timmer-Bosscha, H., Berendsen, H.H., de Leij, L., Mulder, N.H.: Resistance mechanisms in three human small cell lung cancer cell lines established from one patient during clinical follow-up. *Cancer Res.*, 1989, 49, pp. 4175-4178
44. Diah, S.K., Smitherman, P.K., Townsend, A.J., Morrow, C.S.: Detoxification of 1-chloro-2,4-dinitrobenzene in MCF7 breast cancer cells expressing glutathione-S-transferase P1-1 and/or multidrug resistance protein 1. *Toxicol. Applied Pharmacol.*, 1999, 157, pp. 85-93
45. Di Marco, A., Casazza, A.M., Dasdia, T., Necco, A., Pratesi, G., Rivolta, P., Velich, A., Zaccara, A., Zunino, F.: Changes of activity of daunorubicin, adriamycin and stereoisomers following the introduction or removal of hydroxyl groups in the amino sugar moiety. *Chem. Biol. Interact.*, 1977, 19(3), pp. 291-302
46. Dorr, R.T., Loddil, J.D., Trent, J.M., Dalton, W.S.: Mitomycin C resistant L1210 leukaemia cells: association with pleiotropic drug resistance. *Biochem Pharmacol.*, 1987, 36, 3155
47. Dudler, R., Hertig, C.: Structure of and mdr-like gene from *Arabidopsis thaliana*. *J. Bio. Chem.*, 1992, 267, pp. 5882-5888
48. Eijdens, E.W.H.M., De Haas, M., Coco-Martin, J.M., et al.: Mechanism of MRP overexpression in four human lung cancer cell lines and analysis of the MRP amplicon. *Int. J. Cancer*, 1995, 60, pp. 676-684
49. Endicott, J.A., Ling, V.: The biochemistry of P-glycoprotein-mediated multidrug resistance. *Annu. Rev. Biochem.*, 1989, 58, pp. 137-171
50. Epstein, J., Xiao, H.Q., Oba, B.K.: P-glycoprotein expression in plasma-cell myeloma is associated with resistance to VAD. *Blood*, 1989, 74(3), pp. 913-917
51. Felmlee, T., Pellett, S., Welch, R.A.: Nucleotide sequence of an *Escherichia coli* chromosomal hemolysin. *J. Bacteriol.*, 1985, 163, pp. 94-105
52. Flens, M.J., Zaman, G.J.R., Van der Valk, P., Izquierdo, M.A., Schroeijers, A.B., Scheffer, G.L., Van der Groep, P., De Haas, M., Meijer, C.J.L.M., Scheper, R.J.: Tissue distribution of the multidrug resistance associated protein (MRP). *Am. J. Pathol.*, 1996, 148(4), pp. 1237-1247
53. Fojo, A.T., Ueda, K., Slamon, D.J., Poplack, D.G., Keiser, H.R., Gottesman, M.M., Pastan, I.: Expression of a multidrug-resistance gene in human tumors and tissues. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1987, 84, pp. 265-269
54. Ford, J.M., Hait, W.N.: Pharmacology of drugs that alter multidrug resistance in cancer. *Pharmacol. Rev.*, 1990, 42(3), pp. 155-199
55. Foxwell, B.M., Mackie, A., Ling, V., Ryffel, B.: Identification of the multidrug resistance-related P-glycoprotein as a cyclosporine binding protein. *Mol. Pharmacol.*, 1989, 36(4), pp. 543-546
56. Gerlach, J.H., Endicott, J.A., Juranka, P.F., Henderson, G., Sarangi, F., Deuchars, K.L., Ling, V.: Homology between P-glycoprotein and a bacterial haemolysin transport protein suggest a model for multidrug resistance. *Nature*, 1986, 324, pp. 485-489
57. Gilbert, L., Elwood, L., Merino, M., Masood, S., Barnes, R., Steinberg, S., Lazarus, D., Pierce, L., d'Angelo, T., Moscow, J.A., Townsend, A.J., Cowan, K.H.: A pilot study of Pi-clas glutathione S-transferase (GSTp) in breast cancer: correlation with estrogen receptor expression and prognosis in node-negative breast cancer. *J. Clin. Oncol.*, 1993, 11, pp. 49-58
58. Gill, D.R., Hyde, S.C., Higgins, C.F., Valverde, M.A., Mintenig, G.M., Sepulveda, F.M.: Separation of drug transport and chloride channel functions of the human multidrug resistance P-glycoprotein. *Cell*, 1992, 71, pp. 23-32
59. Goasguen, J.E., Dossot, J.M., Fardel, O., Le Mee, F., Le Gall, E., Leblay, R., LePrise, P.Y., Chaperon, J., Fauchet, R.: Expression of multidrug resistance-associated P-glycoprotein (P-170) in 59 cases of de novo acute lymphoblastic leukemia: prognostic implications. *Blood*, 1993, 81(9), pp. 2394-2398
60. Goldstein, L.J., Pastan, I., Gottesman, M.M.: Multidrug resistance in human cancer. *Crit. Rev. Oncol. Hematol.*, 1992, 12(3), pp. 243-253
61. Gottesman, M.M., Pastan, I.: Biochemistry of multidrug resistance mediated by the multidrug transporter. *Annu. Rev. Biochem.*, 1993, 62, pp. 385-427
62. Goodfellow, H.R., Sardini, A., Ruetz, S., Callaghan, R., Gros, P., McNaughton, P.A., Higgins, C.F.: Protein kinase C-mediated phosphorylation does not regulate drug transport by the human multidrug resistance P-glycoprotein. *J. Biol. Chem.*, 1996, 271, pp. 13668-13674
63. Grana, X., Reddy, E.P.: Cell cycle control in mammalian cells: role of cyclins, cyclin dependent kinases (CDKs), growth suppressor genes and cyclin dependent kinase inhibitors (CDKIs). *Blood*, 1995, 11, pp. 211-219
64. Grant, C.E., Valdimarsson, G., Hipfner, D.R., Almquist, K.C., Cole, S.P., Deeley, R.G.: Overexpression of multidrug resistance-associated protein (MRP) increases resistance to natural product drugs. *Cancer Res.*, 1994, 54(2), pp. 357-361
65. Gros, P., Ben Neriah, Y.B., Croop, J.M., Housman, D.E.: Isolation and expression of a complementary DNA that confers multidrug resistance. *Nature*, 1986, 323(6090), pp. 728-731
66. Hamada, H., Hagiwara, K., Nakajima, T., Tsuruo, T.: Phosphorylation of the Mr 170,000 to 180,000 glycoprotein specific to multidrug-resistant tumor cells: Effects of verapamil trifluoperazine, and phorbol esters. *Cancer Res.*, 1987, 47, pp. 2860-2865
67. Hardy, S.P., Goodfellow, H.R., Valverde, M.A., GUI, D.R., Sepulveda, F.V., Higgins, C.F.: Protein kinase C-mediated phosphorylation of the human multidrug resistance P-glycoprotein regulates cell volume-activated chloride channels. *EMBO J.*, 1995, 14, pp. 68-75
68. Hare, J.F.: Mechanisms of membrane protein turnover. *Biochem. Biophys. Acta*, 1990, 1031, pp. 71-90

69. Hasegawa, S., Abe, T., Naito, S., et al.: Expression of multidrug resistance associated protein (MRP), MDR1, and DNA Topoisomerase II in human multidrug resistant bladder cancer cell lines. *Br. J. Cancer*, 1995,71, pp. 907-913
70. Higgins, C.F.: A B C transporters: From microorganisms to man. *Annu Rev. Cell Biol.*, 1992, 8 pp. 67-113
71. Higgins, C.F., Gottesman, M. M.: Is the multidrug transporter a flippase? *Trends Biochem. Sci.*, 1992,17, pp. 18-21
72. Higgins, C.F., Callaghan, R., Linton, K.J., Rosenberg, M.F., Ford, R.C.: Structure of the multidrug resistance P-glycoprotein. *Semin. Cancer Biol.*, 1997,8, pp. 135-142
73. Hipfner, D.R., Almquist, K.C., Leslie, E.M., Gerlach, J.H., Grant, C.E., Deeley, R.G., Cole, S.P.C.: Membrane topology of the multidrug resistance protein, MRP: a study of glycosylation-site mutants reveals an extracytosolic NH₂-terminus. *J. Biol. Chem.*, 1997,272, pp. 23623-23630
74. Holzmayer, T.A., Hilsenbeck, S., Von Hoff, D.D., Roninson, I.B.: Clinical correlates of MDR1 (P-glycoprotein) gene expression in ovarian and small-cell lung carcinomas. *J. Natl. Cancer Inst.*, 1992, 84(19), pp. 1486-1491
75. Horio, M., Gottesman, M. M., Pastan, I.: ATP-dependent transport of vinblastin in vesicles from human multidrug-resistance cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1988, 85(10), pp. 3580-3586
76. Hu, X., Ji, X., Srivastava, S.K., Xia, H., Awasthi, S., Nanduri, B., Awasthi, Y.C., Zimniak, P., Singh, S.V.: Mechanism of differential catalytic efficiency of two polymorphic forms of human glutathione-S-transferase P1-1 in the glutathione conjugation of carcinogenic diol epoxide of chrysene. *Arch. Biochem. Biophys.*, 1997, 345(1), pp. 32-38
77. Ishikawa, T.: The ATP-dependent glutathione-S-conjugate export pump. *Trends Biol. Sci.*, 1992,17, pp. 463-468
78. Izquierdo, M.A., Van der Zee, A.G.J., Vermorken, J.B., Van der Valk, P., Belien, J.A.M., Giaccone, G., Scheffer, G.L., Flens, M.J., Pinedo, H.M., Kenemans, P., Meijer, C.J.M.L., De Vries, E.G.E., Scheper, R.J.: Drug resistance associated marker LRP for prediction of response to chemotherapy and prognoses in advanced ovarian carcinoma. *J. Natl. Cancer Inst.*, 1995, 87, pp. 1230-1237
79. Izquierdo, M.A., Scheffer, G.L., Flens, M.J., Shoemaker, R.H., Rome, L.H., Scheper, R.J.: Relationship of LRP-human major vault protein to in vitro and clinical resistance to anticancer drugs. *Cytotechnology*, 1996,19, pp. 191-197
80. Izquierdo, M.A., Shoemaker, R.H., Flens, M.J., Scheffer, G.L., Wu, L., Prather, T.R., Scheper, R.J.: Overlapping phenotypes of multidrug resistance among panels of human cancer cell lines. *Int. J. Cancer*, 1996,65(2), pp. 230-237
81. Izquierdo, M.A., Scheffer, G.L., Flens, M.J., Giaccone, G., Broxterman, H.J., Meijer, C.J.M.L., Van der Valk, P., Scheper, R.J.: Broad distribution of the multidrug resistance related vault protein LRP in normal human tissues and tumors. *Am. J. Pathol.*, 1996,148(3), pp. 877-887
82. Jaffrezou, J.P., Laurent, G.: Ceramide: A new target in anticancer research. *Electron. J. Oncol.*, 1999,2, pp. 1-32
83. Jirski, J., Deeley, R.G., Cole, S.P.C., Steward, A.J., Fedida, D.: Inwardly rectifying K⁺ channels and volume-regulated anion channels in multidrug resistant small cell lung cancer cells. *Cancer Res.*, 1993,53, pp. 4156-4160
84. *Journal of Clinical Oncology*, Editorial: Modulation of Multidrug Resistance: At the Treshold. *J. Clin. Oncol.*, 1993,11(9), pp. 1629-1635
85. Juliano, R.L., Ling, V.: A surface glycoprotein modulating drug permeability in Chinese hamster ovary cells mutants. *Biochem. Biophys. Acta*, 1976,455,152-162
86. Kartner, N., Riordan, J.R., Ling, V.: Cell surface P-glycoprotein is associated with multidrug resistance in mammalian cell lines. *Science*, 1983,221,1285
87. Kedersha, N.L., Rome, L.H.: Isolation and characterization of a novel ribonucleoprotein particle: large structure contains single species of small RNA. *J. Cell Biol.*, 1986,103, pp. 699-709
88. Kedersha, N.L., Miquel, M.C., Bittner, D., Rome, L.H.: Vaults II. Ribonucleoprotein structures are highly conserved among higher and lower eukaryotes. *J. Cell Biol.*, 1990,110, pp. 895-901
89. Kedersha, N.L., Heuser, J.E., Chugani, D.C., Rome, L.H.: Vaults III. Vault ribonucleoprotein particles open into flower-like structures with octagonal symmetry. *J. Cell Biol.*, 1991,112, pp. 225-235
90. Keith, W.N., Stallard, S., Brown, R.: Expression of mdr-1 and gst-pi in human breast tumours: comparison to in vitro chemosensitivity. *Br. J. Cancer*, 1990, 61(5), pp. 712-716
91. Keizer, H.G., Joenje, H.: Increased cytosolic pH in multidrug-resistant human lung tumor cells: effect of verapamil. *J. Natl. Cancer Inst.*, 1989, 81(9), pp. 706-709
92. Keppler, D., Leier, I., Jedlitschky, G., Mayer, R., Buchler, M.: The function of the multidrug resistance proteins (MRP and cMRP) in drug conjugate transport and hepatobiliary excretion. *Adv. Enzyme Reg.*, 1996, 36, pp. 17-29
93. Kickhoefer, V.A., Rome, L.H.: The sequence of a cDNA encoding the major vault protein from *Rattus norvegicus*. *Gene*, 1994,151, pp. 257-260
94. Kitahara, A., Satoh, K., Noshimura, K., Ishikawa, T., Kazuo, R., Sato, K., Tsuda, H., Ito, N.: Purification, induction and distribution of placental glutathione-S-transferase: A new marker enzyme for preneoplastic cells in the rat chemical hepatocarcinogenesis. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1984, 82, pp. 3964-3968
95. Kleiner, P.: Protinádorová chemoterapie. Prague, Czech Republic, Galén Publisher, 1st edition, 1996,614 pp.
96. Kool, M., de Haas, M., Scheffer, G.L., Scheper, G.R., van Eijk, M.J.T., Juijn, J.A., Baas, F., Borst, P.: Analysis of expression of cMOAT (MRP2), MRP3, MRP4, and MRP5 homologues of the multidrug resistance associated protein gene (MRP1) in human cancer cell lines. *Cancer Res.*, 1997,57, pp. 3537-3547
97. Kuo, M.T., Bao, J., Furuichi, M., Yamane, Y., Gomi, A., Savaraj, N., Masuzawa, T., Ishikawa, T.: Frequent coexpression of MRP/GS-X pump and glutamylcysteine synthetase mRNA in drug resistant cells, untreated tumor cells, and normal mouse tissues. *Biochem. Pharmacol.*, 1998,55, pp. 605-615
98. Kuroda, H., Sugimoto, T., Ueda, K., Tsuchida, S., Hori, Y., Inazawa, J., Sato, K., Sawada, T.: Different drug sensitivity in two neuroblastoma cell lines established from the same patient before and after chemotherapy. *Int. J. Cancer*, 1991,47, pp. 732-737
99. Kuss, B.J., Deeley, R.G., Cole, S.P.C., et al.: Deletion of gene for multidrug resistance in acute myeloid leukemia with inversion in chromosome 16: prognostic implications. *Lancet*, 1994,343, pp. 1531-1534
100. LaCreta, F.P., Brennan, J.M., Hamilton, T.C., Ozols, R.F., O'Dwyer, P.J.: Stereoselective pharmacokinetics of L-buthionine SR-sulfoximine in patients with cancer. *Drug. Metab. Dispos.*, 1994,22, pp. 835-842
101. Lee, W-H, Morton, R.A., Epstein, J.I., et al.: Cytidine methylation of regulatory sequences near the p-class glutathione-S-transferase gene accompanies human prostatic cancer. *Proc. Acad. Natl. Sci. USA*, 1994,91, pp. 11733-11737
102. Lehnert, M.: Multidrug resistance in human cancer. *J. of Neuro-Oncol.*, 1994,22, pp. 239-243
103. Leier, I., Jedlitschky, G., Buchholz, Z., Cole, S.P.C., Deeley, R.G., Keppler, D.: The MRP gene encodes an ATP-dependent export pump for leukotriene C4 and structurally related conjugates. *J. Biol. Chem.*, 1994,269, pp. 27807-27810
104. Leier, I., Jedlitschky, G., Buchholz, U., Keppler, D.: Characterization of the ATP dependent leukotriene C4 export carrier in mastocytoma cells. *Eur. J. Biochem.*, 1994,220, pp. 599-606
105. List, A.F., Spier, C.S., Grogan, T.M., Johnson, C., Roe, D.J., Greer, J.P., Wolff, S.N., Broxterman, H.J., Scheffer, G.L., Scheper, R.J., Dalton, W.S.: Overexpression of the major vault transporter protein LRP predicts treatment outcome in AML. *Blood*, 1996, 87(6), pp. 2464-2469
106. Loe, D.W., Deeley R.G., Cole, S.P.C.: Biology of the Multidrug Resistance-associated Protein, MRP. *Europ. J. Cancer.*, 1996,32A(6), pp. 945-957
107. Loe, D.W., Stewart, R.K., Massey, T.E., Deeley, R.G., Cole, S.P.C.: ATP-dependent transport of aflatoxin B1 and its glutathione conjugates by the product of the MRP gene. *Mol. Pharmacol.*, 1997,51,1034-1041
108. Lorico, A., Rappa, G., Flavell, R.A., Sartorelli, A.C.: Double knockout of the MRP gene leads to increased drug sensitivity in vitro. *Cancer Res.*, 1996,56, pp. 5351-5355
109. Lorico, A., Rappa, G., Finch, R.A., Yang, D., Flavell, R.A., Sartorelli, A.C.: Disruption of the murine MRP (multidrug resistance protein) gene leads to increased sensitivity to etoposide (VP-16) and increased levels of glutathione. *Cancer Res.*, 1997,57, pp. 5238-5242
110. Lucci, A., Han, T., Liu, Y., Giuliano, A.E., Cabot, M.C.: Multidrug resistance modulators and doxorubicin synergize to elevate ceramide levels and elicit apoptosis in drug-resistant cancer cells. *Cancer*, 1999, 86(2), pp. 300-311
111. Ma, L., Krishnamachary, N., Center, M.S.: Phosphorylation of the multidrug resistance associated protein gene encoded protein P190. *Biochemistry*, 1995,34, pp. 3338-3343
112. Manzano, R.G., Wright, K.A., Twentyman, P.R.: Modulation by acrolein and chloroacetaldehyde of multidrug resistance mediated by the multidrug resistance associated protein (MRP). *Clin. Cancer Res.*, 1996,2, pp. 1321-1326
113. Marie, J.P., Zittoun, R., Sikic, B.I.: Multidrug resistance (mdr1) gene expression in adult acute leukemias: correlation with treatment outcome and in vitro drug sensitivity. *Blood*, 1991, 78(3), pp. 586-592
114. Marie, J.P., Bastie, J.N., Coloma, F., Fausat Suberville, A.M., Delmer, A., Rio, B., Delmas-Marsalet, B., Leroux, G., Casassus, P., Baumelou, E., et al.: Cyclosporine A as a modifier agent in the salvage treatment of acute leukemia (ALL). *Leukemia*, 1993,7(6), pp. 821-824
115. Mayer, R., Kartenbeck, J., Buchler, M., Jedlitschky, G., Leier, I., Keppler, D.: Expression of the MRP gene-encoded conjugate export pump in liver and its selective absence from the canalicular membrane in transport-deficient mutant hepatocytes. *J. Cell. Biol.*, 1995,131, pp. 137-150
116. McGrath, T., Center, M.S.: Mechanism of multidrug resistance in HL60 cells: evidence that a surface membrane protein distinct from P-glycoprotein contributes to reduced cellular accumulation of drug. *Cancer Res.*, 1988, 48, pp. 3959-3963
117. McGrath, J.P., Varshavsky, A.: The yeast STE6 gene encodes a homologue of the mammalian multidrug resistant P-glycoprotein. *Nature*, 1989, 340(6232), pp. 400-404
118. Mellado, V., Horwitz, S.B.: Phosphorylation of the multidrug resistance associated glycoprotein. *Biochemistry*, 1987,26, pp. 6900-6904
119. Meyer, D.J.: Significance of an unusually low Km for glutathione in glutathione transferases of the a, m and p classes. *Xenobiotica*, 1993, 23, pp. 823-834
120. Moscow, J.A., Townsend, A.J., Cowan, K.H.: Elevation of pi class glutathione-S-transferase activity in human breast cancer cells by transfection of the GST pi gene and its effect on sensitivity to toxins. *Mol. Pharmacol.*, 1989, 36, pp. 22-28
121. Moscow, J.A., Dixon, K.H.: Glutathione-related enzymes, glutathione and multidrug resistance. *Cytotechnology*, 1993,12, pp. 155-170
122. Muller, M., Meijer, C., Zaman, G.J.R., Borst, P., Scheper, R.J., Mulder, N.H., De Vries, E.G.E., Jansen, P.L.M.: Overexpression of the multidrug resistance associated protein (MRP) gene results in increased ATP-dependent glutathione-S-conjugate transport. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1995,91, pp. 13033-13037
123. Myers, C.E., Minnaugh, E.G., Yeh, G.C., Sinha, D.K.: In Anthracycline and Anthracenedione-Based Anticancer Agents, 1988, ed. Lown, J.W. (Elsevier, New York), pp. 527-569
124. Nooter, K., Bosman, F.T., Burger, H., van Wingerden, K.E., Flens, M.J., Scheper, R.J., Oostrum, R.G., Boersma, A.W.M., van der Gaast, A., Stoter, G.: Expression of multidrug resistance associated protein (MRP) gene in primary non-small-cell lung cancer. *Ann. Oncol.*, 1996,7, pp. 75-81
125. Nooter, K., Brutel de la Riviere, G., Look, M.P., van Wingerden, K.E., Henzen-Logmans, S.C., Scheper, R.J., Flens, M.J., Klijn, J.G.M., Stoter, G., Foekens, J.A.: The prognostic significance of expression of the multidrug resistance-associated protein (MRP) in primary breast cancer. *Br. J. Cancer*, 1997,76(4), pp. 486-493
126. Norris, M.D., Bordow, S.B., Marshall, G.M., Haber, P.S., Cohn, S.L., Haber, M.: Expression of the multidrug resistance associated protein (MRP) and outcome in patients with neuroblastoma. *N. Engl. J. Med.*, 1996,334, pp. 231-238
127. O'Brien, M.L., Tew, K.D.: Glutathione and related enzymes in multidrug resistance. *Europ. J. Cancer*, 1996, 32A(6), pp. 967-978
128. Ota, E., Abe, Y., Oshika, Y., Ozeki, Y., Iwasaki, M., Inoue, H., Yamazaki, H., Ueyama, Y., Takagi, K., Ogata, T., et al.: Expression of the multidrug resistance associated protein (MRP) gene in non-small-cell lung cancer. *Br. J. Cancer*, 1995, 72, pp. 550-554
129. Owellen, R.J., Donigian, D.W., Hartke, C.A., Hains, F.O.: Correlation of biologic data with physico-chemical properties among the vinca alkaloids and their congeners. *Biochem. Pharmacol.*, 1977,26(13), pp. 1213-1219
130. Parham, P.: Antigen presentation. Flying the first class flag. *Nature*, 1992, 357(6375), pp. 193-194
131. Pirker, R., Wallner, J., Geissler, K., Linkesch, W., Haas, O.A., Bettelheim, P., Hopfner, M., Scherrer, R., Valent, P., Havelec, L., et al.: MDR1 gene expression and treatment outcome in acute myeloid leukemia. *J. Natl. Cancer Inst.* 1991, 83(10), pp. 708-712
132. Radkowsky, A.E., Kosower, E.M.: (Haloalkyl)-l,5-diazabicyclo[3.3.0]octadienediones (halo-9,10-dioxabimanes): reactivity towards the tripeptide thiol, glutathione. *J. Am. Chem. Soc.*, 1986,108, pp. 4527-4531

133. Rappa, G., Lorico, A., Flavell, R.A., Sartorelli, A.C.: Evidence that the multidrug resistance protein (MRP) functions as a co-transporter of glutathione and natural products toxins. *Cancer Res.*, 1997, 57, pp. 5232-5237
134. Rappa, G., Finch, R.A., Sartorelli, A.C., Lorico, A.: New insights into the biology and pharmacology of the multidrug resistance protein (MRP) from gene knockout models. *Biochem. Pharmacol.*, 1999, 56, pp. 557-562
135. Raviv, Z., Pollard, H.B., Bruggeman E.P., Pastan, I., Gottesman, M.M.: Photosensitized labeling of a functional multidrug transporter in living drug resistant tumor cells. *J. Bio. Chem.*, 1990, 265, pp. 3975-3980
136. Raymond, M., Rose, E., Housman, D.E., Gros, P.: Physical mapping, amplification and overexpression of the mouse mdr gene family in multidrug-resistant cells. *Mol. Cell Biol.*, 1990, 10, pp. 1646-1651
137. Raymond, M., Gros, P., Whiteway, M., Thomas, D.Y.: Functional complementation of yeast *ste6* by a mammalian multidrug resistance *mdr* gene. *Science*, 1992, 256, pp. 232-234
138. Reed, D.J.: Glutathione: toxicological implications. *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.*, 1990, 30, pp. 603-631
139. Riordan, J.R., Deuchars, K., Kartner, N.: Amplification of P-glycoprotein genes in multidrug resistant mammalian cell lines. *Nature*, 1985, 319, 817
140. Riordan, J.R., Rommens, J.M., Kerem, B., Alon, N., Rozmahel, R., Grzelczak, Z., Zielenski, J., Lok, S., Plavsky, N., Chou, I.L., et al.: Identification of the cystic fibrosis gene: cloning and characterization of complementary DNA. *Science*, 1989, 245(4922), pp. 1066-1073
141. Rischin, D., Ling, V.: Multidrug resistance in leukemia. *Cancer Treat. Res.*, 1993, 64, pp. 269-293
142. Rome, L.H., Kedersha, N.L., Chugani, D.C.: Unlocking vaults: organelles in search of a function. *Trends Cell Biol.*, 1991, 1, pp. 47
143. Ruetz, S., Gros, P.: A mechanism for P-glycoprotein action in multidrug resistance: are we there yet? *TPS*, 1994, 15, pp. 260-263
144. Sakai, M., Okuda, A., Hatayama, I., Sato, K., Nishi, S., Muramatsu, M.: Structure and expression of the rat c-jun messenger RNA: Tissue distribution and increase during chemical hepatocarcinogenesis. *Cancer Res.*, 1989, 49, pp. 5633-5637
145. Salmon, S.E., Dalton, W.S., Grogan, T.M., Plezia, P., Lehnert, M., Roe, D.J., Miller, P.: Multidrug-resistant myeloma: Laboratory and clinical effects of Verapamil as a chemosensitizer. *Blood*, 1991, 78(1), pp. 44-50
146. Sarkadi, B., Muller, M.: Search for specific inhibitors of multidrug resistance in cancer. *Cancer Biol.*, 1997, 8, pp. 171-182
147. Scheffer, G.L., Wijngaard, P.L.J., Flens, M.J., Izquierdo, M.A., Slovak, M.L., Pinedo, H.M., Meijer, C.J.M.L., Clevers, H.C., Scheper, R.J.: The resistance related protein LRP is the human major vault protein. *Nature Med.*, 1995, 1, pp. 578-582
148. Scheffer, R.J., Broxterman, H.J., Scheffer, G.L., Kaaijk, P., Dalton, W.S., van Heijningen, T.H.M., van Kalken, C.K., Slovak, M.L., de Vries, E.G.E., van der Valk, P., Meijer, C.J.M.L., Pinedo, H.M.: Overexpression of a Mr 110,000 vesicular protein in non-P-glycoprotein-mediated multidrug resistance. *Cancer Res.*, 1993, 53, pp. 1475-1479
149. Schinkel, A.H., Roelofs, M.E.M., Borst, P.: Characterization of the human MDR3 P-glycoprotein and its recognition by P-glycoprotein-specific monoclonal antibodies. *Cancer Res.*, 1991, 51, pp. 2628-2635
150. Schuurhuis, G.J., Broxterman, H.J., Ossenkoppele, G.J., Baak, J.P.A., Eekman, C.A., Kuiper, C.M., Feller, N., Heijningen, T.H.M., Klumper, E., Pieters, R., Lankelma, J., Pinedo, H.M.: Functional multidrug resistance phenotype associated with combined overexpression of Pgp/MDR1 and MRP together with l-b-D-arabinofuranosyl sensitivity may predict clinical response in acute myeloid leukemia. *Clin. Cancer Res.*, 1995, 1, pp. 81-93
151. Schurr, E., Raymond, M., Bell, J.C., Gros, P.: Characterization of the multidrug resistance protein expressed in cell clones stably transfected with the mouse *mdr1* cDNA. *Cancer Res.*, 1989, 49(10), pp. 2729-2733
152. Seebor, S., Asieka, R., Schmidt, C.G., Achterath, W., Crooke, G.T.: In vitro resistance towards anthracyclines, etoposide and cis-diaminedichloro platinum. *Cancer Res.*, 1982, 42, 4719
153. Sehested, M., Skovsgaard, T., van Deurs, B., Winther-Nielsen H.: Increased plasma membrane traffic in daunorubicin resistant P388 leukaemic cells. Effect of daunorubicin and verapamil. *Br. J. Cancer*, 1987, 56(6), pp. 747-751
154. Simon, S., Roy, D., Schindler, M.: Intracellular pH and the control of multidrug resistance. *Proc. Natl. Acad. Sci USA*, 1994, 91(3) pp. 1128-1132
155. Simon, S.M., Schindler, M.: Cell biological mechanisms of multidrug resistance in tumors. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1994, 91, pp. 3497-3504
156. Skovsgaard, T.: Transport and binding of daunorubicin, adriamycin and rubidazole in Ehrlich ascites tumour cells. *Biochem. Pharmacol.*, 1977, 26(3), pp. 215-222
157. Skovsgaard, T., Nielsen, D., Maere, Ch., Wassermann, K.: Cellular resistance to cancer chemotherapy. *Int. Rev. Cytol.*, 1994, 156, pp. 77-157
158. Slovak, M.L., Peley Ho, J., Cole, S.P.C., Deeley, R.G., de Vries, E.G.E., Broxterman, H.J., Scheffer, G.L., Scheper, R.J.: The LRP gene encoding a major vault protein associated with drug resistance maps proximal to MRP on chromosome 16: Evidence that chromosome breakage plays a key role in MRP or LRP gene amplification. *Cancer Res.*, 1995, 55, pp. 4214-4119
- 4*59. Smit, J.J., Schinkel, A.H., Oude Elferink, R.P., Groen, A.K., Wagenaar, E., van Deemter, L., Mol, C.A., Ottenhoff, R., van der Lugt, N.M., van Roon M.A., et al.: Homozygous disruption of the murine *mdr1* P-glycoprotein gene leads to a complete absence of phospholipid from bile and to liver disease. *Cell*, 1993, 75(3), pp. 451-462
160. Srivastava, S.K., Singhal, S.S., Hu, X., Awasthi, Y.C., Zimniak, P., Singh, S.V.: Differential catalytic efficiency of allelic variants of human glutathione-S-transferase Pi in catalyzing the glutathione conjugation of thiopepa. *Arch. Biochem. Biophys.*, 1999, 366(1), pp. 89-94
161. Staat, J., Marquardt, D., Center, M.S.: Characterization of a membrane associated protein kinase of multidrug-resistant HL60 cells which phosphorylates P-glycoprotein. *J. Biol. Chem.*, 1990, 265, pp. 4084-4090
162. Stride, B.D., Grant, C.E., Loe, D.W., Hipfner, D.R., Cole, S.P.C., Deeley, R.G.: Pharmacological characterization of the murine and human orthologs of multidrug resistance protein in transfected human embryonic kidney cells. *Mol. Pharmacol.*, 1997, 52, pp. 344-353
163. Sugawara, I., Kataoka, I., Morishita, Y., Hamada, H., Tsuruo, T., Itoyama, S., Mori, S.: Tissue distribution of P-glycoprotein encoded by a multidrug-resistant gene as revealed by a monoclonal antibody, MRK 16. *Cancer Res.*, 1988, 48, pp. 1926-1929
164. Sugawara, I., Arai, T., Yamashita, T., Yoshida, A., Masunaga, A., Itoyama, S.: Expression of multidrug resistance associated protein (MRP) on anaplastic carcinoma of the thyroid. *Cancer Lett.*, 1994, 82(2), pp. 185-188
165. Taguchi, Y., Yoshida, A., Takada, Y., Komano, T., Ueda, K.: Anti-cancer drugs and glutathione stimulate vanadate-induced trapping of nucleotide in multidrug resistance-associated protein (MRP). *FEBS Lett.*, 1997, 401, pp. 11-14
166. Tanaka, T., Uchiyama, T., Kohno, K., Tomonari, A., Nishio, K., Saijo, N., Kondo, T., Kuwano, M.: Glutathione homeostasis in human hepatic cells: overexpression of g-glutamylcysteine synthetase gene in cell lines resistant to buthionine sulfoximine, an inhibitor of glutathione synthesis. *Biochem. Biophys. Research Comm.*, 1998, 246, pp. 398-403
167. Tanner, B., Hengstler, J.G., Dietrich, B., Henrich, M., Steinberg, P., Weikel, W., Meinert, R., Kaina, B., Oesch, F., Knapstein, P.G.: Glutathione, glutathione-S-transferase a and p, and aldehyde dehydrogenase content in relationship to drug resistance in ovarian cancer. *Gynecol. Oncol.*, 1997, 65, pp. 54-62
168. Taubert, H., Meye, A., Wurl, P.: Prognosis is associated with p53 mutation type for soft tissue sarcoma patients. *Cancer Res.*, 1996, 56, pp. 4134-4136
169. Tew, K.D., Monks, A., Barone, L., et al.: Glutathione associated enzymes in the human cell lines of the National Cancer Institute drug screening program. *Mol. Pharmacol.*, 1996, 50(1), pp. 149-159
170. Thiebaut, F., Currier, S.J., Whitaker, J., Haugland, R.P., Gottesman, M.M., Pastan, I., Willingham, M.C.: Activity of the multidrug transporter results in alkalinization of the cytosol: measurement of cytosolic pH by microinjection of pH-sensitive dye. *J. Histochem. Cytochem.*, 1990, 38(5), pp. 685-690
171. Toffoli, G., Frustaci, S., Tumiotto, L., Talamini, R., Gherlinzoni, F., Picci, P., Boiocchi, G.: Expression of MDR1 and GST-p in human soft tissues sarcomas: relation to drug resistance and biological aggressiveness. *Ann. Oncol.*, 1992, 3, pp. 63-69
172. Trezise, A.E.O., Romano, P.R., Gill, D.R., Hyde, S.C., Sepulveda, F.V., Buchwald, M., Higgins, C.F.: The multidrug resistance and cystic fibrosis genes have complementary patterns of epithelial expression. *EMBO J.*, 1992, 11(12), pp. 4291-4303
173. Tuszynski, G.E., Bakos, E., Vradi, A., Sarkadi, B.: Membrane topology distinguishes a subfamily of the ATP-binding cassette (ABC) transporters. *FEBS Lett.*, 1997, 402, pp. 1-3
174. Valverde, M.A., Diaz, M., Sepulveda, F.V., Gill, D.R., Hyde, S.C., Higgins, C.F.: Volume-regulated chloride channels associated with the human multidrug-resistance P-glycoprotein. *Nature*, 1992, 355(6363), pp. 830-833
175. van Adelsberg, J., Al-Awqati, Q.: Regulation of cell pH Ca²⁺-mediated exocytotic insertion of H⁺-ATPases. *J. Cell Biol.*, 1986, 102(5), pp. 1638-1645
176. van der Bleeck, A.M., Baas, F., de Lange, T.T.H., Koiman, P.M., Van der Veld-Koerts, T., Borst, P.: The human MDR3 gene encodes a novel P-glycoprotein homologue and gives rise to alternatively spliced mRNAs in liver. *EMBO J.*, 1987, 11, pp. 3325-3331
177. van Helvoort, A., Smith, A.J., Sprang, H., Fritzsche, I., Schinkel, A.H., Borst, P., van Meer, G.: MDR1 P-glycoprotein is a lipid translocator of broad specificity, while MDR3 P-glycoprotein specifically translocates phosphatidylcholine. *Cell*, 1996, 87(3), pp. 507-517
178. Vanhoef, U., Cao, S., Minderman, H., Toth, K., Skenderis, B.S., Slovak, M.L., Rastum, Y.M.: D,L-Buthionine-(S,R)-sulfoximine potentiates *in vivo* the therapeutic efficacy of doxorubicin against multidrug resistance protein-expressing tumours. *Clin. Cancer Res.*, 1996, 2, pp. 1961-1968
179. van Veen, H.W., Konings, W.N.: Multidrug transporters from bacteria to man: similarities in structure and function. *Semin. Cancer Biol.*, 1997, 8, pp. 183-191
180. Versantvoort, C.H.M., Broxterman, H.J., Bagrij, T., Scheper, R.J., Twentyman, P.R.: Regulation by glutathione of drug transport in multidrug resistant human lung tumour cell lines overexpressing MRP. *Br. J. Cancer*, 1995, 72, pp. 82-89
181. Waldman, T., Lengauer, C., Bunz, F., Kinzler, K., Vogelstein, B.: The role of p21 in cell cycle control and drug sensitivity. *Cell Cycle Therapeutics: The Conference held in November 6-7, 1997, Washington, D.C., USA. Book of abstracts. Published by International Business Communications (225 Turnpike Road, Southborough, MA 01772-1749, USA)*
182. Weaver, J.L., Pine, P.S., Aszalos, A., Schoenlein, P.V., Currier, S.J., Padmanabhan, R., Gottesman, M.M.: Laser scanning and confocal microscopy of daunorubicin, doxorubicin and rhodamine 123 in multidrug-resistant cells. *Exp. Cell Res.*, 1991, 196(2), pp. 323-329
183. Wigler, P.W.: PSC833, Cyclosporine A, and Dexamethasone Effects on Cellular Calcine Retention and Inhibition of the Multidrug Resistance Pump in Human Leukemic Lymphoblasts. *Biochem. and Biophys. Res. Comm.*, 1999, 257, pp. 410-413
184. Wijnholds, J., Evers, R., van Leusden, M.R., Mol, C.A., Zaman, G.J., Mayer, U., Beijnen, J.H., van der Valk, M., Krimpenfort, P., Borst, P.: Increased sensitivity to anticancer drugs and decreased inflammatory response in mice lacking the multidrug resistance associated protein. *Nat. Med.*, 1997, 3, pp. 1275-1279
185. Wilson, W.H., Bryant, G., Bates, S., Fojo, A., Wittes, R.E., Steinberg, S.M., Kohler, D.R., Jaffe, E.S., Herdt, J., Cheson, B.D., et al.: EPOCH chemotherapy: toxicity and efficacy in relapsed and refractory non-Hodgkin's lymphoma. *J. Clin. Oncol.*, 1993, 11(8), pp. 1573-1582
186. Wu, C.-T., Budding, M., Griffin, M., Croop, J.: Isolation and characterization of *Drosophila* multidrug resistance gene homologues. *Mol. Cell Bio.*, 1991, 11, pp. 3940-3948
187. Zaman, G.J.R., Flens, M.J., Leusden, M.R., van Haas, M.D., Mulder, H.S., Lankelma, J., Pinedo, H.M., Scheper, R.J., Baas, F., Broxterman, H.J., Borst, P.: The human multidrug resistance associated protein MRP1 is a plasma membrane drug-efflux pump. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1994, 91, pp. 8822-8826

METODIKY TESTOVÁNÍ CHEMOSENSITIVITY/CHEMOREZISTENCE NÁDORŮ *IN VITRO* METHODS FOR THE EVALUATION OF HUMAN TUMOR DRUG RESISTANCE *IN VITRO*

JITKA CHUMCHALOVÁ¹, JAN KOVAŘÍK²

BIOLOGICKÝ ÚSTAV LF MÚ, BRNO¹, ODDĚLENÍ BUNĚČNÉ A MOLEKULÁRNÍ ONKOLOGIE MASARYKOVA ONKOLOGICKÉHO ÚSTAVU, BRNO²

Korespondující autor: Jitka Chumchalová, Oddělení buněčné a molekulární onkologie Masarykova onkologického ústavu, Zlутý kopec 7, Brno 656 53, telefon: 05-43133302, e-mail: jchumch@med.muni.cz

Souhrn: Chemoterapie zhoubných nádorů představuje jednu ze základních modalit léčby lidských neoplasií. Ve většině případů je však volba farmak, jejich kombinace a dávkovací schémata, založena na empirických zkušenostech a výsledcích bezpočtu multicentrických studií, aniž by byla respektována biologická individualita nádoru a jeho nositele. Ukazuje se, že zlepšení léčebných výsledků, ale i snížení nežádoucích účinků chemoterapie, může přinést individualizovaná léčba prováděná na základě *in vitro* predikce rezistence, resp. citlivosti daného nádoru na spektrum cytostatik. V práci autoři podávají přehled a charakteristiku *in vitro* metodik, které jsou využívány pro výběr chemoterapeutik s předpokládaným terapeutickým efektem *in vivo* a které umožňují vyřadit léky na něž je daný nádor rezistentní. Práce rovněž analyzuje četné metodické a interpretační problémy *in vitro* predikce protinádorové účinnosti cytostatik, zejména v souvislosti s klinickou validitou testů.

Klíčová slova: Testy chemorezistence/chemosensitivit *in vitro*, klonovací metoda, MTT, histokultury

Summary: Cancer continues to cause significant mortality and the use of standard cytotoxic chemotherapy has reached a therapeutical plateau. Currently, the process of selecting chemotherapy is a source of trial and error neglecting biological individuality of each tumor and its bearer. The improvement of treatment results is expected from *ex vivo* drug sensitivity testing which may allow to choose the most effective drugs for individual patient and to exclude agents to which the tumor cells exert resistance. The paper reviews current methods used to test index *in vitro* conditions the sensitivity of tumors to a panel of anticancer agents. It also does a bit of thinking on some limitations and drawbacks of each technique. Special attention is paid to the clinical relevance of the individualized cancer therapy based on *in vitro* drug selection.

Key words: Chemoresistance/chemosensitivity assays *in vitro*, clonogenic assay, MTT, histocultures

Úvod

Protinádorová chemoterapie prodělala v minulých desetiletích boulivý rozvoj. Původně byla pouze doplňkovou léčbou, ale postupně nabývala významu standardní léčebné metody a stala se rovnocennou léčbě chirurgické a radioterapii. Prvotní období skepse bylo vystřídáno nadšením a nekritickým přeceňováním možností chemoterapie. Dnešní pohled na problematiku chemoterapie už není tak nekritický. Statistika posledních 20 let ukazuje, že chemoterapie dosáhla určitého maxima a nová cytostatika neovlivňují zásadním způsobem přežití nemocných s nejfrekventovanějšími nádory. Dnes je zřejmé, že účinnost chemoterapie je ovlivňovaná řadou faktorů, které sehraji významnou úlohu v léčebné strategii a spolurozhodují o výsledku léčby. Máme na mysli zejména histologický typ nádoru, stupeň pokročilosti onemocnění, vaskularizaci nádorového ložiska, klonální heterogenitu maligní populace, primární či sekundární (indukovanou) chemorezistenci a konečně celkový stav nemocného. Jelikož účinek cytostatik není přísně specifický pro nádorové buňky, ale působí více či méně toxicky i na normální buňky, jsou vedlejší účinky řady cytostatik dalším limitujícím faktorem chemoterapie a ve svých důsledcích mohou vést i k závažnému poškození nemocného. Současná onkologická chemoterapie je založena převážně na empirických zkušenostech a generalizaci výsledků rozsáhlých klinických studií, aniž by respektovala individualitu nemocného a biologickou odlišnost každého nádoru. Je více než pravděpodobné, že respektování faktorů individuality a možnosti jejich posouzení může do značné míry optimalizovat výběr protinádorových farmak, jejich dávky což ve svých důsledcích příznivě ovlivní terapeutický efekt a sníží riziko nežádoucích účinků. Jedním z přístupů individualizované chemoterapie je výběr cytostatik s maximální účinností pro daný nádor a současně eliminace těch, na něž je nádor vysoce rezistentní, na základě hodnocení chemosensitivity/chemorezistence nádorové populace v *in vitro* podmínkách. V našem sdělení bychom rádi seznámili čtenáře s metodikami *in vitro* testů citlivosti nádorové populace na cytostatika a s některými metodickými a interpretačními problémy se zaměřením na „solidní“ malignity.

První testování chemosensitivit/chemorezistence *in vitro* se datují do období přelomu 50. a 60. let, kdy badatelé Black a Speer (1) popsali hodnocení citlivosti nádorů v *in vitro* podmínkách jako nový, vhodný přístup pro výběr neúčinnějších cytostatik pro individuálního nemocného. Jejich práce však nedoznala většího zájmu, ani klinického využití. V průběhu 80. let dochází, zejména v USA a Japonsku, k renezanzi prediktivní individualizované léčby onkologických pacien-

tů. Průlomem v testování chemosensitivit nádorů byla metoda HTCA (Human Tumor Colony Assay), kterou vyvinul Salmon a Hamburger v roce 1977 (2) a která, přestože má mnoho nevýhod, je dodnes používána. Následoval rozvoj dalších technik, hodnotících krátkodobé poškození buněk. Je třeba zmínit, že až na malé výjimky se *in vitro* hodnocení chemosensitivit/chemorezistence koncentruje do soukromých zdravotnických zařízení a že renomovaná onkologická pracoviště mají zatím k této metodice velmi opatrný, často i kritický přístup. Teoretickou bází *in vitro* hodnocení lékové rezistence je představa, že farmakum vysoce účinné proti danému nádoru *in vitro* bude efektivní i v klinické aplikaci. Na druhé straně nelze s jistotou prokázat či dokladovat, že vynechání cytostatik na něž je daný nádor v podmínkách *in vitro* rezistentní, neovlivní negativně *in vivo* léčebnou odpověď. Dnes spíše převládá názor, že tyto metody určí poměrně spolehlivě cytostatika na něž je daný nádor rezistentní, ale určení citlivosti je méně spolehlivé.

Metody testování *in vitro* jsou založeny na dvou odlišných principech, které hodnotí různě stupeň poškození nádorových buněk. Jejich přehled, výhody a nevýhody jsou shrnuty v tabulce číslo 1.

Klonovací metoda

Klonovací metoda je založena na schopnosti nádorových buněk růst na agarovém semisolidním médiu ve formě kolonií. Příkladem je již zmíněný HTCA test, který vypracoval a popsal Salmon a Hamburger (2) a který je v různých modifikacích využíván dodnes (3-6). Metodika je založena na schopnosti nádorových buněk růst na agaru ve formě kolonií, zatímco normální buňky jsou v růstu inhibovány. Buněčné poškození po kontaktu s cytostatikem je hodnoceno srovnáním počtu kolonií v kulturách ovlivněných a kontrolních. Zastánci této metodiky jako její přednost uvádějí eliminaci normálních buněk ve vzorku i když lze polemizovat o reprezentativnosti selektované populace vzhledem k podmínkám *in vivo*. Shimoyama a spol. udávají, že výběr účinných cytostatik na základě klonovacího testu dobře koreluje s jejich terapeutickým efektem na modelových myších nádorech (7). Limitací této techniky, která brání širšímu klinickému využití a může být zdrojem interpretačních omylů, je potřeba velkého počtu izolovaných nádorových elementů, z nichž jen malé procento má schopnost růst v agarovém médiu. Některé práce dokonce uvádějí, že schopnost adaptace na růst v agarovém médiu má pouze méně jak 1% maligních buněk, což negativně ovlivňuje výtěžnost testu a možnost přesné interpretace. Z hlediska známé genotypové i fenotypové heterogenity nádorové populace *in vivo*, jsou závěry klonovacího testu výsledkem odpo-

Tab.1

Metoda	Výhoda	Nevýhoda
Klonovací metoda	Dobrá korelace s klinickými výsledky.	Dlouhá doba provedení testu. Potřeba velkého množství buněk. Malé procento hodnotitelných vzorků. Nelze hodnotit buňky v G ₀ fázi. Nelze hodnotit velký počet cytostatik. Chyby při odečítáním počtu kolonií.
Metody hodnotící metabolismus buněk	Rychlá metoda. Velké procento hodnotitelných vzorků. Potřeba malého množství buněk. Lze hodnotit velký počet cytostatik. Možnost testování buněk v G ₀ fázi. Dobrá korelace s klinikou.	Přítomnost normálních buněk může ovlivnit výsledek testu.
Histokultury	Lepší simulace podmínek <i>in vivo</i> . Možnost histologického hodnocení změn nádoru po kontaktu s cytostatiky. Nádor má přirozenou architekturu a proliferační aktivitu velmi blízkou <i>in vivo</i> podmínkám.	

vědí pouze malého počtu selektovaných buněk, které jsou schopné růst v agarovém médiu. Navíc v daném provedení test není schopen postihnout odpověď buněk v G₀ fázi, které jsou, byť v malém procentu vždy přítomny v *in vivo* nádorové tkáni a následně i v explantované populaci. Vedle poměrně dlouhé doby k provedení testu, může být zdrojem falešně pozitivních výsledků obtížné rozlišení náhodných shluků často mrtvých buněk od pravých kolonií.

Jak upozorňuje Pavlík kol. (8), zdrojem interpretačních chyb mohou být i buňky, které v důsledku transferu do ne zcela fyziologických *in vitro* podmínek přestanou proliferovat, zůstávají však metabolicky aktivní a teprve po adaptační fázi s poměrně dlouhou dobou latence vstupují do buněčného cyklu a jsou schopny růst v koloniích. Literatura uvádí, že část výše uvedených problémů může být eliminována kombinací více metodologických přístupů, ať již hodnocením metabolické aktivity explantovaných buněk nebo stanovením DNA syntézy v buněčných koloniích pomocí inkorporace ³H značeného thymidinu jako markerů replikační aktivity (9-11).

Studie, které se zabývaly korelací s klinickým účinkem uvádí prediktivní hodnotu této metody kolem 80%, s poměrně vysokým procentem (30-48%) neúspěšných kultivací. Autoři Shimoyama a spol. (7) srovnávali klonovací metodu s MTT testem na nádo-rech žaludku, prsu, střeva a plic se 3 cytostatiky, a výsledky obou metod porovnávali s testy *in vivo* na myších. Podle těchto výsledků klonovací metoda měla 90% předpovědní hodnotu a MTT 86,7%. Autoři uvádějí, že lepší výsledky jsou dosaženy kombinací obou metod.

Neklonovací metody

Další skupina metod je založena na stanovení proporce živých a mrtvých buněk. Většina přístupů hodnotí změny v buněčném metabolismu a membránové integritě, které jsou reflexí buněčného poškození po kontaktu s cytostatiky. Jejich společnou předností je poměrně vysoké procento hodnotitelných vzorků, postižení buněk v G₀ fázi a možnost v poměrně krátkém časovém intervalu a za standardních podmínek posoudit účinnost většího počtu protinádorových chemoterapeutik. Diskutovaným problémem těchto testů je možná závislost výsledků na příměsi nenádorových buněk, tedy zda a do jaké míry může proporCIONALITA normálních versus maligních elementů ovlivnit výsledek testu a jeho interpretaci. Součástí explantované monocelulární suspenze připravené z nádorové biopsie jsou i normální diploidní buňky o nichž je známo, že mají *in vitro* růstovou preferenci ve srovnání s buňkami maligními a že v primokultuře jsou stejně, ne-li více vnímavé na poškození farmaky. Na základě uvedeného nelze vyloučit, že stupeň kontaminace maligní populace buňkami normálními může ovlivnit výsledek testu. Vyjdeme-li však ze situace *in vivo*, kde mezibuněčné kanály a buněčné interakce bezesporu spolurozhodují o biologickém chování nádoru, potom lze připustit, že *in vitro* maligní populace s přirozeným zastoupením normálních buněk, je relativně vhodným modelem blízkým situaci *in vivo*. Obecně se jedná o problém, který dosud čeká na své objasnění.

Testy membránové integrity

První testy hodnotící buněčné poškození byly založeny na sledování membránové integrity buněk. Můžeme je rozdělit na testy vitální a supravitální. Vitální testy jsou založeny na aktivním přijímání barviva živou buňkou přes neporušenou plasmatickou membránu, zatímco mrtvé buňky zůstávají neobarvené. Nejpoužívanějším barvivem pro vitální testy je neutrální červeně. Opakem jsou supravitální testy, kdy přes porušenou plasmatickou membránu mrtvých buněk proniká barvivo do intracelulárního prostoru a živé buňky zůstávají neobarvené. Jako barvivo se využívá např. trypanová modř a methylenová zeleň.

Možnost rozlišit živé buňky od mrtvých je založena na kombinaci ovlivnění membránové integrity a některé z metabolických cest. Příkladem tohoto přístupu je metoda zavedená Pavlíkem (8), v níž viabilní buňky jsou určovány podle aktivity esteráz a jejich schopnosti přeměnit bezbarvý fluorescein diacetát na zelený fluorescein. Mrtvé buňky jsou rozlišeny podle jejich schopnosti přijímat propidium iodid porušenou plasmatickou membránou. Pod mikroskopem se hodnotí proporce živých tj. zeleně a mrtvých tj. červeně zbarvených buněk.

MTT test

Nejrozšířenější metodou testování *in vitro* chemosenzitivity/chemorezistence je tetrazoliový test (MTT test) popsán v roce 1983 Mosmannem (12). Rozlišení živých a mrtvých buněk je založeno na schopnosti živých buněk redukovat žlutou, rozpustnou tetrazoliovou sůl MTT (3-4,5-dimethylazol-2-yl)-2,5-diphenyl tetrazolium) mitochondriálním enzymem sukcinát-dehydrogenázou na nerozpustný modrý formazan (13). Formazan je pak rozpuštěn dimethyl sulfoxidem (DMSO), případně jiným organickým rozpouštědlem. Absorbance barevného produktu je měřena fotometricky při 570 nm a výsledky jsou srovnávány s hodnotami identických kontrolních kultur neovlivněných cytostatiky.

Japonští autoři Kubota a spol. (14-16) použili tuto metodu pro stanovení citlivosti nádorů žaludku, střeva, sliziny, prsu, jícnu a lymfomů na panel cytostatik MMC, 5-FU, ADM a DDP. Studie uvádí 90% hodnotitelných nádorů, u nichž *in vitro* výsledky byly podkladem pro výběr cytostatik pro daného nemocného. Korelace s klinickým efektem byla okolo 83-86%. Za hlavní přednost testu *in vitro* považují autoři možnost poměrně přesně detekovat stupeň rezistence na některou ze zkoušených látek a následně vyřazení neúčinných terapeutik z léčebného protokolu. Podobně příznivé hodnocení MTT testu pro volbu účinných cytostatik uvádí Yamaguche a spol. u kolorektálních karcinomů (17). Cole (18) využil tuto metodu pro stanovení chemosenzitivity/chemorezistence u nádorů plic. Práce akcentuje její význam v určování mnohočetné lékové rezistence a tím eliminace neúčinné, pacienta zatěžující terapie.

Carmichael a spol. (19) srovnávali MTT test s klonovací metodou. Autoři uvádějí, že MTT test detekuje ve větším procentu počet rezistentních kultur k hodnoceným cytostatikům ve srovnání s klonovací metodou.

Na základě dosud publikovaných prací lze charakterizovat MTT test jako jednoduchou, rychlou a relativně standardní metodiku

pro predikci chemorezistence, respektive chemosensitivity nádorů v podmínkách *in vitro*. Jako každá metodika má však i MTT test některé limitace jejichž příkladem je nemožnost rozlišit cytostatický od cytotoxického účinku a již zmíněné riziko ovlivnění výsledku přítomností vysokého procenta normálních buněk v kultuře. Problémem, který může ovlivnit spolehlivost výsledků je schopnost některých chemoterapeutik redukovat MTT. Tento faktor však může být eliminován vyšetřením kontrolním testem MTT testem bez buněk.

ATP test

Byl popsán Sevinem v roce 1993 (20). Metoda je založena na kvantitativním měření ATP bioluminiscence s luciferázou-luciferinem. ATP je pro živé buňky primárním zdrojem energie a po smrti buňky je rychle hydrolyzován. Z buněk je extrahováno ATP a po přidání komplexu luciferázy-luciferinu je za přítomnosti ATP emitováno záření jehož intenzita je měřena luminometrem. Bioluminiscence může hodnotit cytostatický i cytotoxický efekt různých látek.

Metoda byla použita pro hodnocení lékové rezistence v kulturách ovariálního karcinomu (5,21). Hodnotitelných bylo 93 % explantátů.

Histokultury

Výše uvedené metody byly prováděny v dvourozměrném uspořádání a tedy v podmínkách značně odlišných od situace *in vivo*. Pozornost se zaměřuje na *in vitro* hodnocení lékové rezistence v trojrozměrných kulturách s využitím různých substrátů, které imitují extracelulární matrix. Z kultivačního hlediska se zdaleka nejedná o novou metodologii. Trojrozměrná kultivace a pojem histokultura se objevuje již na počátku století, kdy Carrel (22) popsal kultivaci fragmentu srdce 18 dní starého kuřete s dlouhodobou proliferací i plně funkční aktivitou.

V 50. letech Leighton (23) zdokonalil Carrelovy histokultury použitím jemně porézních celulóзовých houbiček jako substrátu pro explantované fragmenty tkáně. Tato technika umožňuje udržovat kulturu v její přirozené architektuře a proliferaci aktivitě velmi blízké fyziologickým podmínkám.

Předností kultivace fragmentů tkáně na podpůrné matrix je nižší uplatnění stresových faktorů, kterým jsou buňky vystaveny v případě klasické buněčné explantace. Důsledkem těchto stresových faktorů, jejichž příkladem může být proteolytická dezintegrace buněk nebo eliminace fyziologických buněčných interakcí, je změna buněčné kinetiky (např. změněné parametry času zdvojení či změny v poměru cyklujících versus necyklujících buněk).

Nespornou výhodou fragmentových trojrozměrných kultur pro studium lékové rezistence je možnost jejího histologického zpracování a hodnocení jemných morfoloických změn buněčného poškození pomocí spektra moderních imunohistochemických a molekulárně biologických metodik. V současné době se jako optimální matrix pro trojrozměrné fragmentové primokultury využívají želatinové houbičky (The Upjohn Comp., Kalamazoo, MI, 49001, USA). Podobně jako u monocelulárních kultur se i v histokulturách pro finální hodnocení efektu cytostatik využívá převážně MTT test.

Jiným přístupem je autoradiografická analýza syntézy DNA (6, 24). Z publikovaných prací považujeme za významné studie Furukawu a spol. (14,25), které prokazují 90% shodu rezistence *in vitro* a *in vivo*, ale pouze 67% shodu v citlivosti. Autoři považují tyto testy za spolehlivé pro vyřazení málo účinných nebo neúčinných cytostatik, avšak bez prediktivní hodnoty stupně citlivosti *in vivo*. Podobné výsledky dokumentuje práce autorů Robins a spol. na nádorech hlavy a krku (26).

Je zajímavé, ale z hlediska biologické dostupnosti testovaných cytostatik i pochopitelné, že histokultury vykazují vyšší stupeň rezistence ve srovnání s kulturami jednovrstevnými nebo suspenzními v nichž cytostatika se dostanou do kontaktu s „nahou“ buňkou. V této souvislosti Miller a spol. (27, 28) v testech rezistence na melphalan uvádí až 1000x vyšší rezistenci histokultury ve srovnání s rezistencí jednovrstevné kultury. Upozorňuje, že různé metodické přístupy nejsou srovnatelné a že tkáňová architektura a „buněčný mikroenvironment“ se významně podílejí na výsledcích testů.

Svůj dlouhodobý vývoj prodělala i kultivační média. Teprve v posledním desetiletí jsou k dispozici média, která s komplementací růstovými faktory zajišťují podmínky blízké podmínkám *in vivo*.

Některé problémy *in vitro* prediktivní chemoterapie

Jednou z oprávněných kritik modelu *in vitro* pro volbu individualizované protinádorové léčby je sporná reprezentativnost k reálným poměrům *in vivo*. V této souvislosti se nabízí několik diskutovatelných otázek. Samotný proces přípravy monocelulární suspenze z nádorové tkáně a přenos buněk či tkáňových fragmentů do ne zcela fyziologického prostředí, představuje stresovou situaci, které může výrazně ovlivnit buněčnou kinetiku, metabolickou aktivitu a poměr cyklujících a necyklujících elementů. Uvážíme-li, že v testech lékové rezistence se hodnotí efekt farmaka po krátkodobé 24 až 48 hodinové expozici a že řada z těchto látek je fázově specifická, nelze vyloučit, že výsledek bude ovlivněn počtem cyklujících buněk, které v době kontaktu s cytostatikem projdou fází buněčného cyklu v níž jeho aktivita dominuje. Diskutovanou otázkou je optimální interval pro přidávání farmak po přenesení buněk do *in vitro* podmínek. Jak bezprostřední expozice po explantaci, tak i expozice po kratší či delší adaptační fázi buněk mají svá pro i proti. Zastánci provedení testu co nejdříve po založení primokultury argumentují zachováním profilu buněk, který je relativně blízký situaci *in vivo*, kritici uvádí, že výsledky jsou ovlivněny nefyziologickou manipulací buněk a arteficiálním médiem. Svá pozitivní a negativní mají přístupy v nichž populace buněk přijde do kontaktu s cytostatikem až po několikadenní adaptaci na podmínky *in vitro*. Na jedné straně jsou minimalizovány aktuální stresové faktory, na straně druhé však, čím delší kultivace *in vitro*, tím větší riziko, že do kontaktu s cytostatikem přichází selektovaná, tj. neadaptabilnější populace buněk, genotypově i fenotypově značně odlišná od původního nádoru.

Dalším, neméně závažným problémem je volba koncentrací testovaných látek. V žádném případě nelze ani aproximativně přepočítávat dávky pro *in vitro* testy z dávek, které se využívají terapeuticky. U *in vitro* systému není biologická dostupnost léku ovlivňovaná vazbou na plasmatické bílkoviny, degradačními, či aktivizačními procesy, biologickým poločasem ani vaskularizací cílových struktur. Chemoterapeutikum zde působí na „nahou“ buňku v koncentraci téměř identické s koncentrací přidanou do kultury. Obecně platí, že čím více koncentrací v rozsahu ED_{0-100} (effective dose) je použito, tím větší možnost přesnější interpretace výsledků.

Orientačním zdrojem pro výběr vhodných koncentrací mohou být křivky závislosti účinků na dávce v modelových buněčných liniích. K diskutovaným problémům *in vitro* prediktivní terapie patří již zmíněné možné ovlivnění výsledků jejich nadměrnou kontaminací normálních diploidních elementů. Tato kontaminace není kritická pro klonovací metody, ale u neklonovacích metod může hrát určitou roli. Zásadní informací o tom, zda pracujeme převážně s maligní populací buněk a do jaké míry je tato kultura kontaminována normálními buňkami, nám může podat imunocytochemická analýza.

Na základě našich zkušeností je zřejmé, že závěry o chemosensitivitě/chemorezistenci nádorů z pouhého počtu živých a mrtvých buněk *in vitro* jsou jen hrubým odhadem účinnosti léčiva, aniž by braly v úvahu jemnější buněčné změny. Současné poznatky o mechanismu účinku, rezistenci a reparačních procesech představují možnost lépe charakterizovat stupeň buněčného poškození a rezistence. Přínosem je hodnocení aktivity MDR genů, cyclinu D₁, telomerázy, hladiny onkoproteinu p53 a apoptózy, která je považována za „end point“ účinku většiny protinádorových chemoterapeutik.

I přes řadu uvedených problémů lze souhlasit s příznivci hodnocení lékové rezistence *in vitro* v tom, že přináší informace, které mohou být nápomocné ve volbě protinádorových chemoterapeutik pro individuálního pacienta a že efektivní cytostatikum v *in vitro* testu bude s několikanásobně vyšší pravděpodobností účinnější i *in vivo* než cytostatikum bez účinnosti v *in vitro* podmínkách. Je třeba akceptovat i kritické názory, které pro posouzení klinické validity tohoto vyšetření vyžadují prospektivní randomizované klinické studie v nichž by bylo možné srovnat standardní terapii s volbou léčby na základě *in vitro* testů.

Podrobnější informace je možné získat na pracovištích autorů, jejichž příspěvky jsou publikovány v tomto zvláštním čísle a na klinice nemocí plicní a tuberkulózy FN Plzeň. Ve Slovenské republice je metodika hodnocení lékové rezistence nádorů *in vitro* zaváděna a využívána v Ústavu farmakologie LF UPJŠ v Košicích.

Literatura

- Black, M. M. and Speer, F. D. Further observations on the effects of cancer chemotherapeutic agents on the *in vitro* dehydrogenase activity of cancer tissue., *J Natl Cancer Inst.* 14: 1147-1158, 1954.
- Hamburger, A. W. and Salmon, S. E. Primary bioassay of human tumor stem cells, *Science.* 197:461-463, 1977.
- Rolhion, C., Penault-Llorca, F., Kemeny, J. L., Kwiatkowski, F., Lemaire, J. J., Chollet, P., Finat-Duclos, F., and Verrelle, P. 0(6)-methylguanine-DNA methyltransferase gene (MGMT) expression in human glioblastomas in relation to patient characteristics and p53 accumulation, *Int J Cancer.* 84: 416-20, 1999.
- Weisenthal, L. M., Su, Y. Z., Duarte, T. E., and Nagourney, R. A. Non-clonogenic, *in vitro* assays for predicting sensitivity to cancer chemotherapy, *Prog Clin Biol Res.* 276: 75-92, 1988.
- Hoffman, R. M. *In vitro* sensitivity assays in cancer: a review, analysis, and prognosis, *J Clin Lab Anal.* 5:133-43, 1991.
- Tveit, K. M., Gundersen, S., Hoie, J., and Pihl, A. Predictive chemosensitivity testing in malignant melanoma: reliable methodology—ineffective drugs, *Br J Cancer.* 58:734-7, 1988.
- Shimoyama, Y., Kubota, T., Watanabe, M., Ishibiki, K., and Abe, O. Predictability of *in vivo* chemosensitivity by *in vitro* MTT assay with reference to the clonogenic assay, *J Surg Oncol.* 41: 12-8, 1989.
- Pavlik, E. J., Flanigan, R. C., van Nagell, J. R., Jr., Hanson, M. B., Donaldson, E. S., Keaton, K., Doss, B., Bartmas, J., and Kenady, D. E. Esterase activity, exclusion of propidium iodide, and proliferation in tumor cells exposed to anticancer agents: phenomena relevant to chemosensitivity determinations, *Cancer Invest.* 3:413-26, 1985.
- Tanigawa, N., Kern, D. H., Hikasa, Y., and Morton, D. L. Rapid assay for evaluating the chemosensitivity of human tumors in soft agar culture, *Cancer Res.* 42: 2159-64, 1982.
- Schadendorf, D., Worm, M., Algermissen, B., Kohlbus, C. M., and Czarnetzki, B. M. Chemosensitivity testing of human malignant melanoma. A retrospective analysis of clinical response and *in vitro* drug sensitivity, *Cancer.* 73: 103-8, 1994.
- Tveit, K. M., Fodstad, O., and Pihl, A. The usefulness of human tumor cell lines in the study of chemosensitivity. A study of malignant melanomas, *Int J Cancer.* 28: 403-8, 1981.
- Mosmann, T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays, *J Immunol Methods.* 65:55-63, 1983.
- Denizot, F. and Lang, R. Rapid colorimetric assay for cell growth and survival. Modifications to the tetrazolium dye procedure giving improved sensitivity and reliability, *J Immunol Methods.* 89:271-7, 1986.
- Furukawa, T., Kubota, T., Suto, A., Takahara, T., Yamaguchi, H., Takeuchi, T., Kase, S., Kodaira, S., Ishibiki, K., and Kitajima, M. Clinical usefulness of chemosensitivity testing using the MTT assay, *J Surg Oncol.* 48: 188-93, 1991.
- Saikawa, Y., Kubota, T., Furukawa, T., Suto, A., Watanabe, M., Kumai, K., Ishibiki, K., and Kitajima, M. Single-cell suspension assay with an MTT end point is useful for evaluating the optimal adjuvant chemotherapy for advanced gastric cancer, *Jpn J Cancer Res.* 85:762-5, 1994.
- Suto, A., Kubota, T., Shimoyama, Y., Ishibiki, K., and Abe, O. MTT assay with reference to the clinical effect of chemotherapy, *J Surg Oncol.* 42:28-32, 1989.
- Yamaue, H., Tanimura, H., Nakamori, M., Noguchi, K., Iwahashi, M., Tani, M., Hotta, T., Murakami, K., and Ishimoto, K. Clinical evaluation of chemosensitivity testing for patients with colorectal cancer using MTT assay, *Dis Colon Rectum.* 39:416-22, 1996.
- Cole, S. P. Rapid chemosensitivity testing of human lung tumor cells using the MTT assay, *Cancer Chemother Pharmacol.* 17: 259-63, 1986.
- Carmichael, J., DeGraff, W. G., Gazdar, A. F., Minna, J. D., and Mitchell, J. B. Evaluation of a tetrazolium-based semiautomated colorimetric assay: assessment of radiosensitivity, *Cancer Res.* 47:943-6, 1987.
- Sevin, B. U., Perras, J. P., Averette, H. E., Donato, D. M., and Penalver, M. Chemosensitivity testing in ovarian cancer, *Cancer.* 71:1613-20, 1993.
- Hengstler, J. G., Lange, J., Kett, A., Dornhofer, N., Meinert, R., Arand, M., Knapstein, P. G., Becker, R., Oesch, F., and Tanner, B. Contribution of c-erbB-2 and topoisomerase IIalpha to chemoresistance in ovarian cancer, *Cancer Res.* 59: 3206-14, 1999.
- Carrel, A. On the permanent life of tissue outside the organism, *J. Exp. Med.* 15: 516-528, 1912.
- Leighton, J. The growth patterns of some transplantable animal tumors in sponge matrix tissue culture, *J Natl Cancer Inst.* 15: 275-293, 1954.
- Hoffman, R. M., Connors, K. M., Meerson-Monosov, A. Z., Herrera, H., and Price, J. H. A general native-state method for determination of proliferation capacity of human normal and tumor tissues *in vitro*, *Proc Natl Acad Sci U S A.* 86: 2013-7, 1989.
- Furukawa, T., Kubota, T., Watanabe, M., Kase, S., Takahara, T., Yamaguchi, H., Takeuchi, T., Teramoto, T., Ishibiki, K., Kitajima, M., and et al. Chemosensitivity testing of clinical gastrointestinal cancers using histoculture and the MTT end-point, *Anticancer Res.* 12:1377-82, 1992.
- Robbins, K. T., Connors, K. M., Storniolo, A. M., Hanchett, C., and Hoffman, R. M. Sponge-gel-supported histoculture drug-response assay for head and neck cancer. Correlations with clinical response to cisplatin, *Arch Otolaryngol Head Neck Surg.* 120: 288-92, 1994.
- Miller, B. E., Miller, F. R., and Heppner, G. H. Factors affecting growth and drug sensitivity of mouse mammary tumor lines in collagen gel cultures, *Cancer research.* 45:4200-4205, 1985.
- Hoffman, R. M. The three-dimensional question: can clinically relevant tumor drug resistance be measured *in vitro*?, *Cancer Metastasis Rev.* 13:169-73, 1994.

PŘÍSPĚVEK BIOSTATISTIKY K ŠTANDARDIZACI HODNOCENÍ TESTŮ CHEMOREZISTENCE NÁDORŮ IN VITRO

CONTRIBUTION OF BIOSTATISTICS TO THE STANDARDIZED EVALUATION OF TUMOR DRUG RESISTANCE TESTS

¹DUŠEK L.^{1,2}, KOPTÍKOVÁ J.¹, HAJDÚCH M.³, NOSKOVÁ V.³, LUŽKOVÁ A.³, KAŠPÁREK I.³ A ZLÁMALÍKOVÁ V.²

¹ CENTRUM INFORMATIKY A ANALÝZ, UNIVERZITNÍ ONKOLOGICKÉ CENTRUM, LF A MU BRNO

² RECETOX, PŘÍRODOVĚDECKÁ FAKULTA, MU BRNO

³ LABORATOŘ EXPERIMENTÁLNÍ MEDICINY, FN A LF UP OLOMOUČ

* - korespondující autor: Centrum informatiky a analýz UOC, Veslářská 230B, 637 00 Brno

Souhrn: Ze specifické role testů chemorezistence nádorů v prediktivní onkologii vyplývá nutnost definovat jejich objektivní parametrické hodnocení s důrazem na jasnou biologickou interpretaci. U testů *in vitro* je tento úkol dominantně spjat s modelovým popisem možných odpovědí na cytostatika, tedy s analýzami a parametrizací křivek dávka-odpověď. Při základní typologii kalibračního souboru 46 buněčných nádorových linií testovaných na účinek 28 cytostatik (MTT test) byly popsány 3 modelové typy závislosti: sigmoidní funkce, "hormesis" model s rozdílným stupněm stimulace v nízkých dávkách cytostatika a křivky nestandardní s více sestupnými fázemi spojenými s odlišným mechanismem účinku ve vyšších koncentracích látky (5-fluorouracil, karboplatina, cisplatina). Celkové spektrum křivek však bylo více rozmanité v důsledku interakcí cytostatik s vlastnostmi a aktuálním stavem testovaných linií. Výsledný tvar křivky lze pouze částečně spojit s mechanismem účinku aplikovaných cytostatik, do značné míry jej také ovlivňuje původ nádorového materiálu, rezistence, cytogenetické vlastnosti nebo aktuální stav proliferace buněk (především u látek ze skupiny mitotických jedů). Standardní analýza regresními modely je pak často limitována netypickým tvarem závislosti nebo omezeným počtem koncentračních úrovní testované látky. Práce dokládá využitelnost rovnice mediánového účinku jako diagnostické techniky umožňující jednotnou parametrizaci všech typů získaných křivek a vedoucí k odhadům minimální sady klinicky relevantních parametrů: hodnot EC_{50} , prahové koncentrace látky (nebo vhodného odhadu EC_x , např. EC_{10}) a podílu buněk přežívajících i v nejvyšší koncentraci cytostatika.

Klíčová slova: chemorezistence nádorů, MTT test, křivky dávka - odpověď, statistická analýza, mediánový účinek

Summary:

Specific role of drug resistance tests in the concept of predictive oncology determines the necessity of objective parametric outputs with biologically clear interpretation. In the case of *in vitro* tests, the problem implies quantitative model description of dose response curves and standardization of descriptors. Comparative evaluation of the calibration data set (46 cell lines tested factorially for the effect of 28 different chemotherapeutic agents in MTT test) revealed 3 basic types of dose response relationships: sigmoidal curves, hormesis model with response stimulation in low concentrations and complex curves consisting of two or more sigmoidal (or hyperbolic) components that might be related to different mechanisms of influence (Carboplatin, Cisplatin, 5-Fluorouracil). Final spectrum of obtained curves was however more diverse as a consequence of numerous types of interaction between drug mechanism and properties of tumor cells. The dose-effect diversity could be only partially attributed to different mechanisms of influence, it however appeared to be significantly associated with the heterogeneity of tumor cells, namely with the degree of resistance. Model analyses performed on the calibration data set proved the median effect equation as a powerful diagnostic technique for uniform analysis of all dose response patterns that occurred in drug resistance tests. A minimum, but clinically relevant set of parameters was proposed to be routinely estimated from each curve: EC_{50} estimates, threshold concentration (or proper alternative as EC_x , e.g. EC_{10}) and fraction of cells surviving the highest applied concentration of examined compound.

Key words: tumor drug resistance, MTT test, dose response curves, statistical analysis, median effect equation

Úvod

Testy chemorezistence nádorů *in vitro* představují jeden ze základních stavebních kamenů prediktivní onkologie jako oboru zaměřeného na bioindikaci a pravděpodobnostní predikci vývoje nádorových onemocnění pod vlivem chemoterapie a jiných léčebných procedur. In vitro testy hrají v celém procesu velmi specifickou roli zaměřenou především na zvýšení úspěšnosti konkrétních cyklů chemoterapie nebo na optimalizaci ucelených chemoterapeutických režimů. Představíme-li si však složitost léčby a různé cesty vývoje onemocnění v celé škále možností, je zřejmé, že funkční zapojení *in vitro* testů do celého procesu je možné pouze zajištěním průběžné zpětné konfrontace s reálnými klinickými výsledky. Koncové body vývoje nádorového onemocnění jako je pravděpodobnost relapsu či úmrtí mohou být úspěšně predikovány pouze pomocí modelů postihujících velmi heterogenní systém faktorů od klinických charakteristik pacienta, přes molekulární parametry nádoru až po parametry léčebného procesu. Z této situace tedy pro oblast testů chemorezistence vyplývá nutnost definovat objektivní parametrické výstupy korelující s reálnými klinickými daty a vedoucí k jasnému biologickému interpretacím. Tento úkol je dominantně spjat s modelovým popisem možných odpovědí na cytostatika, tedy s analýzami a parametrizací křivek dávka - odpověď. Hodnocení závislosti dávka-odpověď není specifikem experimentální onkologie, ale zasahuje prakticky všechny oblasti biologického výzkumu a představuje téměř univerzální přírodovědný problém. Je logické, že nejintenzivněji je tato problematika rozvíjena v rámci oborů toxikologie a ekotoxikologie, které z testů toxicity a karcinogeneze odvozují parametry biologické účinnosti látek, často s legislativními a procedurálními důsledky pro jejich použití (21,17). Jako hlavní styčné body s onkologickým

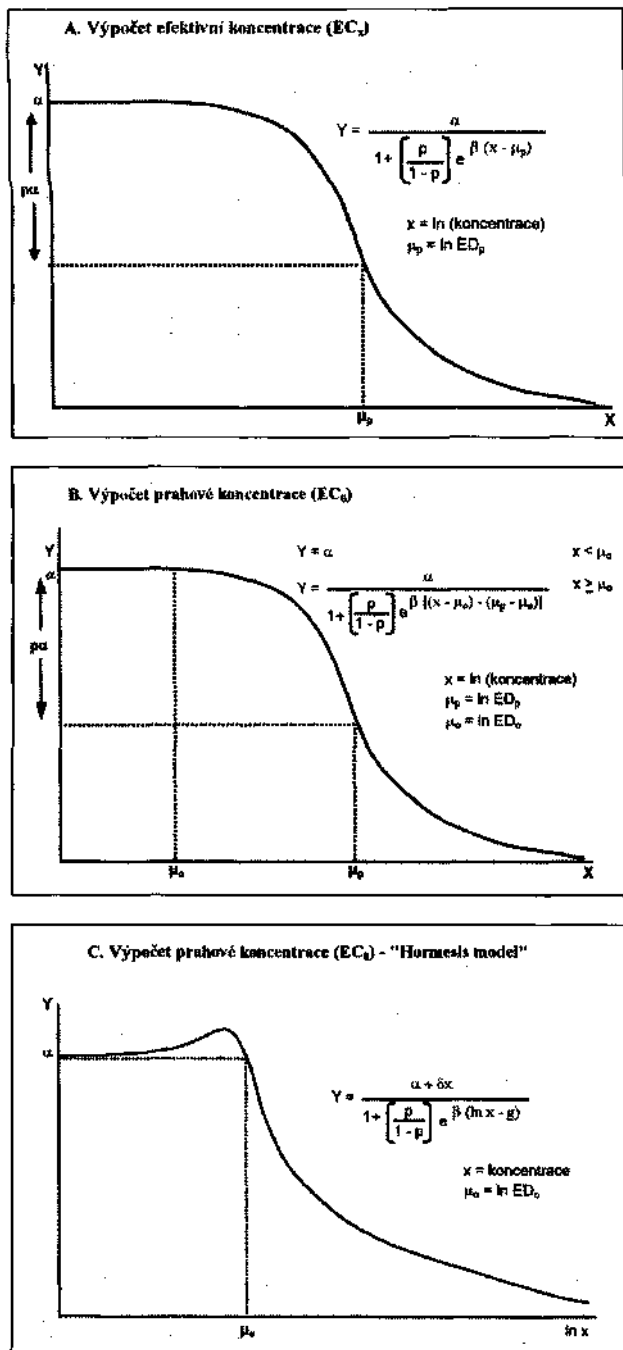
výzkumem lze kromě testů chemorezistence nádorů *in vitro* vymezit především testy karcinogeneze a mutagenese různých chemických látek, jejichž hodnocení kvalitativně zcela koresponduje s analýzami růstových testů a testů toxicity (19). V oblasti testů chemorezistence byly základy typologie křivek dávka - odpověď položeny v pracích Skipper a kol. (20) a Bruce a kol. (4). Shrnutí navržených klasifikací přináší Goldie a Coldman (8). Základním cílem této práce je kriticky shrnout současné možnosti analýzy a parametrizace křivek dávka - odpověď s ohledem na možné aplikace v testech chemorezistence nádorů. Na základě analýz kalibračního souboru 46 buněčných nádorových linií testovaných na účinek 28 cytostatik (MTT) jsou dokumentovány modelové typy závislosti a je doporučen jednotný analytický postup vedoucí ke klinicky relevantní parametrizaci testů.

Možnosti parametrizace křivek dávka - odpověď pomocí regresních modelů

Experimentální posouzení závislosti mezi dávkou látky (látek) a odpovědí biologického systému je v současnosti rutinní součástí toxikologických hodnocení. Pro standardní testy toxicity bylo možné vypracovat jednoznačné postupy analýzy dat vedoucí k parametrickým a statisticky verifikovatelným výstupům. Základními přístupy k hodnocení je prosté srovnání vlivu jednotlivých koncentrací působící látky s kontrolou nebo komplexní modelové analýzy křivky dávka - odpověď. Jelikož typický experiment zahrnuje kontrolu a určitý počet testovaných koncentrací v několika opakováních, mohou být pro aktuální data téměř vždy využity oba postupy.

Jako standardní a všeobecně přijatý výstup z modelových analýz byla navržena hodnota EC ("effective concentration") - koncentrace látky vyjadřující relativní míru účinku vzhledem ke kontrole.

Obrázek 1 – Nelineární regresní modely navržené jako standard pro analýzu křivek dávka–odpověď v testech toxicity (OECD, 1996, Welp, 1997).



Ekvivalenty k efektivní koncentraci jsou ED - efektivní dávka, LC - letální koncentrace, LD_x - letální dávka. Pro závislosti vykazující různý stupeň rezistence biologického systému vůči nízkým až středním koncentracím byly zavedeny různé odhady prahové koncentrace látky, mezi které patří i v ekotoxikologii nejčastěji užívaný odhad $NOEC$ („No Observable Effect Concentration“). Vývoj parametrizace křivek dávka - odpověď v environmentální legislativě a výzkumu nebyl přímočarý a v současnosti stále představuje vážné téma statistických prací a návrhů norem (17). Pro celý proces je charakteristický odklon od statistických indikátorů významnosti bez jasné biologické interpretace, tedy například od testů srovnávajících účinek jednotlivých koncentrací látky mezi sebou. Je akcentována nutnost respektovat tvar závislosti dávka - odpověď, která často odráží mechanismus účinku testované látky (11,12,16). V legislativě týkající se nebezpečnosti chemických látek se prosadil systém komplexního testování funkčních závis-

lostí s následným hodnocením parametrů typu EC_x . Hlavní výhody tohoto standardu - tedy podchycení typů křivek a validovatelný odhad jasně interpreovatelných parametrů - jsou zobecnitelné pro jakoukoli vědní disciplínu. Hodnoty EC_x lze odhadnout na základě vhodně volených regresních modelů vyhovujících typu analyzované funkce. Normativní doporučení publikované radou expertů OECD pro oblast testů toxicity chemických látek (17) a dále shrnuté v práci Welpa (22) je zobrazeno na Obrázku 1. Doporučené modely jsou využitelné pro nejběžnější se vyskytující typy závislostí: sigmoidní křivku (Obr. 1a), sigmoidní až hyperbolickou závislost spojenou s odhadem prahové koncentrace (Obr. 1b) a tzv. Hormesis model jako model vystihující pozitivní stimulaci biologického systému nízkými koncentracemi testované látky (Obr. 1c).

Aplikaci regresních modelů komplikuje heterogenita typů křivek dávka - odpověď

Výše uvedená standardní doporučení a typy regresních modelů jsou plně zobecnitelné pouze pro rutinizované laboratorní testy s biologickým materiálem v reprodukovatelné kvalitě. Při hodnocení neznámého problému (nové látky, směsi látek, testy in vivo) by měl být preferován postup dovolující spíše flexibilní volbu analytické metody. V mnoha přírodovědných oborech včetně experimentální onkologie tedy dochází k pokusům o interpreovatelnou klasifikaci možných typů odpovědí biologických systémů, což zpětně ovlivňuje vývoj analýzy dat (např. 1,8,2). Příklad schematického popisu a obecné klasifikace křivek dávka - odpověď, aplikovatelný i na testy chemorezistence nádorů, je uveden v Tabulce 1.

Rozmanitost křivek dávka-odpověď značně komplikuje standardizaci konečného počtu regresních modelů. Komplikované tvary reálných závislostí vedou často ke kompromisním úpravám jako jsou transformace původních dat, zavádění nových parametrů do regresních rovnic nebo matematické modifikace běžných regresních postupů (např. 18). Získané výstupy pak nejsou vzájemně srovnatelné a postrádají biologickou interpretaci. U netypických nebo komplikovaných závislostí je dále značně problematická znalost konvenčních regresních koeficientů (Obr. 1) zatížených variabilitou odhadu v důsledku kompromisního proložení modelu do experimentálních dat. Přesnost a spolehlivost iterací metod nelineární regrese může být dále limitována omezeným počtem testovaných koncentrací.

Jednotná parametrizace křivek dávka - odpověď pomocí rovnice mediánového účinku

Rovnice mediánového účinku a s ní související diagnostické techniky představují jednoduchou alternativu nelineárních regresních modelů (14). Rovnice vyjadřuje funkční vztah podílu (frakce) zasažených (F_z) a nezasazených (F_N) částí biologického systému ke koncentracím aplikované látky (C) normalizovaných hodnotou EC_{50} :

$$F_z/F_N = (C/EC_{50})^m \quad [\text{Rovnice 1}]$$

Koeficient m je předmětem odhadu ("koeficient Hillova typu"; 15) a vyjadřuje stupeň sigmoidity analyzované křivky. Hodnoty $m = 1$ indikují hyperbolický tvar, hodnoty $m > 1$ vyjadřují rostoucí sigmoiditu a hodnoty $m < 1$ jsou v literatuře citovány spíše vzácně, například jako indikace negativních vazeb mezi látkou a receptory alosterických systémů.

Rovnice 1 slouží po logaritmické transformaci jako efektivní nástroj odhadu hodnot EC_{50} (včetně S.E.) jednoduchou rovnicí regresní přímky:

$$\log(F_z/F_N) = m \cdot \log(C) - m \cdot \log(EC_{50}) \quad [\text{Rovnice 2}]$$

Při $F_z = F_N = 0,5$ získáme odhad EC_{50} jako

$$m \cdot [\log(C)]/m = \log(EC_{50}) \quad [\text{Rovnice 3}]$$

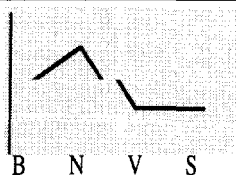
Jelikož je definičně dáno $F_z + F_N = 1$, pak lze rovnici 1 převést do následujících tvarů,

$$F_z = 1/[1 + (EC_{50}/C)^m] \quad [\text{Rovnice 4}]$$

$$C = EC_{50} [F_z/(1 - F_z)]^{1/m} \quad [\text{Rovnice 5}]$$

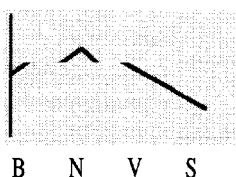
kteřé mohou být užitečné pro dílčí modelové odhady z křivky dávka - odpověď. Především rovnice [5] je účinným nástrojem pro odhad jakýchkoli hodnot EC_x na základě znalosti EC_{50} a exponentu m .

Typ I



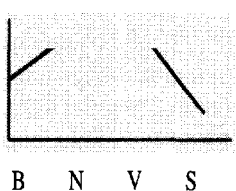
První typ křivky dávka – odpověď. Hormesis model. Nízké dávky způsobují pozitivní účinek (stimulaci), vyšší dávky pak účinek negativní, vysoké dávky, stejně jako saturovaná dávka způsobují inhibici určitého rozsahu. V ekotoxikologii a toxikologii lze křivku organismu, vysoké dávky naopak inhibují. Systém se tedy na toxickou látku neadaptuje.

Typ II



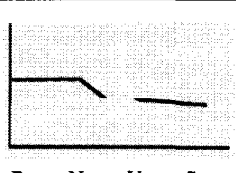
Druhý typ křivky je podobný typu I. Je však zřejmé, že inhibice ve vyšších dávkách není tak silná jako u typu I. Toxikologická interpretace uvažuje o mírném přizpůsobení orga-

Typ III



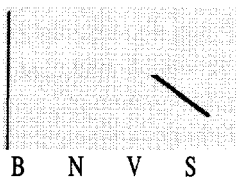
Třetí typ křivky. Pozitivní ovlivnění v nízkých i vysokých dávkách. Pokud posuzujeme zaznamenává toxický účinek až při saturované (nejvyšší) dávce. Rovněž ovšem může jít o špatně zvolený design testu – tedy volbu příliš nízkých koncentrací toxické látky.

Typ IV



toxicitu. Ta se začíná projevovat až při vyšších koncentracích. Nejčastější typ křivky v ekotoxikologických a toxikologických studiích. Z části křivky mezi N a V lze odhadnout EC_{50} a určit tak míru toxicity sledované látky většinou standardně doporučených

Typ V



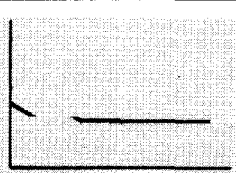
Pátý typ křivky dávka – odpověď. Tato křivka charakterizuje reakci velmi málo citlivého biologického systému.

Typ VI



Šestý typ křivky. Toxická látka nezpůsobuje toxický efekt v nízkých dávkách. Ve vysokých dávkách naopak způsobuje stimulaci (pozitivní efekt) následovaný inhibičním efektem účinné látky.

Typ VII



Sedmý typ křivky dávka – odpověď. Látka způsobuje toxický efekt již v nízkých dávkách i při vysokých dávkách. V oblasti nižších dávek může docházet ke stimulaci nebo nemusí být zaznamenán žádný toxický efekt. Oblast mezi B a N většinou vyžaduje aplikaci více koncentračních úrovní testované látky.

A. Identifikace testovaných buněčných linií

DU 145	Karcinom prostaty (metastáza)	HL 60S	Promyelocytární leukémie
A 549 IN SITU	Adenokarcinom plic	MCF 7	Karcinom prsu (ER+, p53wild)
NCI N 417	Malobuněčný karcinom plic	OV 1063	Karcinom ovária
Cole Wild TYP	Karcinom kolorekta (p53wild type)	BT 549	Karcinom prsu (p53mut)
CACO2	Karcinom kolorekta	NCI N 87	Karcinom žaludku
Cole Mut	Karcinom kolorekta (p53mut)	SK OV 3	Karcinom ovária
p 53 -/-	Fibroblasty (bez p53)	308 4/3	Karcinom pankreatu
CEM	T-lymfoblastická leukemie	SK N AS IN SITU	Totéž po transplantaci nahým myším
HT 29	Karcinom kolorekta	SK ES 1	Mylloidní leukémie
HAC A1	Imunizované keratinocyty	U 20S	Osteosarkom
NCI H 358	Bronchioloalveolární karcinom plic	RAMOS 1	Lymfom
NCI H 460 IN SITU	Velkobuněčný karcinom plic	SK N MC	Maligní melanom
g5 +/- 13	Totéž po transplantaci nahým myším	SK N MC	Neuroepiteliom
NCI H 520	Karcinom pankreatu	L 1236	Hodgkinův lymfom (EBV-)
NCI H 522	Dlaždicobuněčný karcinom plic	L 428 H 2	Hodgkinův lymfom (EBV-, preB)
NCI H 522	Adenokarcinom plic	LOVO	Karcinom kolorekta
H 9	Lymfom z T buněk		

B. Přehled testovaných cytostatik

Třída látek	Cytostatikum	Třída látek	Cytostatikum
Kortikoidy (steroidní hormony)	Prednizon	Antibiotika s radiomimetickým účinkem	Actinomycin D
	Dexamethazon		Doxorubicin
Antimetabolity	Fludarabin	s interkalačním mechanismem účinku	Mitoxantron
	Leustatin (kladribin)		Vepesid
	Gemcitabin	Účinku (deriváty imidazolkarboxamidu)	Dakarbazin
	Fluorouracil		
	Fluoguanin	Jiné	A.2.1.6 - Bohemin
Mitotické jedy - antimitotika	Vinkristin		Kyselina beta keto betulinová
	Taxol (paclitaxel)		LA-12
	Taxoter (docetaxel)		
Deriváty platiny	Cis-Platina		
	Carbo-Platina		
Antibiotika s alkylačním mechanismem účinku	Mitomycin C		

Všechny látky byly testovány na všech buněčných liniích v kompletním faktoriálním uspořádání 12 koncentrací při 4 – 6 nezávislých opakováních každého experimentu a v dubletu.

Rovnice mediánového účinku je zobecněním běžně užívaných kinetických rovnic (Michaelis-Mentenové, Hillovy, Langmuirovy atd.). Rovnice a odvozené diagnostické grafy (přímkové závislosti rovnic [2] vedoucí k odhadu m) umožňují uniformní analýzu široké škály parametrů a bez ohledu na konkrétní mechanismus inhibice (14). Technika byla úspěšně validována u vicesubstrátových enzymatických systémů (15). Další část této práce dokládá možnost jejího využití při hodnocení testů chemorezistence nádorů.

Testy chemorezistence nádorů in vitro – analýza reálných dat

Kalibrační soubor dat

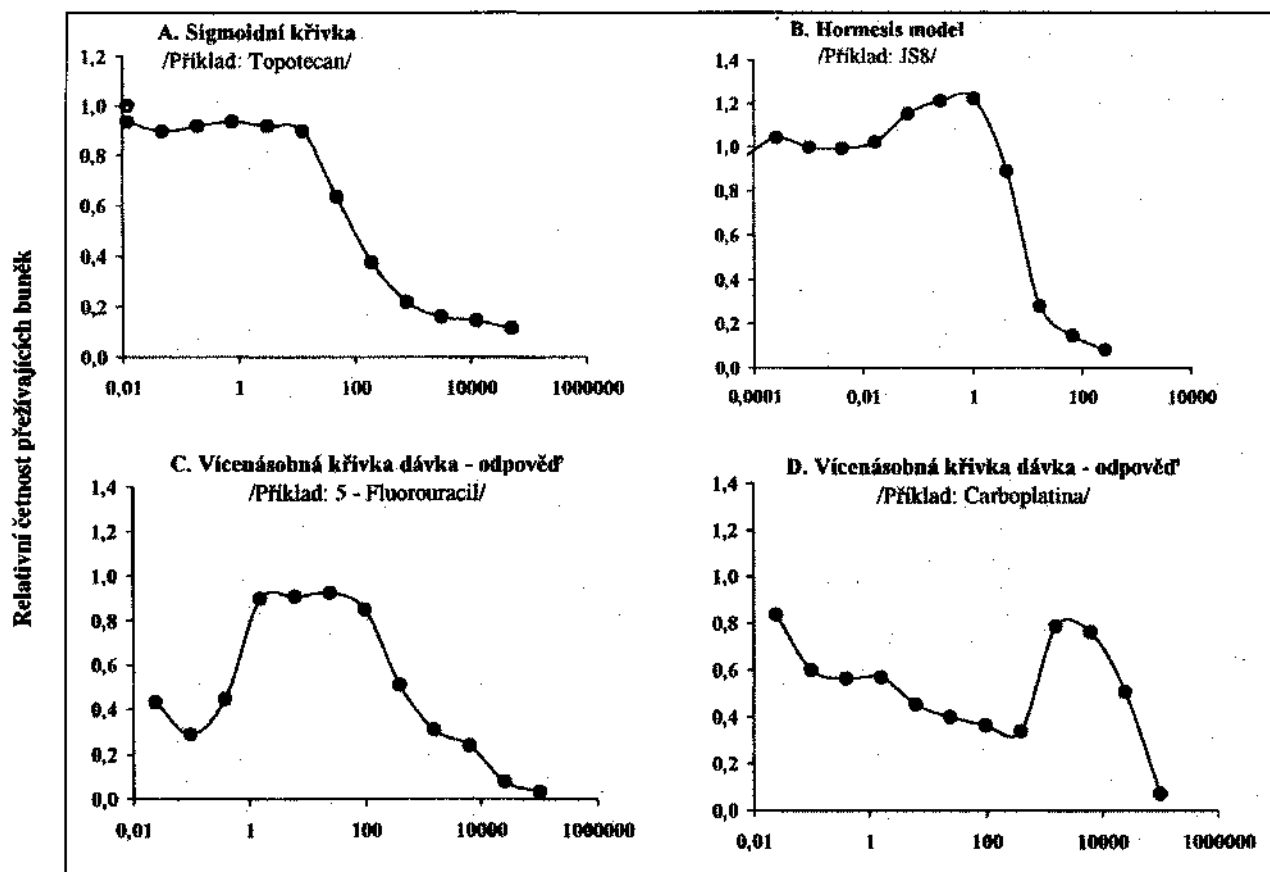
Přehled nádorových linií, u kterých byla aplikovatelnost rovnic

mi cytostatiky, je uveden v tabulce 2. Pro prezentaci výsledků bylo vybráno 5 reprezentativních buněčných linií různého původu (MEL-1, SK ES, CEM, RAMOS). Analýzovaná data jsou výsledkem MTT testu, jehož podstatou je stanovení životnosti nádorových lézí. Finálně se stanovuje koncentrace cytostatika smrtící 50% buněk (9).

Zakladní typy křivek dávka – odpověď, vliv cytostatika a vlastností nádorového materiálu

Při níže popsané analýze křivek bylo v celém kalibračním souboru pozorováno, že křivky typu "hormesis" model s rozdílným stupněm stimulace v nízkých dávkách cytostatika a křivky nestandardní

Obrázek 2 – Základní typy křivek dávka – odpovědi nalezené v provedených testech chemoresistance in vitro (46 buněčných linií / 28 cytostatik, data na obrázku jsou modelové příklady závislosti získaných na liniích CEM a A 549).
Koncentrace ($\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$; log měřítko)



Konečný tvar sigmoidní křivky je nutno vnímat jako výsledek interakce mechanismu účinku cytostatika a stupně (případně typu) rezistence testovaného nádorového materiálu. Tato interakce se projevuje sníženou účinností nízkých až středních koncentrací (tzv. „shoulder of the curve“) nebo určitým podílem buněk rezistentních i vůči nejvyšší aplikované koncentraci látky. Typ modifikace křivky lze pouze částečně spojit s konkrétním mechanismem účinku látky, do značné míry jej také ovlivňuje heterogenita nádorového materiálu (výskyt frakcí různě rezistentních buněk) nebo přímo původ a genetická konstituce nádorové linie. Zásadní vliv stupně rezistence nádorového materiálu na modifikace funkční závislosti dávka - odpověď publikovali také Goldie a Ling (7). Různé typy modifikací jsou pro 5 modelových linií dokumentovány na obrázku 3.

Příkladem silné rezistence většiny modelových linií vůči nízkým až středním dávkám cytostatika může být účinek Prednisonu nebo obecně kortikoidů (obdobně působí u většiny linií také Mitoxantron), který vede až k závislosti typu Hormesis model (Obr. 3b). Obdobně „jednotný“ rys má reakce většiny linií na Actinomycin D, kde je však na rozdíl od Prednisonu patrná vysoká citlivost odrážející se v hyperbolickém tvaru závislosti. Reakce na Cytosinarabinosid (reprezentativní obraz účinku antimetabolitů) je jistým průměrem obou dosud popsáných typů a k významnému rozlišení linií je nezbytná znalost podílu buněk s absolutní rezistencí vůči nejvyšší aplikované koncentraci. Poslední dokumentovaný typ - účinek Vinkristinu - nejvíce rozlišil testované linie, a to jak v nízkých, tak i vysokých koncentracích. Vysoká heterogenita odpovědí je typická i pro ostatní testované látky ze skupiny antimitotik a indikuje významný vliv vlastností nebo aktuálního stavu proliferace buněk v nádorovém materiálu. Určitá tendence k tzv. *Hormesis* modelu - tedy stimulace systému v nízkých koncentracích látky je zřetelná u celé řady cytostatik, avšak nejčastěji se vyskytuje u cytostatik účinných až ve vyšších koncentracích (kortikoidy, Mitoxantron, kyselina betulinová a kyselina beta keto betulinová) (Obr. 2). Statistická významnost těchto závislostí umožňuje jejich analýzu regresním modelem pro

získání prahové koncentrace látek (Obr. 1c). Ačkoli míra projevu stimulace v nízkých dávkách je u jmenovaných cytostatik částečně ovlivněna designem testů (především počtem koncentrací testovaných pod prahovou úrovní látky), samotná přítomnost tohoto typu závislosti může být významným projevem určitého mechanismu účinku (6).

Výskyt křivek s vícenásobným průběhem je typický pro účinek karboplatiny, cis-platiny a 5-fluorouracilu (Obr. 2). Tento jev lze

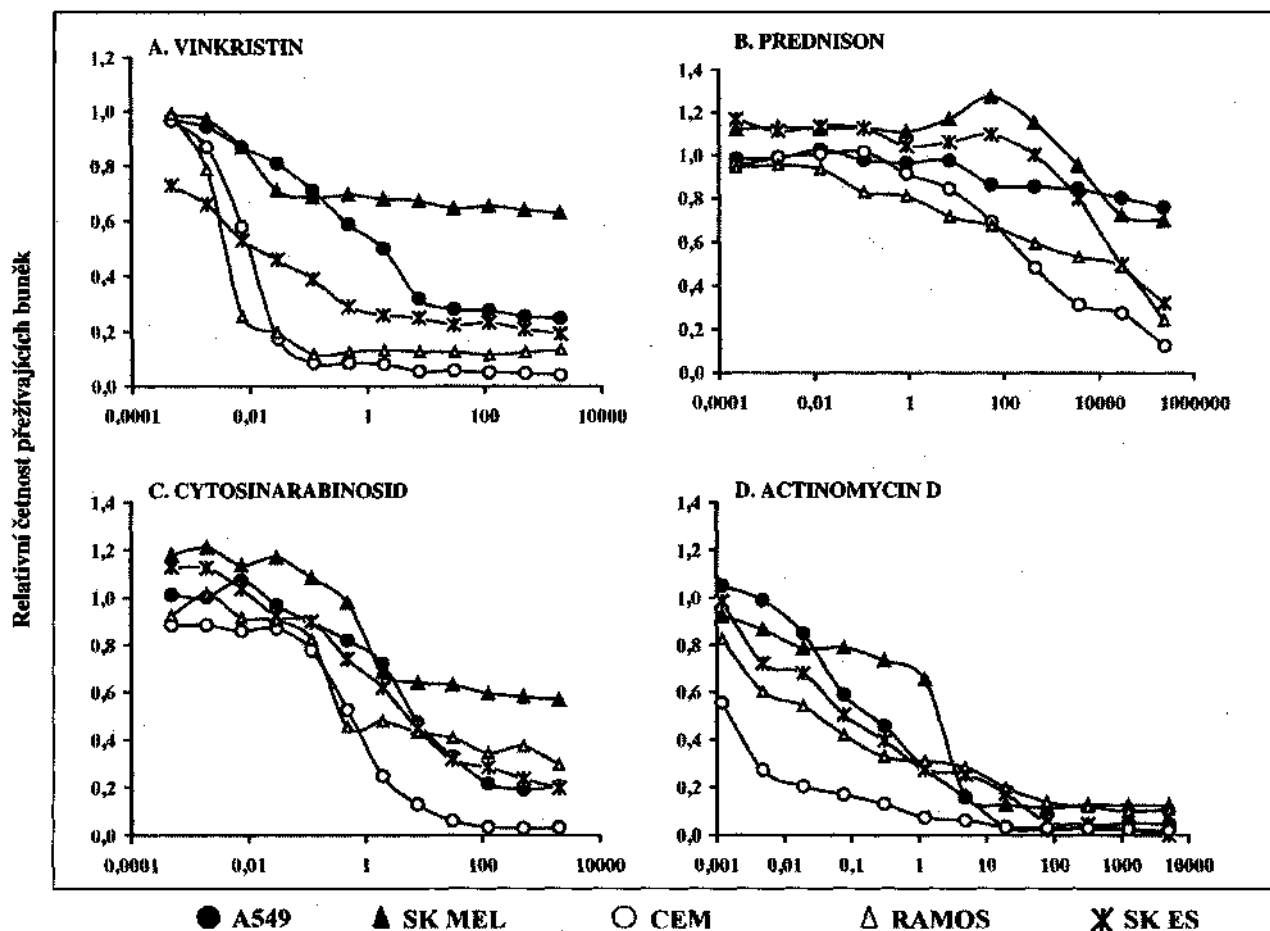
Tabulka 3. Minimální doporučená sada parametrů a jejich příspěvek k rozlišení modelových typů křivek dávka-odpověď

Látka	Linie	Analýza rovnici mediánového účinku ¹			% buněk přežívajících nejvyšší koncentraci cytostatika (2000 $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$)
		m	EC ₅₀	EC ₁₀	
Vinkristin	A 549	0,371	1,400	$3,8 \cdot 10^{-3}$	24,8
	SK MEL 1	0,914	-	$5,9 \cdot 10^{-3}$	62,9
	SK ES	0,268	0,017	$4,7 \cdot 10^{-6}$	19,2
	CEM	0,791	0,012	$7,4 \cdot 10^{-4}$	4,1
	RAMOS	1,945	0,005	$1,6 \cdot 10^{-3}$	13,5
Cytosin arabinosid	A 549	0,553	9,030	$1,7 \cdot 10^{-1}$	20,5
	SK MEL 1	-	-	$7,1 \cdot 10^{-1}$	56,8
	SK ES	0,515	5,690	$7,9 \cdot 10^{-2}$	19,8
	CEM	0,661	0,553	$1,9 \cdot 10^{-2}$	3,2
	RAMOS	0,477	2,512	$2,5 \cdot 10^{-2}$	37,7
Actinomycin-D	A 549	0,659	0,224	$7,9 \cdot 10^{-3}$	4,7
	SK MEL 1	0,952	1,250	$1,2 \cdot 10^{-1}$	12,8
	SK ES	0,374	0,106	$2,9 \cdot 10^{-4}$	1,2
	CEM	0,269	$1,4 \cdot 10^{-4}$	-	2,1
	RAMOS	0,216	0,028	$1,1 \cdot 10^{-6}$	10,6

¹ Parametr m představuje odhad sklonu diagnostických přímků získaný na základě rovnice [2].

Odhady hodnot ECx byly realizovány pomocí rovnic [3] a [5] a jsou uvedeny v $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$.

Obrázek 3– Vliv vybraných cytostatik s různým mechanismem účinku na pět buněčných linií lišících se původem a stupněm rezistence (body jsou průměrem ze 4 nezávislých opakování)
Koncentrace ($\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$; log měřítko)



u některých cytostatik přiřadit nástupu odlišného mechanismu účinku ve vyšších koncentracích látky. Například deriváty platiny mají ve vyšších koncentracích účinek DNA alkylační, zatímco v nízkých koncentracích významně inhibují telomerázovou aktivitu (5). Podobně je tomu i v případě 5-fluorouracilu, kde tato látka je na straně jedné známým inhibitorem thymidylátsyntetázy a na straně druhé vykazuje podobně jako deriváty platiny inhibiční aktivitu na enzymový komplex telomerázy (10). V dalších studiích se pokusíme prokázat, zda se jedná o náhodnou koincidence dvou faktorů, nebo o kauzální vztah. Vícenásobný průběh křivek vázaný na určitou látku odlišuje testy chemorezistence nádorů od klasické toxikologie, kde je takový tvar křivek spíše vzácný (21,19). Obdobný typ křivek bývá popisován spíše v epidemiologických studiích jako náhlá změna závislosti mezi chronickou expozicí dávkou a rizikem nemoci v okamžiku, kdy se dávka dostane k neznámé prahové hodnotě někdy nazývané „change-point“ - bod zlomu.

Ačkoli křivky se sigmoidním průběhem v souboru jednoznačně považují, v klasické podobě (hodnotitelné standardním regresním modelem -17; Obr. 1a) se vyskytují pouze u některých mitotických jedů nebo antimetabolitů. U silně rezistentních linií (např. melanom SK MEL) dochází k modifikaci sigmoidy do podoby nehodnotitelné běžnou regresí. Rovněž analýza křivek typu Hormesis model (Obr. 1c) je závislá na charakteru konkrétní závislosti a je otázkou zda výstup z modelové rovnice poskytne klinicky relevantní parametry. Vícenásobné křivky dávka - odpověď nejsou běžnými regresními postupy analyzovatelné a jejich modelová analýza (např. dvousegmentovou logistickou regresí -18) neposkytne klinicky jasné interpreovatelné parametry. vanou

dokumentuje výstupy diagnostických diagramů, které vedou k přímému odhadu koeficientu m (rovnice [2]) metodou lineární regrese. Linearitu diagnostických grafů lze považovat za důkaz platnosti rovnice pro analyzované typy křivek (15). U problematických sigmoidních odpovědí různě rezistentních linií lze linearitu dosáhnout vypuštěním té části křivky, kde cytostatikum ještě nepůsobí neodpovídající nebo rezistentní buňky (vysoké koncentrace). Křivky typu Hormesis model lze analyzovat vypuštěním oblastí stimulační v nízkých koncentracích cytostatika a křivky s vícenásobným průběhem oddělenou analýzou jednotlivých částí.

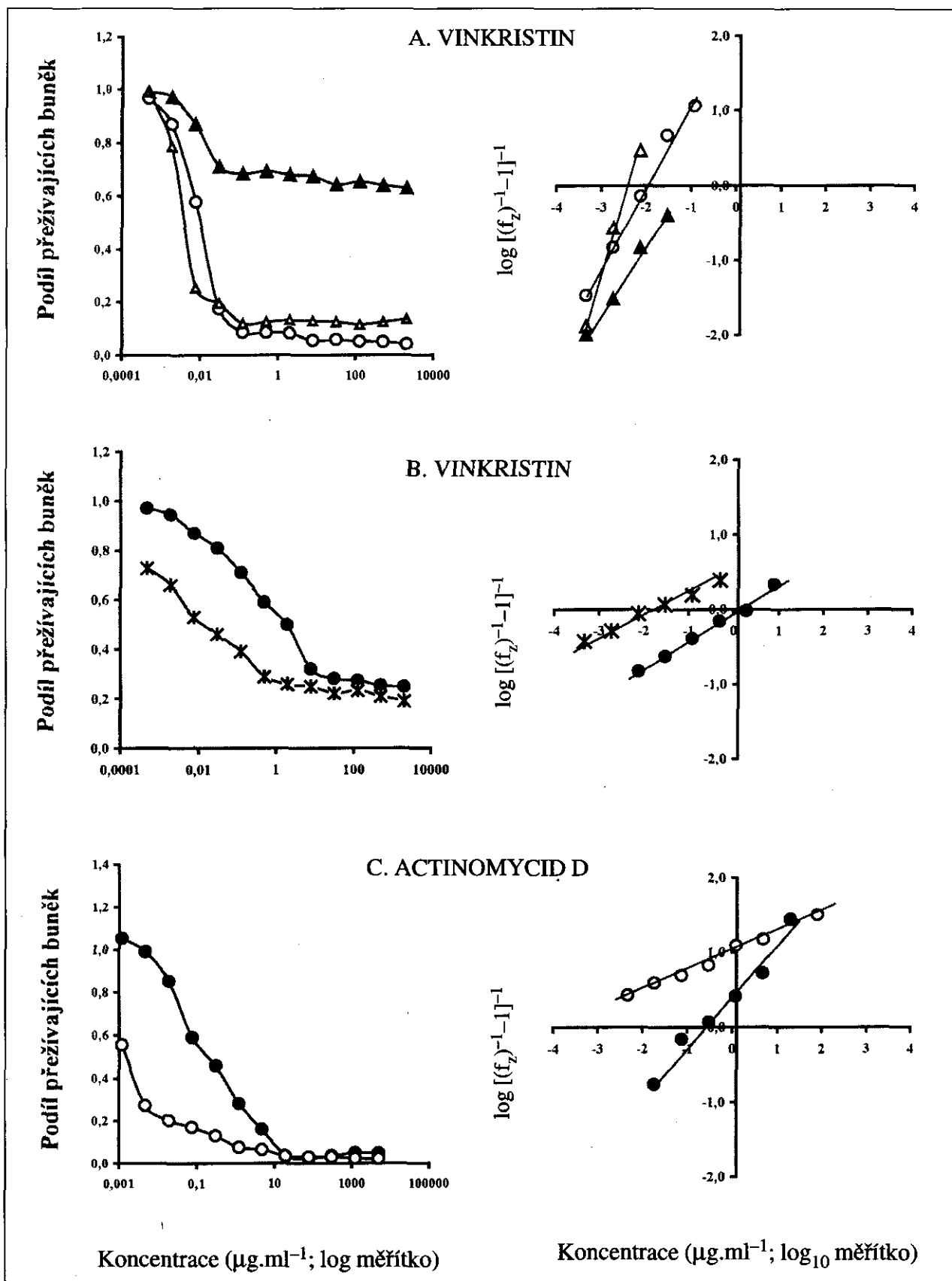
Metoda vedla velmi efektivně k odhadu hodnot EC_{50} (rovnice [3]) a jakýchkoli hodnot EC_x (rovnice [5]), pokud jich ve svém účinku daná látka dosahovala. Vyšší sklon přímkou v diagnostických grafech indikuje vyšší stupeň sigmoidity (Obr. 4a, c), paralelní průběh přímkou je důkazem kvalitativně stejného typu závislosti odstupňovaného pouze stupněm rezistence (Obr. 4b). Analýza opět potvrdila, že heterogenita tvarů křivek dávka - odpověď u testů chemorezistence není dána pouze mechanismem účinku působících látek, ale také mírou a typem rezistence nádorových buněk (srov. Obr. 3,4). Z tohoto důvodu není možné klinicky relevantní parametrizaci založit pouze na odhadovaných hodnotách EC_{50} nebo na libovolném výběru většího množství hodnot EC_x . Minimální sada parametrů (realizovatelná i v případě testování 6-8 koncentrací) musí zahrnovat odhad EC_{50} , dále údaj o prahové koncentraci látky, který může být nahrazen vhodným odhadem EC_x (na zde prezentovaných datech byl jako optimální zvolen parametr EC_{10}), a dále odhad podílu buněk přežívajících i nejvyšší aplikované koncentraci dané látky.

Tabulka 3 sumarizuje minimální parametrický záznam pro modelové typy cytostatik a buněčné linie s výsledkem potvrzujícím závěry primárních analýz (srov. Obr. 3). Jednotlivé skupiny cytostatik jsou ve svém účinku různě ovlivňovány vlastnostmi a genetickou konstitucí testovaných linií a žádný z navržených parametrů

Modelová analýza křivek MTT pomocí rovnice mediánového účinku

Rovnice mediánového účinku představuje velmi efektivní metodu jednotné analýzy všech pozorovaných typů křivek. Obrázek 4

Obrázek 4 – Ukázka rozlišovacích schopností diagnostických grafů vycházejících z rovnice mediánového účinku. A. Rozlišení křivek s různým stupněm sigmoidity, B. Kvalitativně stejný typ závislosti s různou mírou rezistence, C. Rozdílné typy závislosti.



● A549 ▲ SK MEL ○ CEM △ RAMOS ✕ SK ES

není schopen samostatně popsat všechny existující závislosti. Účinek mitotických jedů (zastoupeny Vinkristinem) nejvíce závisí na vlastnostech nebo aktuálním stavu buněk testované linie. Konkrétně Vinkristin jako látka působící primárně na formování mitotického aparátu může selektovat buňky, které nejsou aktuálně ve stavu mitózy (8). Tento jev se v analýzách projevuje výrazným rozlišením vzorků hodnotami EC_{10} i účinností nejvyšších koncentrací, samozřejmě s logickým dopadem na hodnoty EC_{50} . Reakce vybraných linií na Cytosinarabinosid a Actinomycin D je kvalitativně podobná s různě intenzivním rozlišením v oblasti nízkých nebo vysokých koncentrací (Obr. 3, Tab. 3).

Závěr - výhody a specifika techniky mediánového účinku

Modelová analýza širokého spektra typů křivek umožňuje konstatovat, že rovnice mediánového účinku plně použitelnou technikou pro rutinní parametrizaci všech typů křivek dávka - odpověď vyskytujících se v testech chemorezistence nádorů. Jednoznačně hlavní výhodou doporučené techniky je přímočarý odhad vybraných hodnot EC_x založený pouze na realizaci rovnice regresní přímky a umožňující zpětnou grafickou kontrolu. Dalším nesporným argumentem ve prospěch techniky mediánového účinku je nezávislost hodnocení konkrétních dat na mechanismu účinku testovaných látek - zaměření analýzy pouze na cílovou část křivky splňuje požadavky na jednoduchost analýzy. Toto hodnocení lze ovšem kdykoli doplnit regresním modelem vyhovujícím existujícímu vztahu. Rovnice mediánového účinku je využitelná i pro křivky s menším množstvím testovaných koncentrací, kde je exaktní proložení regresních závislostí problematické - tedy pro rutinní hodnocení testů reálných nádorových vzorků, často limitovaných množstvím biologického materiálu. Jednoduchost diagnostických grafů vykreslujících přímkovou závislost $\log(F_z/F_N)$ na logaritmu koncentrací lze využít pro komparativní hodnocení většího množství křivek. Rostoucí hodnota sklonu přímek (parametr m) určuje stupeň sigmoidity závislosti a slouží k přímému odhadu plného spektra hodnot EC_x (jsou - li danou látkou dosaženy). Zvláštností dat z testů chemorezistence ve srovnání s literaturou (14,15) je častý výskyt hodnot $m < 1$, který lze vysvětlit heterogenitou testovaného nádorového materiálu. Sigmoidní nebo hyperbolické průběhy většiny křivek analyzovaných pro tuto studii náhle v určité koncentraci cytostatika končí a vymezují tak pouze reakci té části buněčné populace, která je na látku aktuálně citlivá (i méně než 60 - 50 % buněk, Tab. 3). Analýza relativně malého úseku osy Y (podíl přežívajících buněk) tak objektivně nedává dostatečný prostor pro hodnotu sklonu m vyšší než 1. Kdekoli je škála účinku testované látky dostatečně široká, hodnoty m se blíží 1 nebo tuto hranici významně převyšují a indikují tak hyperbolickou až sigmoidní závislost (např. linie RAMOS pod vlivem Vinkristinu, Obr. 3, Tab. 3). Prokazatelná heterogenita rezistence buněk v testovaných vzorcích byla hlavním důvodem k zařazení odhadů EC_{50} a podílu buněk přežívajících nejvyšší koncentraci látky do minimální parametrické sady.

Poděkování

Práce je podpořena projektem MŠMTJ07/98-141100003, IGAMZ 4132-5, MSMTVZJ14/98151100001 a Nadací pro výzkum rakoviny v Olomouci.

Literatura

1. Amador GA, Mayerhofer A, Barte A: Genetics and Luteinizing Hormone Receptors. V: Bartke A., editor. Function of Somatic Cells in the Testis. Springer Verlag: New York, 1994, pp. 293 - 318.
2. Boone MD: The effect of temperature on the potency of carbaryl for survival of tadpoles of the green frog (*Rana clamitans*). Env.Tox and Chem 1999;18 (7), 1482-1488.
3. Boos DD, Brownie C: Mixture models for continuous data in dose-response studies when some animals are unaffected by treatment. Biometrics 1991;47(4), 1489-1504.
4. Bruce WR, Meaker BE, Valeriote FA: Comparison of normal hematopoietic and transplanted lymphoma colony forming cells to chemotherapeutic agents administered in vivo. J Nat Cancer Inst 1966;37, 233 - 245.
5. Burger AM, Double JA, Newell DR: Inhibition of telomerase activity by cisplatin in human testicular cancer cells. Eur J Cancer 1997;33,638-644.
6. Calabrese EJ, Baldwin LA: Chemical hormesis: its historical foundations as a biological hypothesis. Hum Exp Toxicol 2000;19,2-31.
7. Goldie JH, Ling V: The evolution of drug resistance. Can J Oncol 1992;1, 1-15.
8. Goldie JH, Coldman AJ: Drug Resistance in Cancer. Mechanisms and Models. Cambridge University Press, 1998, Cambridge.
9. Hajdúch M, Mihál V, Minafik J, Faber E, Šafářová M, Weigl E, Antálék P: Decreased in vitro chemosensitivity of tumor cells in patients suffering from malignant disease with poor curability. Cytotechnology 1996;18,1-3.
10. Ishikawa T, Kamiyama M, Hisatomi H, Ichikawa Y, Momiyama N, Hamaguchi Y, Hasegawa S, Narita T, Shimada H: Telomerase enzyme activity and RNA expression in adriamycin-resistant human breast carcinoma MCF-7 cells. Cancer Lett 1999;141,187-94.
11. Chapman PF, Crane M, Wiles JA, Noppert F, McIndoe EC (Eds): Asking the right questions: ecotoxicology and statistics. Society of Environmental Toxicology and Chemistry - Europe. 1995, London.
12. Chapman PF, Crane M, Wiles JA, Noppert F, McIndoe EC: Improving the quality of statistics in regulatory ecotoxicity tests. Ecotoxicology 1996a;1,1-18.
13. Chapman PM, Caldwell RS, Chapman PF: A warning: NOECs are inappropriate for regulatory use. Environ Toxicol Chem 1996b;1, 77 - 79.
14. Chou TC: Comparison of dose-effect relationships of carcinogens following low-dose chronic exposure and high -dose single injection: An analysis by the median-effect principle. Carcinogenesis 1980;1,203 - 213.
15. Chou TC, Talalay P: Analysis of combined drug effects: A new look at very old problem. Trends in Pharmacol Sci. 1983;4,450 - 454.
16. Kooijman S A L M: An alternative for NOEC exists, but the standard model has to be abandoned first. Oikos 1996;75,310-316.
17. OECD: Report of the OECD workshop on statistical analysis of aquatic toxicity data, Braunschweig, Germany, 15 - 17 October, 1996. Organization for Economic Co-operation and Development.
18. Pastor R, Gualler E: Use of two-segmented logistic regression to estimate change-points in epidemiologic studies. Am. J. Epidemiol 1998;148 (7), 631 - 642.
19. Schuurmann G, Markert B eds.: Ecotoxicology. Ecological fundamentals, chemical exposure and biological effects. A John Wiley & Sons, 1997, New York.
20. Skipper HE, Schabel FM Jr, Wilcox WS: Experimental evaluation of potential anti-cancer agents. XTU On the criteria and kinetics associated with 'Curability' of experimental leukemia. Cancer Chemother 1964;35,1-11.
21. Yang RSH ed.: Toxicology of Chemical Mixtures. Case Studies, Mechanisms and Novel Approaches. Academic Press, 1994, London.
22. Welp G, Brimmer GW: Toxicity of Increased Amounts of Chemicals and the Dose-Response Curves for Heterogenous Microbial Populations in Soil. Ecotoxicology and Environmental Safety 1997;37,37-44.

SOFTWARE CHEMOREZIST (VERZE 1.0) - KOMPLEXNÍ NÁSTROJ PRO ANALÝZU DAT A MANAGEMENT TESTŮ CHEMOREZISTENCE NÁDORŮ

SOFTWARE CHEMORESIST VERSION 1.0 - A COMPLEX TOOL FOR DATA ANALYSIS AND MANAGEMENT OF TUMOUR DRUG RESISTANCE TESTING

B. REGNER¹, L. DUŠEK^{1,2} a M. HAJDÚCH³

¹ CENTRUM INFORMATIKY A ANALÝZ, UNIVERZITNÍ ONKOLOGICKÉ CENTRUM, LF MU, BRNO

² RECETOX, PŘÍRODOVĚDECKÁ FAKULTA, MU, BRNO

³ LABORATOR EXPERIMENTÁLNÍ MEDICÍNY, FN UP, OLOMOUČ

Souhrn: Práce představuje koncepci a základní strukturu programu Chemoresist (verze 1.0) vyvinutého pro rutinní i vědeckou analýzu dat z testů lékové rezistence nádorů. Základní motivací pro tvorbu softwaru „na míru“ v této oblasti je potřeba automatizace práce s daty a standardizace parametrických výstupů pro další rozhodovací proces.

Klíčová slova: chemorezistence nádorů, křivky dávka - odpověď, analytický software, management dat

Summary: The paper is aimed as introductory description of software Chemoresist (version 1.0) as a tool for routine management and scientific analysis of data from tumor drug resistance testing. The development was predominantly initiated by requirement of automatic data processing and standardization of parametric outputs for further decision process.

Key words: tumor drug resistance, dose response curves, analytical software, data management

Úvod

Program Chemoresist byl vytvořen na základě praktických zkušeností s testy chemorezistence nádorových buněčných linií i reálných vzorků nádorů jako databázově orientovaný nástroj zajišťující analytické postupy, grafické výstupy a archivaci dat. Ve verzi 1.0 jsou k dispozici modulárně uspořádané funkce v rozsahu umožňujícím plnohodnotné zapojení software do procesu rutinního testování velkého množství vzorků. Rozmanitost odpovědí nádorů na vliv různých cytostatik a nezanedbatelná variabilita výstupů při testování reálných nádorových vzorků činí z analýzy dat kritický prvek celého systému testování, jehož chybovost může znehodnotit celé předchozí úsilí. Základní motivací pro tvorbu softwaru „na míru“ je tedy automatizace práce s daty a standardizace parametrických výstupů. Tyto funkce spojené s on-line databázem

zavou archivaci dalších charakteristik vzorku zajistí vzájemnou srovnatelnost různých pokusů a umožní zpětnou dostupnost výsledků pro korelační analýzy s klinickými nebo jinými daty.

Základní struktura programu

Software je orientován jednak na analýzu buněčných linií v různých pokusných uspořádáních (flexibilní, výzkumná část) a jednak na hodnocení reálných vzorků nádorové tkáně od pacientů (více standardizovaná část). Datové vstupy i editační modul je přizpůsoben testování vzorků na definovaných panelech s cytostatiky. Na každém panelu je možné testovat 96 vzorků v 8 řadách, 12 sloupcích. Panel je rozdělen na „blank“ oblasti, „control“ oblasti obsahující vodu s buňkami a „data“ oblasti, kde jsou k testovaným buňkám přidávány různé vysoké koncentrace cytostatik.

Ukázky některých funkcí programu:

Základní pole pro vstup dat a management panelů

Tlačítkem Add je možné přidat nové pokusy, přes Select

vybírat již existující.

Přidání či výběr linie/pacienta. Existující záznamy je možné

vyhledávat na základě ID, jména nebo příjmení.

Při výběru linie/pacienta se automaticky zobrazí k nim příslušející panely, které již byly načteny. Je možné načíst nové panely z primárních souborů.

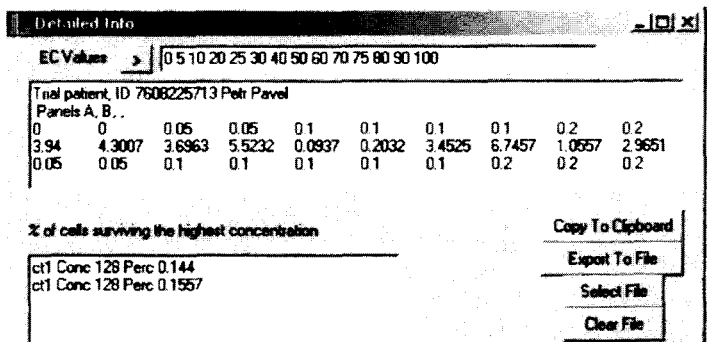
Při vykreslení grafu se vypočítají hodnoty EC.

Tabulka vypočítaných hodnot. Záznam ORIGINAL se vytváří automaticky při načtení panelu a nesmí se modifikovat. Pro modifikace je možné přidat kopie.

Zadané hodnoty absorbance z „data“ oblastí se po transformaci za použití průměrných hodnot z „blank“ a „control“ oblastí automaticky hodnotí směrem ke standardním výstupům. Z koncepčního hlediska má program dvě základní, vzájemně propojené, funkce. První je funkce databázová poskytující nástroje pro načítání dat a jejich uchování ve vhodné struktuře. Tato část programu slouží v podstatě jako kartotéka vzorků s možností libovolně rozšiřovat množství záznamů i jejich parametrický obsah. Druhá část programu slouží k manipulaci s daty, jejich kontrole, editaci, zviditelnění a analýze. Jednotlivé funkce programu jsou modulárně uspořádány, což zajiš-

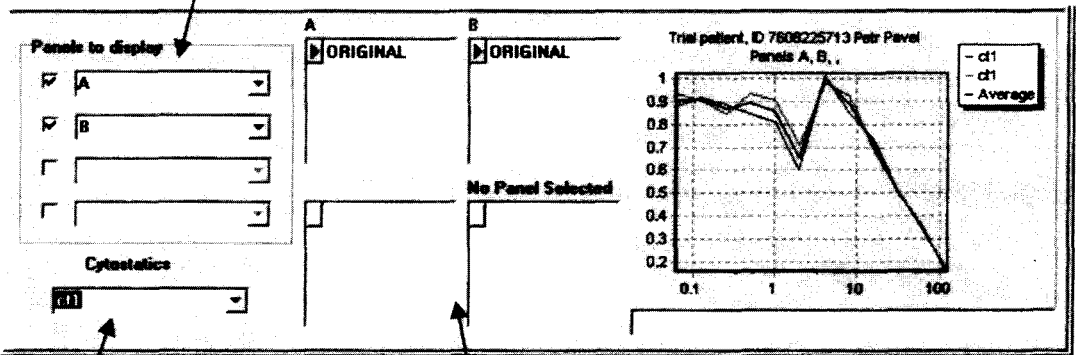
tuje jejich přehlednost a také umožňuje další rozvoj softwaru. Verze 1.0 nabízí uživateli – analyzátorovi základ grafického modulu – umožňuje zviditelnění křivek dávka–odpověď, on-line editaci v grafu, sumární statistiku v grafu a vytváření komplexních grafů – a statistického modulu, ve kterém lze jednak získat statistickou sumarizaci nezávislých opakování testů a především odhad jakýchkoli hodnot EC₅₀. Statistické metody jsou založeny na širokém spektru algoritmů od lineární interpolace hodnot mezi dvěma sousedními body křivky dávka–odpověď, přes diagnostické techniky vycházející z rovnice mediánového účinku až po prokládání funkčních závislostí regresními technikami.

Analýza dat a zviditelnění výsledků



Je možné získat detailní rozpis EC pro všechny v grafu zobrazené řady a podíl buněk přežívajících maximální použitou koncentraci.

Zde je možné vybrat typ zobrazovaného panelu. Vybrané panely musí mít stejné rozmístění datové oblasti a jejich koncentrační škály na sebe musí navazovat

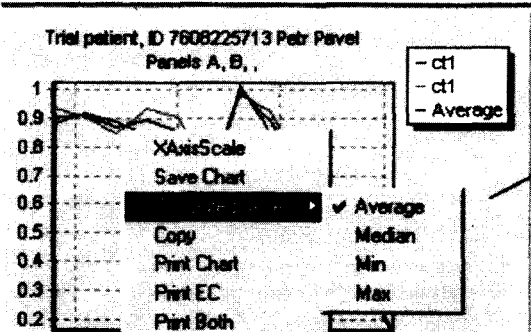


Které z cytostatik obsažených v panelech se má zobrazit.

Graf zobrazuje jednak původní datové řady, jednak řady z původních vypočítané. Je možné vypočítat průměrnou, mediánovou, minimální a maximální řadu.

Která z kopií každého panelu se má použít pro zobrazení a výpočty

Kliknutím pravým tlačítkem myši na graf se objeví možnosti manipulace s grafem – změna měřítka, ukládání, tisk, vkládání vypočítaných řad.



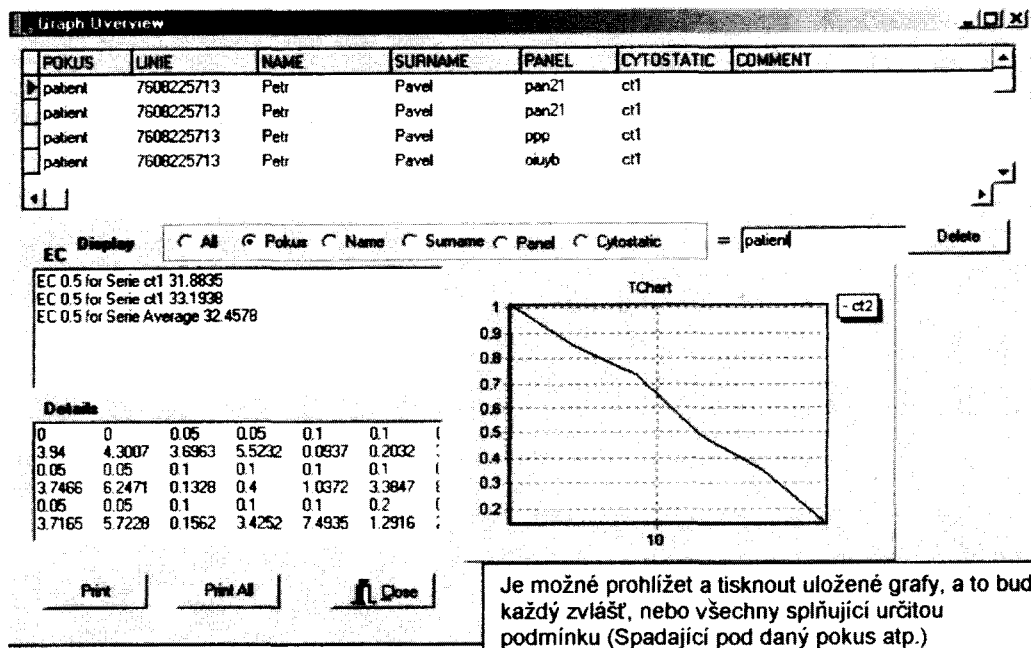
Datová struktura programu

Databáze programu je tvořena několika tabulkami.

1. Tabulka Pokusy. Tato tabulka v podstatě sleduje organizační strukturu práce. Jednotlivé záznamy v tabulce odpovídají logicky souvisejícím skupinám testů (např. všechny testy spadající pod jeden grantový projekt). Jedním z těchto „pokusů“ je i záznam „Pacient“ zastřešující všechny pacienty, jejichž vzorky jsou testovány na pracovišti.
2. Tabulka Pacienti/Linie. Obsahuje údaje o liniích v jednotlivých pokusech (název linie, textová poznámka), a všech pacientech v pokusu „Pacient“ (rodné číslo, jméno, příjmení). Tato data představují klíčový prvek pro orientaci v databázi výsledků.
3. Tabulka Panely. Zde jsou uloženy veškeré údaje o panelech, tedy název panelu, ke kterému pokusu a které linii panel náleží a podle které masky (viz dále) byl panel měřen. Dále jsou zde primární data získaná při testování panelu. S těmito daty není možné nijak manipulovat.

4. Tabulka Computed. Při vložení nového panelu do tabulky Panely jsou načtená data přepočítána na blank a kontrolu, a získané hodnoty vloženy do tabulky Computed. Jsou zde tedy data dále používaná pro vytváření grafů a výpočty EC₅₀. Pokud se ukáže, že některá z dat jsou zjevně chybná (odlehle hodnoty, záporná čísla), je možné vytvořit kopii originálních dat a tuto editovat (např. odstranit chybné hodnoty, vyplnit vybraná místa vhodnou interpolací, atd.). Záznam vytvořený automaticky při načtení panelu není možné editovat.
5. Tabulka Masky obsahuje informace o struktuře jednotlivých panelů. Jsou zde zadána cytotatika použitá na panelu, jejich rozmístění a koncentrační škály, dále umístění kontrol a blank oblastí. Používá se při přepočítávání primárních dat z tabulky Panely do Computed, při vykreslování grafů a výpočtech EC₅₀.
6. Tabulka Cytostatika obsahuje seznam cytotatik.

Souhrnné editační
a databázové
funkce



The 'All Lines' window has a 'Select' section with three radio buttons: 'By ID string', 'By Name' (selected), and 'By Surname'. Below each radio button is a text input field. The 'By Name' field contains 'Petr'. There are also 'Includes' and 'Equals' radio buttons for each search criterion. A 'Submit Query' button is at the bottom right. Below the search section, a table shows the results with columns: ID_STRING, NAME, and SURNAME. The first row shows '7608225713', 'Petr', and 'Pavel'. At the bottom, there are buttons for 'Add Line', 'Delete Line', 'Select Line', 'Print Selection', and 'Close'.

Na základě zadaných kritérií je možné vyhledat podskupinu všech záznamů, a z nich pak vybrat požadovaného pacienta/linii

Poděkování

Software Chemoresist vytvořilo Centrum informatiky a analýz Univerzitního onkologického centra Lékařské fakulty MU v Brně na základě podpory projektem MŠMT J07/98-141100003. Autorem programu je Mgr. Břetislav Regner.

STŘEDNÍ HODNOTY CITLIVOSTI NA JEDNOTLIVÁ CYTOSTATIKA U NÁDORŮ RŮZNÉHO HISTOGENETICKÉHO PŮVODU

MEAN VALUES OF IN VITRO CHEMOSENSITIVITIES IN TUMORS OF DIFFERENT HISTOGENETIC ORIGIN TO INDIVIDUAL ANTI-CANCER DRUGS

¹LUĐKOVÁ A., ²HAJDUCH M., ³NOSKOVÁ V., ⁴ŽALOUDEK J., ⁵KRÁL V., ⁶KLEIN J., ⁷STEHLÍK D., ⁸FEKETOVÁ G., ⁹TROJANEC R., ¹⁰GOJOVÁ L., ¹¹DŽUBÁK P., ¹²KAŠPAREK I., ¹³BRAŽINOVÁ S., ¹⁴MIHÁL V., ¹⁵CWIERTKA K., ¹⁶KOLEK V., ¹⁷ŠAFÁROVÁ M., ¹⁸JANOŠŤÁKOVÁ A., ¹⁹PILKA R., ²⁰KOUZMINA G., ²¹KALA M.

¹LABORATOŘ EXPERIMENTÁLNÍ MEDICINY PŘI DĚTSKÉ KLINICE LF UP A FN OLMOUC
²MASARYKŮV ONKOLOGICKÝ ÚSTAV A UNIVERZITNÍ ONKOLOGICKÉ CENTRUM V BRNĚ
³KLINIKY LF UP A FN OLMOUC
⁴ÚSTAV FYZIOLOGIE LF UP OLMOUC
⁵NEUROCHIRURGICKÁ KLINIKA LF UP A FN OLMOUC

• Korespondující autor: Laboratoř experimentální medicíny při Dětské klinice LF UP a FN Olomouc, Puškinova 6, 775 20 Olomouc.
E-mail: hajducnm@atlas.cz

Souhrn: Předmětem studia bylo testování rezistence nádorových buněk na cytostatika v *in vitro* podmínkách cytotoxickým MTT testem. Studovaný soubor obsahoval 745 solidních tumorů. Úspěšnost provedení testu byla v největší míře ovlivněna počtem vitálních nádorových buněk, které se podaří získat z dodaného materiálu, méně pak jeho případnou bakteriální kontaminací. Vyšetření bylo proveditelné u 75.65 % pacientů s diagnózou karcinomu prsu, u 92.41 % nemocných s nádorem plic, 77.90 % pacientů s karcinomem jícnu a žaludku, u 79.66 % nemocných s kolorektálním karcinomem, u 76.62 % maligních nádorů mozku, 78.30 % pacientů se sarkomem a 81.66 % ovariálních nádorů. U zmíněných diagnóz s dostatečným množstvím patientských vzorků vyšetřených na jednotlivá cytostatika (> 10 vyšetřených nádorů) byly tyto hodnoty podrobněji analyzovány. Účinnost testovaných léků v *in vitro* podmínkách pro jednotlivé nádory byla vyhodnocena pomocí TCS₅₀ (tumor cell survival 50 %) mediánu. Pacienti s TCS₅₀ nad mediánem jsou považováni za rezistentní, pokud je individuální hodnota TCS₅₀ pod mediánem citlivosti pro danou diagnózu, jsou hodnoceni jako senzitivní. Naše předběžná data naznačují rozdílnost profilu lékové citlivosti pacientů s různými nádorovými onemocněními a nepřímo potvrzují rozdílnou mini *in vivo* odpověď těchto léků použitých v monoterapii.

Klíčová slova: MTT-test, chemosenzitivita, chemorezistence, mnohočetná léková rezistence, solidní nádory

Summary: We have analyzed *in vitro* drug resistance in 745 solid tumors by means of cytotoxic MTT-assay. The successful performance of the drug resistance assay, mainly depended on vitality of isolated tumor cells and/or their bacterial contamination. The test was successfully performed in 75.65% patients with breast carcinoma, 92.41% lung carcinoma, 77.90% oesophageal and stomach carcinoma, 79.66% colorectal carcinoma, in 76.62% malignant brain tumors and 78.30% patients with sarcoma. The sensitivities of individual anti-cancer drugs with sufficient quantity of patient samples (>10) were analyzed in all above mentioned diagnoses. The effectiveness of tested cytotoxic drugs under *in vitro* conditions for each carcinoma was determined by evaluating median of individual TCS₅₀ values (50% tumor cell survival). The patients with TCS₅₀ above median are drug resistant, while those with TCS₅₀ below median are considered as drug sensitive. Our preliminary data suggest for different drug sensitivity profiles of patients suffering from various malignant diseases, indirectly confirming different *in vivo* response rates when those drugs are used in monotherapy.

Key words: MTT-assay, chemosensitivity, chemoresistance, multidrug resistance, solid tumors

ÚVOD

Výběr nejúčinnějších cytostatik pro individualizovanou chemoterapii na základě prediktivních *in vitro* testů se stává na specializovaných pracovištích součástí klinické praxe. Mezi často používané testy patří pro svoji jednoduchost, přesnost, reprodukovatelnost a cenovou přijatelnost již řadu let MTT (3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazoliumbromid) test (1). Mosmann byl první kdo popsal poloautomatický kolorimetrický test na vyhodnocení mitochondriální dehydrogenázové aktivity v živých buňkách (2). MTT test je také široce používán k testování nových protinádorových léčiv na primárních nádorových buňkách i na stabilizovaných buněčných liniích. Bohužel dodnes není MTT test široce rozšířen v klinické praxi pro některé nevýhody této metody a pro nedostatek hodnotných klinických dat. Na druhé straně řada studií prokazuje dobrou korelaci mezi *in vitro* chemosenzitivitou a klinickou odpovědí nemocného na léčbu *in vivo*. Cílem předkládaného sdělení je v krátkosti ukázat několikaleté výsledky produkované naší laboratoří, které nám dnes již umožňují odhadnout citlivost nemocného s danou diagnózou na základě srovnání jeho individuální hodnoty s mediánem citlivosti pro danou diagnózu.

MATERIÁL A METODIKA

Soubor pacientů

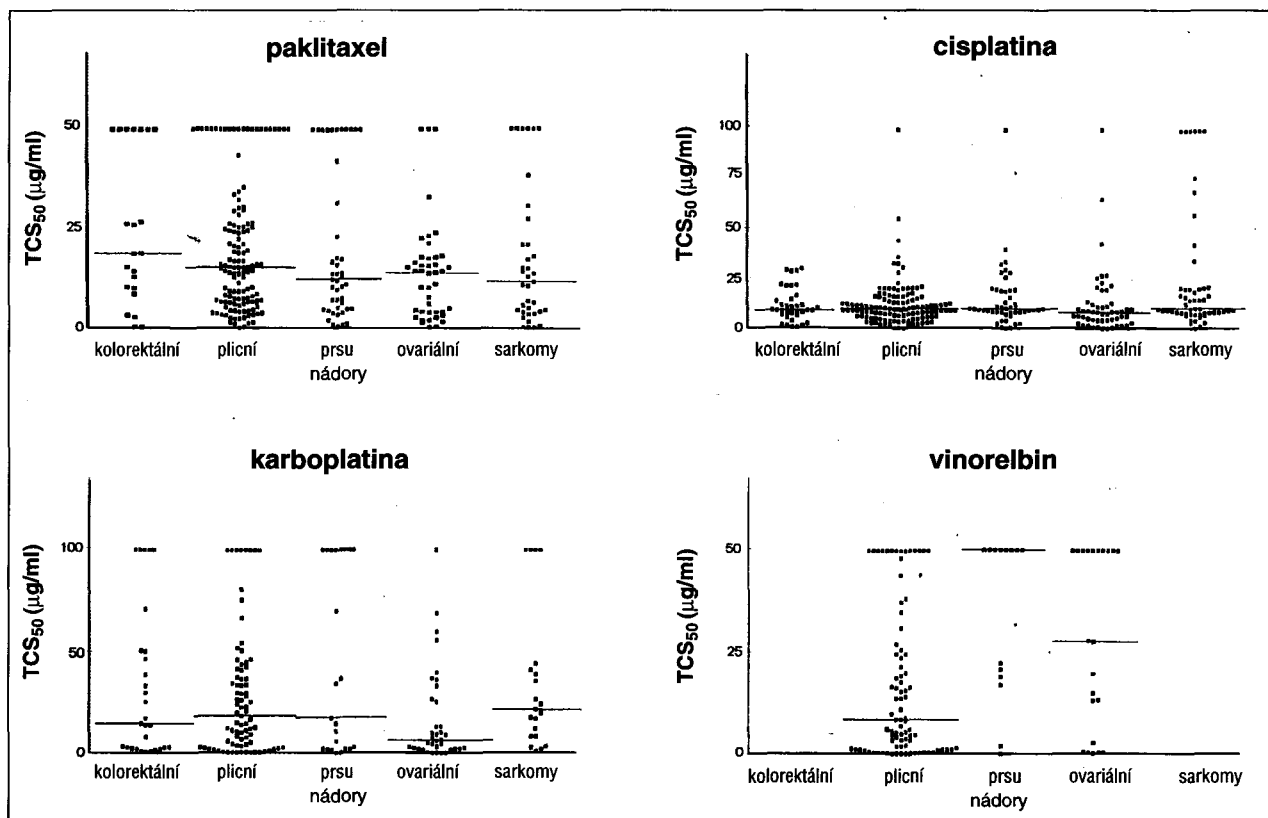
Tisíc sedm set patientských vzorků z různých částí České republiky bylo dovezeno a testováno v naší laboratoři. Kostní dřeň, periferní krev nebo nádorové tkáně byly přivezeny v transportním médiu během osmi hodin po biopsii. Všechny vzorky byly testovány jako čerstvé nádory. Histopatologické diagnózy byly stanoveny podle standardních postupů založených na cytomorfologii, histochemii, imunohistochemii, imunofenotypizaci a cytogenetice.

MTT test

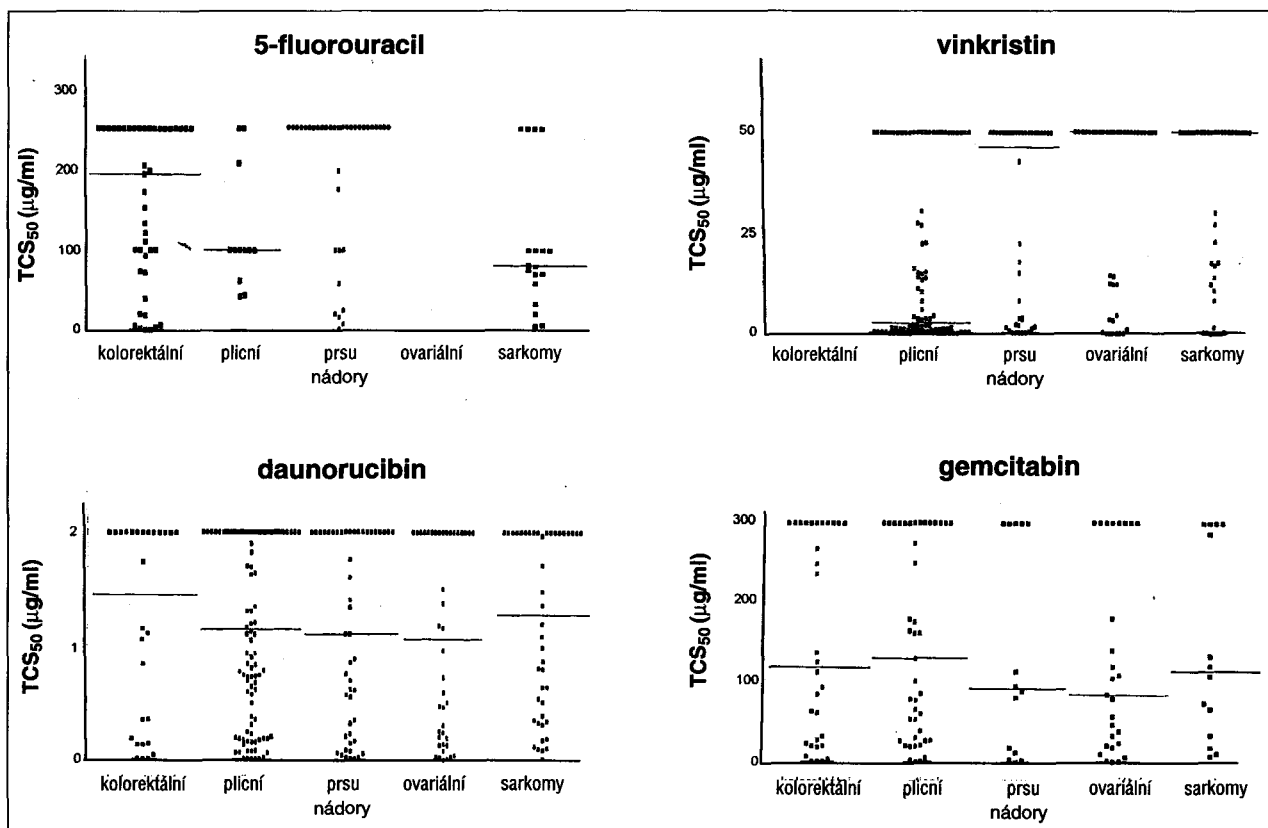
K analýze *in vitro* senzitivity nádorových buněk na cytostatika byl použit řídící MTT test. Suspenze vitálních nádorových buněk byla získána z dodaných vzorků použitím enzymatického trávení a gradientovou centrifugací na hustotním gradientu Ficoll-Meta-trizoát (1,077 g/ml; Pharmacia, Švédsko). Buňky byly dvakrát promývány v RPMI 1640 [2 mM glutamin, bikarbonát sodný, penicilin (100 U/ml) a streptomycin (100 µg/ml)] (Sigma, USA). Po druhém promytí byla buněčná peleta suspendována v kultivačním médiu [RPMI 1640 s 2 mM glutaminem bikarbonátem sodným, penicilinem (100 U/ml), a streptomycinem (100 µg/ml) (Sigma, USA), 15% fetální hovězí sérum (Biocom, CR), 5 µg/ml inzulinu a 5 µg/ml transferinu] v konečné koncentraci 1–2x10⁶/ml. 80 ml buněčné suspenze bylo kapáno do 96-jamkových panelů obsahujících 20 µl vhodné naředěné cytostatika. Nádorové buňky byly vystaveny působení každého léčiva ve dvou opakováních a v šesti různých koncentracích po dobu tří dnů při 37 °C, 5% CO₂. Kontrolní nádorové buňky byly kultivovány bez použití cytostatik. Na závěr kultivace bylo ke každé jamce přidáno 10 µl MTT (5 mg/ml) a inkubováno dalších šest hodin. Žlutá tetrazoliová sůl byla redukována na modrý formazan pouze živými buňkami. Formazanové krystaly byly rozpuštěny pomocí 100 µl 10% vodního roztoku do laurylsulfátu sodného (pH = 5.5) přes noc při 37 °C. Optická denzita (OD) byla měřena při 540 nm pomocí přístroje Labsystem iEMS Reader MF (UK). Přezívání nádorových buněk (tumor cell survival, TCS) bylo vypočítáno pomocí následujícího vzorce:

$$TCS = \frac{\text{absorbance v jamkách s cytostatiky}}{\text{absorbance v kontrolních jamkách}} \times 100$$

TCSTM hodnotaje koncentrace cytostatik letální pro 50% nádorových buněk a byla vypočítána ze získaných křivek dávkové závis-



Obrázek 1: Individuální hodnoty (čtverečky) a jejich mediány (plná čára) TCS₅₀ pro paklitaxel, cisplatinu, karboplatinu a vinorelbin u pacientů s uvedenými nádorovými diagnózami.



Obrázek 2: Individuální hodnoty (čtverečky) a jejich mediány (plná čára) TCS₅₀ pro 5-fluorouracil, daunorubicin, gemcitabin a vinkristin u pacientů s uvedenými nádorovými diagnózami.

Tabulka 1 Spektrum léků testovaných a různých maligních onemocnění v pořadí důležitosti

Typ nádoru	Ca. plic	Ca. prsu	Ca. ovaria	Ca. kolorekta	Lymfomy	Maligní nádory mozku	Ca. jícnu a žaludku	Sarkomy	Ostatní*
Počet pacientů	178	91	60	65	81	45	50	69	278
	Karboplatina	Daunorubicin	Cisplatina	5-fluorouracil	Vinkristin	BCNU	5-fluorouracil	Cisplatina	**
	Paklitaxel	Vinkristin	Paklitaxel	Oxaliplatina	Prednisolon	Vinkristin	Mitomycin C	Daunorubicin	**
	Vinorelbin	Cisplatina	Karboplatina	Gemcitabin	Daunorubicin	Prokarbazin	Cisplatina	Vinkristin	#
	Cisplatina	Paklitaxel	Doxorubicin	Topotekan	Vepesid	Vepesid	Daunorubicin	Vepesid	**
	Gemcitabin	5-fluorouracil	Gemcitabin	Cisplatina	Asparagináza	Cisplatina	Bleomycin	Aktinomycin	**
	Vepesid	Karboplatina	Topotekan	Karboplatina	Bleomycin	Paklitaxel	Karboplatina	Paklitaxel	**
	Docetaxel	Docetaxel	Vepesid	Mitomycin C	Kladribin	Gemcitabin	Oxaliplatina	Topotekan	**
	Doxorubicin	Vinorelbin	Vinorelbin	Daunorubicin	Dexamethason	Karboplatina	Topotekan	Dakarbazin	**
	Daunorubicin	Bleomycin	Vinkristin	Bleomycin	Cytosinarabinosid	Dakarbazin	Gemcitabin	Gemcitabin	**
	Topotekan	Gemcitabin	Daunorubicin	Paklitaxel	6-thioguanin	Daunorubicin	Paklitaxel	Karboplatina	**
	Aktinomycin	Topotekan	Mitoxantron	Vepesid	Mitoxantron	Aktinomycin	Vepesid	Docetaxel	**
	Vinkristin	Aktinomycin	Aktinomycin	Dakarbazin	Flutarabin	6-thioguanin	Dakarbazin	5-fluorouracil	**

* - nádory pankreatu, Grawitzův tumor, neuroblastomy, zhoubné melanomy, jaterní nádory, nádory prostaty, Ewingův sarkom, atd.
** - Cytostatika jsou v různém pořadí jejich použití pro každý nádor a pacienta

Tabulka 2: Profil lékové citlivosti *in vitro* podmínkách pro různé maligní nádory podle mediánů TCS₅₀ [mg/ml] (počet testovaných vzorků je uveden v závorkách)

	Zhoubné nádory mozku	Ca. jícnu a žaludku	Ca. kolorekta	Ca. plic	Ca. prsu	Sarkomy	Ca. ovaria
5-fluorouracil	222 (9)	100.00 (22)	193.60 (43)	100.00 (12)	250.00(37)	80.30(18)	ND
Cisplatina	8.92 (33)	9.97 (21)	8.70 (36)	9.58 (123)	9.86 (47)	10.13(55)	8.32 (53)
Karboplatina	24.60(24)	7.71(11)	14.99 (29)	18.28 (81)	17.64 (23)	21.61(21)	5.20 (36)
Aktinomycin D	0.115(24)	ND	0.07(11)	0.04 (79)	0.085 (20)	0.27 (24)	ND
Vinkristin	50.00 (34)	ND	ND	2.66 (94)	46.39 (40)	50.00 (39)	50.00(40)
Vepesid	50.00(34)	50.00(11)	50.00(18)	50.00 (103)	ND	49.14(36)	50.00 (40)
Paklitaxel	13.22(29)	15.29 (15)	18.60(22)	15.22(131)	12.18 (45)	11.58(37)	13.82 (43)
Docetaxel	ND	ND	ND	21.96 (66)	13.93(21)	ND	ND
Bleomycin	ND	9.47(11)	50.00 (15)	46.93 (14)	50.00(19)	ND	ND
Doxorubicin	ND	ND	ND	2.00 (73)	2.00(15)	2.00(15)	ND
6-thioguanin	11.60(15)	ND	ND	ND	11.60(15)	ND	ND
Daunorubicin	2.00 (24)	1.79(17)	1.44(28)	1.14(104)	1.10(49)	1.27(44)	1.06(42)
Dakarbazin	234.80 (20)	185.20(10)	226.70(16)	260.30(14)	192.80(10)	236.30 (25)	ND
Gemcitabin	300.00 (25)	300.00(10)	118.40(32)	129.70(43)	91.53(14)	113.70(14)	ND
Mitomycin	ND	3.31 (21)	10.00(29)	3.47 (57)	ND	2.47 (57)	ND
Vinorelbin	ND	ND	ND	8.37 (86)	50.00 (14)	ND	ND
Topotekan	0.47 (17)	25.41 (10)	2.36(31)	0.96 (74)	0.93 (15)	1.62(14)	ND

ND - zatím nestanoveny s ohledem na malý počet vyšetřených vzorků

losti. Skupinová statistika naměřených dat byla provedena v programu Prisma, verze 2.0.

VÝSLEDKY

Celkem jsme analyzovali *in vitro* lékovou rezistenci u 745 solidních tumorů pomocí cytotoxického MTT testu na rozdílná protinádorová léčiva. Ve spolupráci s klinickými pracovišti bylo vypracováno pořadí důležitosti vyšetřování cytostatik pro jednotlivé diagnózy, které respektují složení rutinních protokolů, lokální zvyklosti a také limitní možnosti testů chemosensitivity, kde některá léčiva (např. cyklofosamid, methotrexát, interferon alfa) nelze *in vitro* vyšetřit (tabulka 1). Dle pořadí v této tabulce jsou u jednotlivých diagnóz přednostně nasazována cytostatika v závislosti na množství dodaného klinického materiálu. Úspěšnost provedení testů lékové rezistence hlavně závisela na

vitalitě izolovaných nádorových buněk a jejich případné bakteriální kontaminaci. Test byl úspěšně proveden u 75.65% pacientů s diagnózou karcinomu prsu, u 92.41% nemocných s nádorem plic, 77.90% pacientů s karcinomem jícnu a žaludku, u 79.66% nemocných s kolorektálním karcinomem, v 76.62% maligních nádorů mozku, 78.30% pacientů se sarkomem a 81.66% nádorů ovarií. Část nádorů spontánně odumřela *in vitro* po nasazení do testu i v kontrolních jamkách bez použití cytostatika a tato skutečnost je sama o sobě považována za dobrý prognostický znak. Střední citlivosti jednotlivých nádorů a jejich mediány jsou zobrazeny v tabulce 2 a na obrázku 1 a 2.

DISKUSE

Z výsledků uvedených v tabulce 2, na obrázku 1 a 2 je zřejmá řada zajímavých informací. Vidíme například, že cytostatika exporto-

vána P-glykoproteinem jsou poměrně málo účinná u nádorů, které vykazují jeho vysokou expresi. Typickým příkladem je kolo-
rektální karcinom a jeho relativní rezistence na vinca alkaloidy,
daunorubicin a paklitaxel. Naopak citlivost tohoto nádoru na
netransportovaná cytostatika (deriváty platiny, gemcitabin) zůstá-
vá zachována (tabulka 2, obrázek 1 a 2). V podstatě lze říct, že v in
vitro podmínkách mají poměrně vyrovnanou citlivost napříč růz-
nými diagnózami následující cytostatika: deriváty platiny, pakli-
taxel, daunorubicin, gemcitabin, mitomycin, topotekan, aktino-
mycin D. Vinca alkaloidy vykazovaly vysokou preferenci
k plicním nádorům a navelbin také k nádorům ovariálním. Přek-
vapivě nízkou citlivost karcinomů prsu na vinkristin a vinorel-
bin, ale také 5-fluorouracil vysvětlujeme tím, že velká část vyšet-
řených nádorů byla od klinicky rezistentních pacientek, které
v minulosti vystřídalý několik režimů chemoterapie.

Ve srovnání s dobrou účinností daunorubicinu, byla efektivita
doxorubicinu minimální s TCSTM nad 2 mg/ml (tabulka 2), i když
nezanedbatelná část pacientů byla na toto cytostatikum dobře cit-
livá. Ze vzájemného porovnání Cisplatiny s karboplatinou vyplý-
vá obecně lepší cytotoxicita Cisplatiny s výjimkou diagnóz karci-
nomů jícnu, žaludku a ovaria.

Ačkoliv jsme zjistili poměrně dobrou účinnost v in vitro podmín-
kách pro inhibitor topoizomerázy II - daunorubicin, účinnost vepe-
sidu byla u solidních nádorů podstatně nižší. Na druhé straně, inhi-
bitor topoizomerázy I (topotekan) i duální inhibitor topoizomerázy

I a II (aktinomycin D) byly dobře účinné napříč většinou diagnóz
(tabulka 2, obrázek 1 a 2). Bohužel látky s duální inhibicí topoi-
zomerázy I i II bývají v klinické praxi poměrně toxické.

Stanovení mediánových hodnot pro jednotlivá cytostatika a jed-
notlivé klinické diagnózy nám umožňuje přesnější predikci odpo-
vědi in vivo. Předpokládáme lepší klinickou odpověď u nemoc-
ných, jejichž hodnota TCSTM se pohybuje pod mediánem citlivosti
a nádory těchto nemocných hodnotíme jako in vitro sensitivní.
Nádorové buňky od nemocných s TCS₅₀ nad mediánem citlivosti
označujeme jako rezistentní. Uvědomujeme si, že tato hodno-
tící metoda není dokonalá, ale při přechodné absenci klinických
údajů je pravděpodobně to nejlepší co máme k dispozici. Po ukon-
čení korelačních studií s odpovědí in vivo bude možné tyto refe-
renční hodnoty pro citlivost/rezistenci dále upřesnit.

Poděkování

Práce je podporována z vědecko výzkumného záměru MŠMT
J 14/98: 151100001, grantem IGA MZ 4132-5 a Nadací pro
výzkum rakoviny v Olomouci.

Literatura

1. Hajdich, M., Mihál, V., Minařík, J., Fáber, E., Šafářová M., Weigl, E., Antálek,
P.: Decreased in vitro chemosensitivity of tumor cells in patients suffering from
malignant diseases a poor diagnosis. Cytotechnology, 1996, 19, 243-245
2. Mosmann T.: Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: appli-
cation to proliferation and cytotoxicity assays. J. Immunol. Meth. 65:55-63.1983

VÝSLEDKY MTT TESTŮ CHEMORESISTENCE U KARCINOMŮ PLIC, KOLOREKTA A SARKOMŮ MĚKKÝCH TKÁNÍ

RESULTS OF THE MTT CHEMORESISTANCE TESTING IN CARCINOMAS OF LUNG, COLON AND RECTUM AND SOFT TISSUE SARCOMAS.

ŽALOUĐÍK J., HAJDÚCH M., VYZULA R., KISS I., ČOUFAL O., KOCÁKOVÁ I., NOSKOVÁ V., VOREL M., FEKETOVA M., KOUZMINA G., VOMELA J., JANÍČEK P.

UNIVERZITNÍ ONKOLOGICKÉ CENTRUM BRNO - MASARYKŮV ONKOLOGICKÝ ÚSTAV, ODDĚLENÍ KLINICKÉ ONKOLOGIE FN, CHIRURGICKÁ KLINIKA FN, I. ORTOPEDICKÁ KLINIKA FN U SVATÉ ANNY, LABORATOŘ EXPERIMENTÁLNÍ MEDICÍNY FN OLOMOUČ

Korespondující autor: Jan Žaloudík, Masarykův onkologický ústav, Žlutý kopec 7, Brno 656 53, e-mail: zaloudik@mou.cz

Souhrn: Autoři uvádějí orientační informaci o stupni chemoresistence in vitro u 60 primárně resekovaných bronchogenních karcinomů, karcinomů kolorekta a sarkomů měkkých tkání s využitím technologie primokultivace a MTT testu. Primární resistance explantovaných buněk bronchogenních karcinomů se projevila v 8% případů u Cisplatiny, 33% u topotecanu, 40% u karboplatiny, 50% u vinorelbínu, 60% u vinkristinu, 82% u paklitaxelu a ve všech případech u doxorubicinu, mitomycinu a fluorouracilu. Ze sledovaných kombinací byla in vitro neúčinnější kombinace Cisplatiny s topotekánem (50%) a Cisplatiny s vinorelbínem (43%). Z výsledků MTT testů in vitro u kolorektálního karcinomu vyplývá především relativní úspěšnost platinových derivátů. Poměrně vysoká rezistence vůči základnímu cytostatiku 5-fluorouracilu je závažná, nicméně odpovídá oněm 20% klinické účinnosti nepotencovaného preparátu. S 22 testovaných sarkomů (23%) vykazovalo polychemorezistenci, tedy přežívání ve všech testovaných cytostatikách. U ostatních byla nejnížší chemorezistence zaznamenána pro aktinomycin D, topotekan a cisplatinu. K doxorubicinu bylo resistantních plných 80% sarkomů. Zbývá nejen získávat více zkušeností s tímto individualizovaným přístupem k indikacím chemoterapie, nýbrž především navodit klinickou diskusi o interpretaci prediktorů chemorezistence, včetně potřebných korelačních klinických studií.

Klíčová slova: chemoresistence nádorů, MTT test, karcinom plic, kolorektální karcinom, sarkomy měkkých tkání

Summary: Preliminary information is presented on outcomes of in vitro MTT chemoresistance testing in 60 carcinomas of lung, colon and rectum and soft tissue sarcomas. Primary chemoresistance could be observed in lung carcinomas in 8% for cisplatin, 33% for topotecan, 40% for carboplatin, 50% for vinorelbine, 60% for vincristine, 82% for paclitaxel and in all cases for doxorubicine, mitomycin C and 5-fluorouracil. The most successful combinations were cisplatin plus topotecan and cisplatin with vinorelbine. The platinum analogues were the most efficient drugs in vitro also in colorectal carcinoma. The chemoresistance to 5-fluorouracil approaching to 80% corresponds to some 20% effectivity of this drug observed in clinical studies with standard 5-FU regimens. Five of twenty two soft tissue sarcomas showed chemoresistance to all tested drugs. In remaining 17 cases the lowest resistance was reported for actinomycin D, topotecan and cisplatin. 80% sarcomas were resistant to doxorubicine. Not only more experience is needed with this individualized approach to cancer chemotherapy, but also contribution of clinicians on interpretation of testing and correlation studies of tailored chemotherapy.

Key words: tumor chemoresistance, MTT test, lung cancer, colorectal carcinoma, soft tissue sarcoma

Úvod

Je-li daný nádor vůči podávanému cytostatiku resistantní, pak bez ohledu na statistické výsledky randomizovaných studií

- a) nelze u daného jednotlivce očekávat léčebný efekt,
- b) pacient je zbytečně otravován toxickou látkou a trpí zcela zbytečně nežádoucími účinky,
- c) jde o neúčelné vynakládání finančních prostředků i sil zdravotnických pracovníků,
- d) průběh onemocnění může být dokonce i zhoršen zbytečným oslabením metabolismu a přirozených obranných mechanismů nemocného, případně vznikem dalších mutací v nádoru, perturbací jeho proliferace a vývojem nepříznivých diversifikačních změn.

Přímé testy chemorezistence jsou založeny na expozici primárních nebo stabilizovaných kultur nádorových buněk cytostatikům in vitro a patří k nim i standardní MTT test. Přesto, že řada testů chemorezistence je nabízena i komerčně, nejsou oficiálně akceptovanou součástí terapeutického rozhodování v klinické onkologii, je jim vytýkána nestandardnost, rozdíly v interpretaci, interlaboratorní variabilita metod i výsledků. Klinická onkologie však učinila dosud jen málo, aby pomohla tyto problémy překonat a sama vyšla s kritérii pro jejich indikace a interpretace.

Pokusili jsme se o hrubou orientaci o stupni chemoresistence in vitro resekovaných bronchogenních karcinomů, karcinomů kolorekta a sarkomů měkkých tkání s využitím technologie primokultivace a MTT testu, která je zavedena v Laboratorii experimentální medicíny v Olomouci dr. Hajdúchem.

Chemorezistence bronchogenních karcinomů

Chemoterapie pokročilých bronchogenních karcinomů je dosud málo úspěšná. Z velkých přehledů vyplývá, že nejlepších výsledků při hodnocení procentem nemocných přežívajících jeden rok po léčbě je dosaženo v monoterapii cisplatinou (24%) či lépe kombinacemi Cisplatiny s etoposidem (32-37%), s vinorelbínem (36%), s paklitaxelem (32-39%) nebo s gemcitabinem (39%) (1). Minimálně dvě třetiny bronchogenních karcinomů jsou však k chemoterapii resistantní a léčba je v těchto případech zbytečnou zátěží pro nemocného i zdravotní systém. Může být pokládáno za překážku individualizovaného přístupu, že v době léčby pokročilého onemocnění jsou bronchogenní i jiné karcinomy málokdy přístupné biopsií potřebného množství nádorové tkáně.

Potřebné množství vitálních buněk bronchogenních karcinomů pro explantaci z fragmentů nádorové tkáně větších než 1 cm³, trans-

ponovaných v kulturačním médiu do laboratoře přímo z operačního sálu a disagregovaných do 3-4 hodin po odběru, jsme získali u 12 ze 14 vyšetřených případů (86%). Podle výtečnosti buněk ze vzorku mohlo být v testu nasazeno v několika koncentracích 3-11 cytostatik. Cisplatina byla nasazena do testu ve všech 12 případech, paclitaxel 11, vinorelbin a ostatní cytostatika v nejvíce 8 případech. Primární resistance explantovaných buněk bronchogenních karcinomů se projevila v 1/12 (8%) u Cisplatiny, 2/6 (33%) u topotecanu, 2/5 (40%) u karboplatiny, 4/8 (50%) u vinorelbínu, 3/5 (60%) vinkristinu, 9/11 (82%) u paklitaxelu a ve všech (100%) případech u doxorubicinu, mitomycinu, fluorouracilu a dalších u plicních karcinomů méně užívaných cytostatik.

Ze sledovaných kombinací byla in vitro neúčinnější kombinace Cisplatiny s topotecánem (50%) a Cisplatiny s vinorelbínem (43%). Skutečná biologická účinnost je však nesporně nižší, protože jako citlivé jsme hodnotili in vitro i případy omezené citlivosti, kdy účinek cytostatik přežívala určitá menší část (20-30%) populace nádorových buněk. Rezistentní subpopulace mohou být léčbou in vivo selektovány a účinnost chemoterapie je tak pouze dočasná, což dokládá ostatně i praktická klinická zkušenost. Řada klinických rezistencí jde rovněž na vrub nedostatečné koncentrace cytostatik v tkáni z důvodu variabilní vaskularizace nádoru a dalších biomodulačních faktorů.

Preference cytostatik v testech in vitro, tedy zvláště Cisplatiny, zhruba odpovídá výsledkům klinických studií. Pokud bychom však užívali pouze chemoterapii na základě statistické pravděpodobnosti, zůstane nadále limitována pouze třetinovou účinností a část nemocných ztrácí naději na příznivý efekt třeba statisticky málo pravděpodobného, individuálně však účinného cytostatika nebo kombinace. Cílem našeho snažení je postupně korelovat výsledky testů in vitro s odpovědí na léčbu in vivo, aniž bychom zatím jakkoli měnili přijaté léčebné protokoly. Získat tyto korelace je však velmi obtížné z několika důvodů: 1) testovány jsou především resekované nádory stadia I a II, ne vždy navazuje adjuvantní chemoterapie, pokud ano, trvá zhodnocení několik let a pro průkaz je zapotřebí velkých souborů, 2) extrapolace výsledků testů získaných z primárního nádoru pro srovnání s léčbou následné rekurence nemusí být relevantní, recidiva a pokročilý proces jsou více divergentní a zřejmě rezistentnější, 3) v krátkodobém čtyřdenním testu chemorezistence mohou být znevýhodňována cytostatika, která pro rozvinutí svého účinku vyžadují masivní proliferaci nádorových buněk, a to jsou například mitotické jedy vinca alkaloidy a taxany, 4) biopsie pokročilých inoperabilních nádorů, byť miniinvazivní endoskopické

a thorakoskopické, před chemoterapií nebo během ní, nejsou dosud pokládány za eticky oprávněné právě pro chybějící korelace testů s klinikou, čímž se kruh uzavírá v neprospěch individualizované léčby.

Chemorezistence kolorektálního karcinomu

Účinnost pašalizované či standardní chemoterapie se pohybuje u kolorektálního karcinomu mezi 20-30%, jen výjimečně je o málo vyšší (2). Z 33 kolorektálních karcinomů se podařilo bez kontaminace získat krátkodobou kulturu v 26 případech. Podle výtěžnosti bylo pro pět koncentrací hodnoceno 1-15 cytostatik, a to od základních jako je 5-fluorouracil, přes platinové deriváty, inhibitory topoizomeráz, mitomycin, mitotické jedy, antracykliny až po ostatní klinicky v terapii gastrointestinálních nádorů neužívané. Rezistence byla hodnocena jako absolutní tehdy, přežívala-li v cytostatiku celá kultura bez problémů, nebo relativní, avšak biologicky a klinicky patrně stejně významná, kdy efekt byl patrný pouze na části buněk.

V následujícím přehledu uvádíme zlomkem počet rezistentních nádorů k počtu testovaných, první zlomek pro každé cytostatikum platí pro absolutní, druhý pro relativní chemorezistenci:

5-fluorouracil (20/25,23/25)
cis-platina (67/21,7/21), karboplatina (10/19,11/19), oxaliplatina (4/6,5/6)
topotekan (6/17,14/17)
mitomycin C (15/19,16/19)
bleomycin (8/11,10/11)
dakarbazin (9/11,10/11)
gemcitabin (15/17,17/17)
doxorubicin (4/5, 4/5), daunorubicin (15/18, 17/18), aktinomycin D (3/9,6/9)
vinkristin (7/8, 8/8)
vepesid (12/12,12/12)
paklitaxel (14/15,15/15).

Z výsledků vyplývá především relativní úspěšnost platinových derivátů, které jsou u kolorektálního karcinomu patrně neprávem přehlíženy, neboť i klinické zkušenosti kombinace FU a platiny jsou povzbudivé. Vysoká rezistence vůči základnímu cytostatiku 5-fluorouracilu je zářející, nicméně se blíží oněm 20% klinické účinnosti nepotencovaného preparátu. Není ovšem vyloučeno, že antimetabolity jsou ve srovnání s platinovými deriváty v krátkodobé kultuře, která nerozvinula proliferaci aktivitu, znevýhodněny. Na toto téma pokračují experimenty i diskoze o optimálním trvání testu a primokultury. Relativně dobrých výsledků dosáhl in vitro i topotekan. Významný je nále, že z 21 kolorektálních karcinomů testovaných na 5 a více cytostatik, byla pouze ve dvou případech nalezena plná polychemorezistence, takže u 19 případů bylo vždy možno určit alespoň jedno potenciálně účinné cytostatikum. To snad dává perspektivu pro účinnější chemoterapii tailoringem i při využití stávajícího lékového arzenálu.

Chemorezistence sarkomů měkkých tkání

Chemoterapie je u sarkomů měkkých tkání velmi neúspěšná jak v monoterapii, tak v kombinacích (3).

Explantáty sarkomů se podařilo převést do primokultury u 22 z 29 případů, tedy s 76% úspěšností. Podle buněčnosti nádoru, respektive výtěžnosti buněk testovaných ve dvojicích pro šest koncentrací každého cytostatika spolu s kontrolami byly do testu nasazeny různé počty cytostatik z níže uvedeného panelu. Minimálně bylo testováno pět u sarkomů neužívanějších cytostatik, v průměru se podařilo testovat 9 cytostatik na jeden explantát. Koncentrační škála byla volena tak, aby zahrnovala klinicky dosažitelné koncentrace cytostatika v séru a minimálně jeden řád pod a nad tyto koncentrace. Výsledky testů jsou shrnuty procentuálně v tabulce.

Žádný ze sarkomů nebyl citlivý na všechna testovaná cytostatika. Naopak 5 z 22 sarkomů (23%) vykazovalo polychemorezistenci, tedy přežívání ve všech testovaných cytostatikách. Absolutní rezistence znamená, že všechny nádorové buňky přežívaly v cytostatiku v míře srovnatelné s kontrolami bez cytostatika. Je velmi nepravděpodobné, že při aplikaci cytostatika, v němž buňky bez problému přežívají in vitro, by mohlo být dosaženo efektu in vivo, tedy klinické odpovědi vezmeme-li v úvahu další problémy spojené s distribucí, dostupností a metabolismem chemoterapeutika v organismu. Lze se domnívat, že přímá interpretace absolutní chemorezistence z testu in vitro do klinické situace je možná. Tuto otázku je třeba dále intenzivně studovat, zatím jsme ovšem nezaznamenali ani u jiných nádorových typů situaci, kdy by byl pozorován klinický efekt při nalezené chemorezistenci in vitro.

Složitější je interpretovat částečnou senzitivitu primokultury, respektive pouze částečnou chemorezistenci. V daném cytostatiku přežívá jen část buněk, část hyne. Přestože omezená citlivost znamená in vivo ve skutečnosti neúčinnost chemoterapie přerůstáním rezistentní sub-

Tab.: Výsledky MTT testu chemorezistence in vitro u 22 sarkomů měkkých tkání v %

Cytostatikum	abs. rezistence	relat. senzitivita	abs. senzitivita
Doxorubicin	80	20	20
Daunorubicin	67	33	33
Actinomycin D	0	100	50
Cis-platina	35	65	45
Carboxy-platina	67	33	33
Vincristin	60	40	10
Paklitaxel	65	35	18
Docetaxel	80	20	20
Fluorouracil	67	33	33
Gemcitabin	70	30	0
Vepesid	87	13	13
Topotecan	0	100	63
Bleomycin	25	75	25
Mitomycin C	67	33	33
Dakarbazin	92	8	0

populace, nelze vyloučit, že částečný efekt bude mít hodnotitelný přínos třeba v oddálení progresu nádoru. Velkou opatrnost je zatím třeba projevovat při interpretaci absolutní citlivosti, kdy in vitro hynou v daném cytostatiku při klinicky dosažitelné koncentraci všechny nádorové buňky. Jak již bylo řečeno, nemusí být in vivo dosaženo tak optimální koncentrace v nádorové tkáni ani dostatečné doby kontaktu nádorových buněk s cytostatikem. Klinická účinnost bude proto určitě výrazně nižší než testovaná chemosenzitivita.

Ve výsledcích překvapuje především vysoká míra rezistence na doxorubicin, který je stále u sarkomů neužívanějším cytostatikem. Na druhé straně však nebyla jeho prokázána klinická účinnost nikdy výrazně vyšší než právě oněch 20%. Překvapuje také vysoká rezistence k dakarbzinu, který byl součástí dříve užívané cytostatické kombinace CYVADIC. Nejvyšší absolutní citlivost byla in vitro zjištěna u aktinomycinu D, topotekanu a cis-platiny, které se ve starších i novějších klinicky užívaných režimech rovněž objevují.

Z tabulky je zřejmé, že nejnižší podíl rezistentních nádorů se vyskytuje u aktinomycinu D, platinových derivátů a inhibitoru topoizomeráz topotekanu. Potvrzena se zdá být také vysoká účinnost aktinomycinu D, který byl v režimech chemoterapie u nádorů dospělého věku zřejmě neprávem vypuštěn. Naopak překvapuje vysoká rezistence vůči doxorubicinu, který je sice hojně, avšak ne zcela úspěšně používán u sarkomů v první linii. Celkově výsledky svědčí proti klasickému režimu CYVADIC a ve prospěch režimu ICE.

Je třeba podotknout, že klinickou odpověď na cytostatika, která byla v individuálním MTT testu označena za neúčinné jsme v uvedeném souboru 22 sarkomů nepozorovali, což podporuje užitečnost stanovení chemorezistence in vitro jako bioparametru jakkoli je ještě třeba dopracovat kvantitativní vyhodnocování testů.

Závěr

Uvedli jsme přehled výsledků dosažených u tří typů resekovaných zhoubných nádorů bez předchozí léčby. Šlo především o to dokumentovat, že tento postup je možný u vysokého procenta případů a nabízí nenáhodné rozložení výsledků testů chemorezistence in vitro, jejichž validita je však třeba teprve ověřit ve studiích korelujících nálezy s klinickým efektem. Metodický jde o postup náročný, nikoli však neproveditelný. Více individualizované chemoterapie je silným podnětem k překonávání iniciálních překážek spojených jak s metodikou samotnou, tak i změnami v myšlení chirurgů, patologů a klinických onkologů. Zbývá nejen získávat více zkušeností s tímto přístupem, nýbrž paralelně i navodit klinickou diskuzi k interpretacím prediktorů chemorezistence. Neměla by být již primárně z chemoterapie vyloučena u daného pacienta ta cytostatika, vůči kterým vykazuje jejich nádor in vitro absolutní rezistenci? Neměly by být testy chemorezistence brány v úvahu aspoň v případech relabujících po předchozí k úspěšné chemoterapii, kdy další režimy jsou obvykle aplikovány nahodile a zkusmo? Nelepšili-li individualizovaný přístup celkové léčebné výsledky, nestojí za to ho využít aspoň pro negativní selekci a uchránění nemocných zbytečné zátěže spojené s neúčinnou chemoterapií?

(Práce byla podpořena grantem MŠMTNo. J07/98141100003)

Literatura:

- Gandara DR: Current status and novel therapeutic approaches in advanced non-small cell lung cancer. ASCO Educational Book 1999,362-369
- Benson AB: Gastrointestinal oncology. Kluwer Academic Publishers. 1999
- Patel SR, Benjamin RS: New chemotherapeutic strategies for soft tissue sarcomas. Sem Surg Oncol, 17,1999,47-51

VYUŽITÍ IN VITRO ANALÝZY LÉKOVÉ REZISTENCE V LÉČBĚ LEUKÉMIÍ DĚTSKÉHO VĚKU

APPLICATION OF IN VITRO OF DRUG RESISTANCE ASSAYS IN TREATMENT OF CHILDHOOD LEUKEMIA

† MIHÁL V., HAJDÚCH H., JANOŠŤAKOVÁ A., ŠAFÁŘOVÁ M., NOSKOVÁ V., POSPÍŠILOVÁ D., NOVÁK Z.
LABORATOŘ EXPERIMENTÁLNÍ MEDICINY A DĚTSKÁ KLINIKA LFUP A FN OLOMOUC

† korespondující autor: Dětská klinika LF UP a FN Olomouc, Puškinova 6, 775 20 Olomouc

Souhrn: Autoři se snaží shrnout profil *in vitro* rezistence, který byl stanovován pomocí kolorimetrického methyl-thiazol-tetrazoliového (MTT) testu u různých podskupin akutních dětských leukémií a jeho význam pro klinickou praxi.

Klíčová slova: *in vitro* léková rezistence, MTT test, akutní lymfoblastická leukémie, akutní myeloidní leukémie

Summary: The authors try to summarize the *in vitro* resistance profile, measured with the colorimetric methyl-thiazol-tetrazolium (MTT) assay in different subgroups of acute childhood leukemias and its significance for clinical practice.

Keywords: *in vitro* drug resistance, MTT assay, acute lymphoblastic leukemia, acute myeloid leukemia

Díky vývoji účinné kombinace cytostatik se prognóza dětí s leukémií dramaticky zlepšila. Nicméně asi 30% dětí s ALL a 50% dětí s AML umírá na rezistentní nemoc (1). Na druhé straně, pacienti, jejichž nemoc je léčitelná relativně mírnou chemoterapií, podstupují dnes zbytečně intenzivní cytostatickou léčbu, která je obvykle příčinou závažných nežádoucích vedlejších účinků. Je pravdou, že s postupně se zvyšující intenzitou chemoterapie došlo u dětí s akutní leukémií k významnému zlepšení celkových léčebných výsledků. Vzhledem k těmto skutečnostem je identifikace stupně vnímavosti na léčbu považována za jeden z nejdůležitějších faktorů účinné stratifikace. Z těchto důvodů je úsilí řady pracovišť zabývajících se problematikou dětské leukémie směřováno k optimalizaci léčebných protokolů s cílem zabránit vzniku mnohočetné lékové rezistence, k hledání nových diagnostických a prognostických markerů onemocnění, které umožní individualizaci léčby pro jednotlivé pacienty. Pacienti s chemosenzitivním typem leukémie budou výhledově léčeni s minimálně toxickou terapií na rozdíl od pacientů s rezistencí na cytostatika, kteří podstoupí velmi agresivní léčbu.

Po zavedení rychlého kolorimetrického MTT testu (2) na stanovení životnosti a růstových charakteristik buněk *in vitro*, bylo na našem pracovišti vyšetřeno velké množství vzorků kostní dřeně nebo periferní krve od dětí v iniciální fázi nebo v relapsu onemocnění. Byla zorganizována celorepubliková síť dětských onkohematologických pracovišť, odesílajících vzorky od pacientů s akutní leukémií na vyšetření chemorezistence. Vyšetření bylo úspěšně provedeno ve > 75% případů. Procento úspěšnosti provedení MTT testu je srovnatelné s výsledky spolupracujících laboratoří ve Free University Hospital v Amsterdamu. V první fázi experimentální práce jsme otestovali koncentrační rozpětí pro jednotlivá cytostatika a zavedli vyhodnocování MTT testu pomocí originálně vytvořeného počítačového programu. Ve druhé etapě jsme společně s kolegy z jiných evropských pracovišť publikovali výsledky testování chemorezistence dětských pacientů s ALL v iniciální fázi onemocnění a v relapsu. Demonstrovali jsme mnohonásobné zvýšení rezistence leukemických buněk v relapsu onemocnění ve srovnání s iniciální hodnotou (4), u pacientů s různým typem nádorů se špatnou léčitelností jsme prokázali vysokou rezistenci na širokou škálu běžně užívaných cytostatik (16) a u dětských pacientů s ALL, léčených protokolem ALL-BFM 90, jsme analyzovali korelaci některých klinických a laboratorních znaků s lékovou rezistencí (15). Na případu vzácné leukémie z kmenových buněk jsme potvrdili „fenotypickou specifitu profilu rezistence“ v různých fázích (myeloidní/lymfoidní) onemocnění (14). I když bylo prokázáno, že *in vitro* rezistence nádorové populace na cytostatika zjištěna MTT testem vykazuje vysokou korelaci s klinickou odpovědí nemocných, v klinické praxi se tento postup začíná uplatňovat až v posledních letech (3, 5). Nedávno byly prokázány některé významné asociace mezi lékovou rezistencí a klinickými/laboratorními znaky leukémie, které se již postupně začínají klinicky využívat. Některé významné asociace mezi fenotypem nemoci a stupněm chemorezistence nádorové buňky jsou postupně inkorporovány do nových léčebných protokolů, které zřejmě povedou k vyššímu léčebnému úspěchu. Na nejvýznamnější objevy z oblasti lékové rezistence dětských hemoblastóz s praktickým využitím chceme upozornit v následujícím krátkém přehledu.

Akutní lymfoblastická leukémie kojenců je charakterizována špatnou prognózou a vysokou incidencí nezralé CD 10 negativní ALL (proB ALL). Pieters a spol. (6) analyzovali použitím MTT testu profil *in vitro* lékové rezistence u 395 kojenců s ALL v iniciální fázi nemoci. Testovali celkem 13 cytostatik: prednizon, dexametazon, daunorubicin, doxorubicin, mitoxantron, idarubicin, vinkristin, L-asparaginázu, 6-MP, 6-TG, cytarabin, VM-26 a 4-HOO-ifosfamid. Děti < 1,5 roku byly významně rezistentnější na prednizon (>500x), L-asparaginázu (11x), VM-26 (2,7x), ale signifikantně citlivější na cytarabin (2,3x). U kojenců ve věku < 1 rok autoři prokázali stejný profil lékové rezistence a na základě svých výsledků potvrdili, že nepříznivá prognóza kojenecké ALL je asociována s rezistencí na glukokortikoidy a L-asparaginázu. Vysoká *in vitro* senzitivita na cytarabin byla nedávno potvrzena a léčebně využita zařazením vysoce dávkovaného cytarabinu a methotrexátu do nových protokolů pro dospělé pacienty s ALL s MLL přestavbou (MLL-AF4 fúzního genu, který vzniká jako důsledek t(4;11)). Jelikož přestavba MLL genu (11q23) je značně frekventní u kojenecké leukémie, velmi vysoká senzitivita leukemických buněk k cytarabinu, která byla potvrzena se statistickou významností v *in vitro* testech s jediným cytostatikem, se již začíná využívat při konstrukci nových léčebných protokolů pro tuto věkovou skupinu (např. Interfant 99 pro léčbu kojenecké leukémie, R. Pieters).

Akutní lymfoblastická leukémie dětí s hyperdiploidním počtem chromozomů >50 (DNA index >1,16) je dobře rozpoznanou genetickou variantou, která je asociována s typickým fenotypem (B prekurzorová ALL), nízkým počtem leukocytů, věkem mezi 1. až 9. rokem a velmi dobrou prognózou. Velmi dobrá prognóza hyperdiploidní ALL zůstala dlouho bez vysvětlení. Na vzorcích kostní dřeně od 16 dětí s ALL (CD 10+) s hyperdiploidním počtem chromozomů prokázali Kaspers a spol. (7) jejich vysokou citlivost k merkaptopurinu ($p=0.000003$), 6-TG ($p=0.023$) a L-asparagináze ($p=0.022$) v porovnání s nádorovými buňkami získanými od dětských pacientů bez hyperdiploidie. Autoři nepozorovali statisticky významný rozdíl v *in vitro* senzitivitě k prednizonu, dexametazonu, vinkristinu, daunorubicinu, doxorubicinu, mitoxantronu a vepesidu. Procento buněk v S-fázi bylo vyšší ($p=0.05$) v hyperdiploidních ALL vzorcích (medián, 8,5%) než v nonhyperdiploidních (medián, 5,7%). Signifikantně vyšší senzitivita leukemických buněk s hyperdiploidii k antimetabolitům a L-asparagináze je kromě recentně popsaného membránového proteinu (reduced folate carrier, RFC), kterým methotrexát aktivně vstupuje do buňky (schopnost akumulovat aktivní polyglutamovaný metabolit MTX) a RFC gen, jenž je lokalizován na 21. chromozomu, možným vysvětlením velmi dobré prognózy pro tuto skupinu dětských pacientů (17). U dětí s hyperdiploidní ALL jsou často amplifikovány chromozomy 4, 6, 10 a 21 (21. chromozom až u >75% případů hyperdiploidie). Geny, které kódují enzymy zahrnuté do vnitrobuněčného metabolismu antimetabolitů jsou lokalizovány právě na těchto chromozomech. Tato zjištění dovolují dnes objasnit zvýšenou toxicitu některých cytostatik (MTX, cytarabin a daunorubicin), jejichž metabolismus je přímo závislý na amplifikaci řídicích genů u pacientů s Downovým syndromem (trisomie 21. chromozomu). Kromě již uvedeného RFC proteinu, který je loka-

lizován na 21. chromozómu (21q22.1-22.3) jsou zde umístěny i další geny, které ovlivňují metabolismus tvorby toxických kyslíkových radikálů (gen pro karbonyl-reduktázu (CBR), která katalyzuje redukci daunorubicinu na daunorubicinol a gen pro superoxid-dismutázu (SOD).

Nicméně, asi 20% pacientů s hyperdiploidíí >50 je postiženo relapsem onemocnění i navzdory efektivnosti současné léčby. Faktory, které zodpovídají za nedobrou prognózu mezi pacienty s hyperdiploidíí >50 jsou přítomnost isochromozómu 17q, ztráta trisomie obou chromozomů 4 a 10, zvýšené přežívání leukemických buněk v kulturním médiu obohaceném o stromální faktory (buňky) a menší modální počet chromozomů (51-55 chromozomů). Všechny uvedené asociace ale ještě musí být potvrzeny v dalších studiích.

Akutní myeloidní leukémie (AML) u dětí má neporovnatelně horší prognózu než ALL. Léková rezistence je významným limitujícím faktorem úspěšnosti chemoterapie AML u dětí. Současná kombinace chemoterapie je schopna navodit dlouhodobou remisi pouze u 30 až 50% dětí. Asi 20% dětí s AML ji po indukční léčbě nedosáhne; ze zbylých dětí postihne 40-60% relaps. Schopnost nádorových buněk odolávat účinkům cytotoxických látek je jednou z nejdůležitějších příčin selhání chemoterapie u AML. Klumper a spol. (8) použitím kolorimetrického MTT testu u 62 dětí s AML stanovili *in vitro* chemosenzitivitu k daunorubicinu, doxorubicinu, mitoxantronu, 6-TG, etoposidu a cytarabinu. *In vitro* chemosenzitivita nekorelovala se žádným klinickým znakem (věk, pohlaví, počet blastů, FAB klasifikace). Ve skupině dětí se špatnou odpovědí na indukční chemoterapii byl medián *in vitro* rezistence na cytarabin třikrát vyšší než ve skupině s dobrou odpovědí na léčbu. I když tyto výsledky svědčí o významné roli lékové rezistence v léčebném selhání dětské AML, prokázání prediktivní hodnoty zvýšené vnímavosti na cytarabin bude nutné ještě potvrdit.

***In vitro* léková rezistence jako prediktivní faktor odpovědi na chemoterapii.** Ačkoliv byla *in vitro* analýza lékové rezistence použita pro screening nových cytostatik, přetrvává neochota využít výsledků MTT testu při selekci pacientů pro zkoušky fáze II nebo pro adjuvantní chemoterapii, racionální zlepšení současných, ve většině případů empiricky odvozených léčebných režimů, pro stratifikaci do rizikových skupin a pro individualizovanou chemoterapii. Vysvětlením může být malý počet srovnávacích studií, které mohly odpovědět na nezodpovězené otázky. Kaspers a spol. (9) studovali vztah mezi *in vitro* rezistencí k 12 léčivům, stanovenou použitím MTT testu a dlouhodobou klinickou odpovědí u 152 dětí s nově diagnostikovanou ALL. Pacienti byli rozděleni do tří rizikových skupin na základě *in vitro* rezistence k prednizonu, L-asparagináze a vinkristinu. Každá skupina pacientů statisticky významně ($p < 0.01$) souvisela s pravděpodobností přežití bez známek nemoci (pDFS). Kombinace (suma) dat pro prednizon, L-asparaginázu a vinkristin umožnila sestavit tzv. profil lékové rezistence (pro každý druh cytostatika byla stanovena arbitrážní hodnota 1 pro „senzitivní hodnotu LC_{50} “, 2 pro „intermediární LC_{50} “ a 3 pro „rezistentní LC_{50} “). Pacienti s vysokou chemosenzitivitou na všechna tři cytostatika dosáhli skóre 3, na rozdíl od pacientů s vysokou rezistencí se skóre 9. Pravděpodobnost DFS ve 3 letech byla 100% pro skupinu s vysokou senzitivitou (20% pacientů), 84% pro skupinu s intermediální senzitivitou (40% pacientů) a 43% pro skupinu s rezistentní senzitivitou ($p < 0.001$). Počet událostí (relapsů) v závislosti na skupině pacientů podle hodnoty LC_{50} (koncentrace cytostatika, která usmrtí 50% leukemických buněk) lékové rezistence je uvedena v Tab 1.

Senzitivita	Vysoká		Intermediální		Nízká		
Skóre	3	4	5	6	7	8	9
Počet	5	18	20	27	23	13	12
Událost	0	0	4	6	14	6	6
Poměr (%)	0	0	20	22	61	46	50

Uvedený profil lékové rezistence, který byl sestaven jako suma rezistencí tří cytostatik, které mají dominantní postavení v indukční části léčebných protokolů pro ALL se ukázal (statisticky významně) jako vhodný faktor pro předpověď klinického (léčeb-

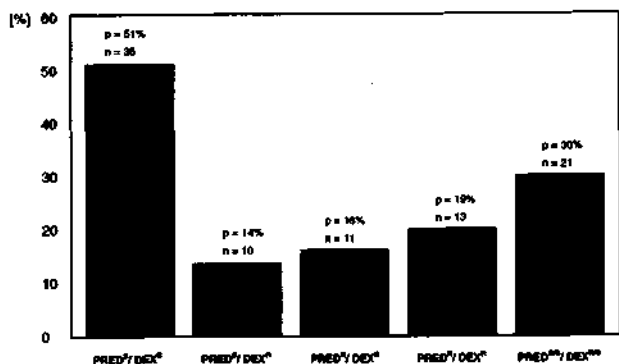
ného) výsledku. MTT test se tak jeví jako vhodný faktor pro stratifikaci pacientů do rizikových skupin. Výsledek MTT testu je k dispozici již za týden od získání leukemických buněk od pacienta a dovoluje případnou včasnou změnu léčby. Uvedené výsledky by mohly vyprovokovat další racionální studie, které snad povedou ke zvýšení účinnosti současných léčebných režimů.

Akutní lymfoblastická leukémie s TEL-AMU (ETV6-CBFA2 fúze) reprezentuje další prognosticky dobrou podskupinu ALL z prekurzorových B lymfocytů, tvořící 25% případů s tímto fenotypem a téměř 60% dětí s chromozomálními abnormalitami zahrnujícími oblast 12p (10). I když genetická leze vzniká důsledkem t(12;21), tuto translokaci použitím standardních cytogenetických metod nelze kvůli zřetelné podobnosti segmentů chromozomů zahrnutých do této přestavby detekovat. Jejich detekce vyžaduje použití fluorescenční *in situ* hybridizace (FISH), Southern blot analýzy nebo RT-PCR metody (11). Pacienti s touto přestavbou jsou charakterizováni příznivým věkem (1-9 let), nonhyperdiploidním karyotypem a zvýšenou frekvencí exprese asociovaných myeloidních antigenů (CD13 a CD33). Ramakers-van Woerden, N. L. a spol. (12) analyzovali *in vitro* rezistenci 180 dětských pacientů s ALL, ze kterých 51(28%) bylo pozitivních pro t(12;21). Medián *in vitro* hodnot LC_{50} pro jednotlivá cytostatika (prednizon, dexametazon, daunorubicin, thiopuriny, epipodofylotoxiny a 4-HOX-ifosfamid) se významně nelišil v obou skupinách dětských pacientů s TEL-AML1 pozitivitou a negativitou. Nicméně TEL-AML1 pozitivní pacienti byli relativně citlivější k L-asparagináze (5,9x; $p = 0.029$) a nepatrně rezistentnější k vinkristinu (1,5x; $p = 0.011$) a cytarabinu (1,5x; $p = 0.014$). Po vytvoření skupiny dětí s TEL-AML1 negativitou, do které nebyli zařazeni pacienti s věkem <12 měsíců, CD10 negativní BCP-ALL (prekurzory z B lymfocytární linie), pozitivitou Ph chromozomu a s hyperdiploidíí >50 - jedinou zbylou významnou diferencí zůstala relativní senzitivita k L-asparagináze (10,8x; $p = 0.012$). Autoři tím ve své práci prokázali, že přítomnost TEL-AML1 přestavby u dětské BCP-ALL není, s výjimkou L-asparaginázy, asociována s vyšší *in vitro* lékovou senzitivitou. Tyto závěry objasňují, proč u pacientů, kteří byli léčeni relativně intenzivnějšími léčebnými režimy (vyšší celková dávka L-asparaginázy) byly dosaženy významně lepší léčebné výsledky (např. DCSL GALL-VII protokol a protokoly St. Jude Childrens Research Hospital pro TEL-AML1 pozitivní ALL).

Rozdílná *in vitro* antileukemická aktivita prednizonu a dexametazonu u dětí s akutní lymfoblastickou leukémií.

Glukokortikoidy (GCs), které byly zavedeny do onkohematologické praxe již počátkem 50. let, jsou vysoce účinné látky v léčbě akutní lymfoblastické leukémie ačkoliv v monoterapii nevedou k dlouhodobému vyléčení. Mechanismus účinků spočívá v difúzi GCs přes cytoplazmatickou membránu a navázání se na cytoplazmatické receptory (GCRs). GCs-GCR komplex je přemístěn do jádra, kde se váže na DNA a aktivuje řadu GCs responsivních genů. U GCs senzitivních leukémií je hlavní buněčnou odpovědí indukce apoptózy, ačkoliv GCs ne vždy indukují buněčnou smrt a mohou uplatnit svoji biologickou aktivitu cestou indukce/represe exprese jiných genů a proteinů. Například dexametazon může snížit expresi *mdr* genů u rezistentních buněk a tak zvýšit jejich senzitivitu k chemoterapii. Bohužel významná část pacientů vykazuje primární či sekundární rezistenci na kortikoidy. Například 80% pacientů odpovídá na iniciační monoterapii kortikoidy, zatímco pouhých 35% odpovědí bylo zaznamenáno u dětí s relapsem ALL. Rozsah mechanismů rezistence na GCs byl popsán a zahrnuje *mdr1*zprostředkovaný eflux GCs s oběma 11- a 17-hydroxyl skupinami, aberantní GCRs, pozměněnou expresi heat shock proteinů: hsp90, hsp70 a jiné.

Z klinického hlediska je zásadně důležité předpovědět pacientovu odpověď na GCs. Existují dvě základní otázky, na které je nutné hledat odpověď: 1) zda každý jednotlivý pacient odpovídá na léčbu kortikoidem; 2) zda je u jednotlivého pacienta rozdílná odpověď na různé deriváty kortikoidů, např. prednizon (PRED) versus dexametazon (DEX). Za účelem predikce a následné stratifikace pacientů na respondery a nonrespondery na PRED v *in vivo* podmínkách vytvořila skupina Berlin-Frankfurt-Munster (BFM) pro dětskou leukémii „PRED okno“. V podstatě jde o jednotodenní monoterapii PRED, kde hodnotou určující klinickou odpověď je redukce absolutního počtu blastů (ANB) v pacientově krvi pod



(PRED⁵/DEX⁵), senzitivních na PRED ale rezistentních na DEX (PRED⁵/DEX⁸), rezistentních na PRED ale senzitivních na DEX (PRED⁸/DEX⁵), pacientů rezistentních na PRED i DEX (PRED⁸/DEX⁸) a celkové procento dětí zahrnutých do studie s opačnou *in vitro* odpovědí na oba testované glukokortikoidy (PRED⁸/DEX⁵).

1000/mm³ 8. den léčby. Celkový podíl odpovídajících pacientů byl 92%, většina nonresponderů byli chlapci, děti s vysokým počtem leukocytů a pacienti s T-ALL. Nonresponderi jsou léčeni agresivními protokoly. Nicméně někteří z pacientů nebyli vhodní pro určení PRED responderství, protože jejich iniciální ANB je pod 1000/mm³. Další úsilí bylo zaměřeno k vyloučení komplikací při stanovení GC odpovědi *in vivo* a byly vyvíjeny nové metody stanovení *in vitro* podmínkách. Ty zahrnovaly kvantifikaci OCRs v cytoplasmě nádorových buněk, aktivaci a translokaci G-CGR komplexů a indukci DNA fragmentace, která následuje po léčbě steroidy. Avšak predikce pacientovi odpovědi založené na vyšetřeních *in vitro* podmínkách měla variabilní úspěšnost a/nebo *in vitro* analýzy nebyly vhodné pro rutinní klinické použití pro jejich vysokou cenu a pracovní náročnost. Nicméně před několika málo lety byla představena poloautomatická *in vitro* MT assay analyzující lékovou rezistenci v nádorových buňkách. Jde o finančně únosný cytotoxický test, který určuje koncentraci léku smrtící 50% leukemických buněk v *in vitro* podmínkách. I přes fakt, že tato analýza postihuje jen buněčný mechanismus rezistence na GCs, zkouška ukázala signifikantní asociaci mezi *in vitro* senzitivitou na PRED a dlouhodobým přežíváním pacientů s ALL. Tato analýza také demonstruje silnou korelaci mezi anti-leukemickou aktivitou PRED a DEX a poskytuje tak nepřímý důkaz, že nahrazení PRED dexametazonem by nemělo zvýšit procento GCs odpovědi *in vivo*. Ačkoliv pozitivní korelace mezi PRED a DEX LCS₅₀ byla nalezena i v naší studii, hladina významnosti byla mnohem nižší než v pracích Kasperse a spol. (12) a Ita a spol. (13). Mimoto jsme našli podstatnou část pacientů s rozdílnou *in vitro* odpovědí na PRED a DEX (Obr. 1).

Vyšetřili jsme celkem 53 dětí s nově diagnostikovanou ALL. Ze souboru jsme později vyloučili pacienty s iniciální ANB = 0 (4; 8,7%) a děti, jejichž úmrtí nebylo v přímé souvislosti s ALL (3; 5,7%). Ve zbylé skupině 46 pacientů jsme analyzovali rezistenci na kortikoidy *in vitro* a základní hematologické parametry (ANB v den 0, ANB v den 8, procento blastů v kostní dřeni den 15 a 33 a celkový počet leukocytů při diagnóze). Abychom mohli lépe charakterizovat redukci nádorové masy byl zaveden nový parametr nazvaný clearance blastů 8.den (BCC8). BCC8 je spočítán z ANB0 a ANB8 s použitím následující rovnice: BCC8(%) = ANB8:ANB0 x 100.

VÝSLEDKY

1) Korelace hodnot PRED a DEX *in vitro* lékové rezistence s charakteristikou pacienta.

Multivariační korelační analýza (Pearson product-moment correlation) byla použita k nalezení pozitivních nebo negativních korelací mezi PRED a/nebo DEX LCS₅₀, ANB0, ANB8 a BCC8. Potvrdili jsme pozitivní korelaci mezi hodnotami DEX a PRED LCS₅₀ (r=0,4497; p<0.002), přesto hladina významnosti je mnohem nižší než ve výše uvedených publikacích (12, 13). Ačkoliv nebyla nalezena signifikantní vazba mezi PRED/DEX *in vitro* odpovědí a ANB8, PRED LCS₅₀ signifikantně koreloval s clearance blastů (r=0,3340; p<0.02). Nicméně korelace BCC8 s DEX LCS₅₀ nebyla signifikantní.

2) *In vitro* rezistence na glukokortikoidy.

Stanovené hodnoty pro *in vitro* rezistenci/citlivost na PRED/DEX byly určeny zařazením pacientů do dvou skupin jako senzitivní (66%; hodnota LCS₅₀ <12,0/0,15 g/ml) a rezistentní (33%; hodnota LCS₅₀ > 12,0/0,15 g/ml). Nicméně významná část dětí vykazovala rozdílnou *in vitro* citlivost na PRED/DEX (21 dětí; 30%). Deset pacientů (14%) bylo senzitivních na PRED a rezistentních na DEX a 11 (16%) bylo rezistentních na PRED a rezistentních na DEX (Obr. 1).

3) Účinek kryoprezervace CCRF-CEM buněk na protinádorovou chemoterapii *in vitro*

I když jsme potvrdili signifikantní korelaci PRED a DEX LCS₅₀ na leukemických buňkách od našich pacientů, byla zde část pacientů s rozdílnou senzitivitou na PRED versus DEX. To odpovídalo dříve publikovaným údajům (12,13). Pokud budeme analyzovat obě tyto práce, zjistíme, že experimenty byly provedeny s kryoprezervovanými a dlouho transponovanými buňkami pacientů, zatímco v naší studii byly použity pouze čerstvě izolované buňky. Na modelu T-lymfoblastické buněčné linie CCRF-CEM jsme dokázali, že kryoprezervace snižuje (p<0.01) PRED rezistenci v porovnání s lékovou rezistencí analyzovanou na čerstvě získaných buňkách. K našemu překvapení rozdílná hodnota LCS₅₀ na čerstvých a kryoprezervovaných buňkách nebyla pozorována mezi dalšími protinádorovými léky (DEX, vepesid, daunorubicin, vincristin, L-asparagináz, cytarabin, 6-TG, mitoxantron, flutabin, cisplatin, cladribin). Předpokládáme, že vysvětlením tohoto jevu by mohlo být odlišné zpracování leukemických buněk v našich (čerstvé buňky) a jiných studiích (kryoprezervace nebo dlouhotrvající transport), čehož následkem je zvýšená senzitivita kryoprezervovaných nádorových buněk na PRED. Předpokládáme, že možným vysvětlením této skutečnosti by mohl být defekt energetického metabolismu kryoprezervovaných nebo dlouho transponovaných buněk, který vede ke snížení intracelulárního ATP - zdroje energie pro buněčné lékové transportéry (Pgp, MRP aj.). Opakovaná manipulace s buňkou může být rovněž příčinou snížené vnímavosti na PRED indukovanou apoptózou.

Námi identifikovaná podskupina pacientů (30%) s odlišnou *in vitro* vnímavostí na PRED v porovnání s DEX nebyla jinými autory potvrzena. Naše původní doporučení - respektovat individuální *in vitro* vnímavost na GCs při konstrukci nových léčebných režimů nezůstalo dlouho bez odezvy. V novém protokolu pro léčbu kojenecké ALL (INTERFANT 99 - R. Pieters) je PRED v týdenní cytoredukční fázi nahrazen DEX, který je podáván až do konce redukce (8. - 34. den). Identickou úpravu indukční části nového protokolu ALL - BFM 99 použil i H. Gadner. Následná aplikace obou forem GCs již v průběhu indukce by měla podstatně eliminovat obě podskupiny blastů. Ve většině stávajících protokolů je glukokortikoidem první volby prednison adexametazon je zařazen do léčebného plánu až ve fázi redukce (zkrácená forma indukce kde PRED je nahrazen DEX). Hlavním významem nové léčebné strategie je **časné zařazení (střídání) obou forem GCs** v době (indukce), kdy leukemické buňky jsou stále ještě přítomny ve větším objemu.

ZÁVĚR

Na prvním místě by se *in vitro* analýza buněčné lékové rezistence měla stát prognostickým faktorem, který může být využit pro stratifikaci pacientů s leukémií do rizikových podskupin a k následné adaptaci chemoterapie ve vztahu k riziku selhání. Dobré prognostické faktory jsou vzácné u ALL. Některé chromozomální abnormality [inv16, t(15;17) a t(8;21)] mají prognostickou významnost, ale vyskytují se jen u minorit pacientů s ALL. Nicméně před prohlášením lékové rezistence za nezávislý prognostický faktor u dětské ALL, by měla být provedena multivariační analýza i dalších potenciálních prognostických faktorů. Využití analýzy lékové rezistence se nabízí při individualizaci („ušití na míru“) chemoterapie nebo konstrukci léčebných režimů pro různé podskupiny pacientů. Tato koncepce je založená na skutečnosti, že léková rezistence je odlišná mezi jednotlivými podskupinami ALL (např. určené podle FAB klasifikace). Na uvedeném přehledu u dětí s ALL je dostatečně dokumentováno, že prognosticky signifikantní vazby mezi lékovou rezistencí a některými klinickými/laboratorními znaky (věk, imunofenotyp nebo DNA ploidie), dnes umožňují určit pro jednotlivé podskupiny pacientů tzv. profil rezistence. Na základě tohoto *in vitro* profilu

rezistence může být chemoterapie přizpůsobená pro jednotlivé podskupiny nebo i pro individuálního pacienta. Henze a spol.(3) tento princip stratifikace sice potvrdili ve skupině dětí s ALL s vysokým rizikem relapsu, ale léčebné výsledky dětí léčených standardním protokolem nebyly významně horší. Za racionální léčebný postup u těchto pacientů, u kterých špatná prognóza není způsobená pouze špatnou vnímavostí na chemoterapii se dnes považuje využití *in vitro* analýzy lékové rezistence při výběru kombinace cytostatik pro paliativní léčbu. MTT test lze rovněž s úspěchem aplikovat pro výběr vhodných pacientů pro fázi II klinických testů s novými protinádorovými léky, ale i pro jejich samotný screening. Rozhodujícím cílem výzkumu *in vitro* lékové rezistence je další zlepšení léčebného úspěchu dětských nádorových onemocnění nejenom z pohledu účinnosti, ale i s ohledem na možné nežádoucí účinky.

PODĚKOVÁNÍ

Práce na projektu lékové rezistence je podpořena granty IGAMZ 4132-5, MSMTVZJ14/98151100001 a Nadací pro výzkum rakoviny v Olomouci.

Literatura:

1. Pui C-H, Evans WE: Acute lymphoblastic leukemia. N Engl J Med 1998; 339(9), 605-15.
2. Mosmann T: Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: Application to proliferation and cytotoxicity assay. J Immunol Methods 1983;65, 55-63.
3. Henze G, Agthe AG, Neuendank A, Hartmann R, Dorffle W, Bruhmüller S, Klumper E, Pieters R, Veerman AJP: Tailored therapy for relapsed or refractory childhood acute lymphoblastic leukemia. Leukemia 1995;9:538.
4. Mihál V, Hajdúch M, Weigl E, Videmanová L, Šafářová M: Naše první zkušenosti s testováním citlivosti leukemických buněk na cytostatika *in vitro*. CsPediatrik 1995;50(7), 387-392.
5. Mihál V, Hajdúch M, Starý J, Sedláček P, Blažek B, Michálek T, Kotala V, Jabali J, Pospíšilová D, Klásková E, Šafářová M, Janošťáková A: Může *in vitro* citlivost leukemických buněk na cytostatika ovlivnit klinickou odpověď dětí s akutní lymfoblastickou leukémií? CsPediatrik 1996;51(8), 515-519.
6. Pieters R, den Boer M L, Durian M, Jánka G, Schmiegelow K, Kaspers GJL, van Wering ER, Veerman AJP: Relation between age, immunophenotype and *in vitro* drug resistance in 395 children with acute lymphoblastic leukemia - implication for treatment of infants. Leukemia 1998;12,1344-1348.
7. Kaspers GJL, Smets LA, Pieters R, van Zantwijk CH, van Wering ER, Veerman AJP: Favorable prognosis of hyperdiploid common acute lymphoblastic leukemia may be explained by sensitivity to antimetabolites and other drugs: results of an *in vitro* study. Blood 1995; 85(3), 751-756.
8. Klumper E, Pieters R, Kaspers GJL, Huismans DR, Loonen AH, Rottier M M A, van Wering ER, van der Does-van der Berg A, Hahlen K, Creutzig U, Veerman AJP: In vitro chemosensitivity assessed with the MTT assay in childhood acute non-lymphoblastic leukemia. Leukemia 1995;9,1864-1969.
9. Kaspers GJL, Veerman AJP, Pieters R, van Zantwijk CH, Smets LA, van Wering ER, van der Does-van der Berg A: In vitro cellular drug resistance and prognosis in newly diagnosed childhood acute lymphoblastic leukemia. Blood 1997; 90(7), 2723-2729.
10. Raimondi SC, Shurtleff SA, Downing JR, Rubnitz J, Mathew S, Hancock M: 12p abnormalities and the TEL gene (ETV6) in childhood acute lymphoblastic leukemia. Blood 1997; 90,4459-4566.
11. Pui C-H, Evans W: Genetic abnormalities and drug resistance in acute lymphoblastic leukemia. Adv Exp Med Biol 1999;457,383-389.
12. Kaspers GJL, Veerman AJP, Pop-Snijders C, Lomecky M, van Zantwijk CH, Swinkels LMJW, van Wering ER, Pieters R: Comparison of the antileukemic activity in vitro of dexamethasone and prednisolone in childhood acute lymphoblastic leukemia. Med Ped Oncol 1999;27,114-121.
13. Ito C, Evans WE, McNinch L, Coustat-Smith E, Mahmoud H, Pui C-H, Campana D: Comparative cytotoxicity of dexamethasone and prednisolone in childhood acute lymphoblastic leukemia. J Clin Oncol 1996;14,2370-2376.
14. Mihál V, Hajdúch M, Janošťáková A, Šafářová M, Nosková V, Starý J, Blažek B, Pospíšilová D: The analysis of correlation between drug resistance and clinical/laboratory measures found in a group of children with ALL treated by ALL-BFM 90 protocol. Elec J Oncol, 1999; 1, 80-89.
15. Mihál V, Hajdúch M, Janošťáková A, Šafářová M, Nosková V, Starý J, Blažek B, Pospíšilová D, Pikalová Z, Šafářová M: Differential chemosensitivity of leukaemic cells in myeloid and lymphoid phase of stem cell leukaemia. Neoplasma 1997;44(2), 133-136.
16. Hajdúch M, Mihál V, Minařík J, Faber E, Šafářová M, Weigl E, Antálek P: Decreased in vitro chemosensitivity of tumour cells in patients suffering from malignant disease with poor curability. Cytotechnology 1996;18,1-3.
17. Belkov V M, Krynetski EY, schuetz JD, Yanishevski Y, Masson E, Mathew S, Raimondi S, Pui C-H, Relling MV, Evans WE: Reduced folate carrier expression in acute lymphoblastic leukemia: A mechanism for ploidy but not lineage differences in methotrexate accumulation. Blood 1999; 93(5), 1643-1650.

VYUŽITÍ BUNĚK ZÍSKANÝCH Z MALIGNÍCH VÝPOTKŮ K VEDENÍ LÉČBY PACIENTŮ S POKROČILÝM NÁDREM

USE OF MALIGNANT EFFUSIONS FOR GUIDANCE IN THE TREATMENT OF ADVANCED CANCER

KRÁSNÁ L.^{1,2}, MATOUŠKOVÁ E.², JANOUŠEK M.³, DUDORKINOVÁ D.⁴, PETRUŽELKA L.¹

¹ ONKOLOGICKÁ KLINIKA VFNA I. LF UK, PRAHA

² ÚSTAV MOLEKULÁRNÍ GENETIKY AV ČR, PRAHA

³ GYNEKOLOGICKO-PORODNICKÁ KLINIKA VFNA I. LF UK, PRAHA

⁴ PATOLOGICKO-ANATOMICKÝ ÚSTAV VFNA I. LF UK, PRAHA

Souhrn: Bylo zpracováno 34 břišních a 24 hrudních výpotků pacientů s nádorovým onemocněním. U jedné čtvrtiny z těchto výpotků byla cytologicky potvrzena přítomnost maligních buněk. Byla vypracována metoda k jejich izolaci od příměsí benigních elementů. U 11 břišních a 6 hrudních výpotků umožnilo izolované množství nádorových buněk provedení MTT testu chemorezistence vůči cytostatikům. Většina provedených testů sloužila k vývoji metodiky a k upřesnění *in vitro* kritické koncentrace cytostatik, při které dochází k manifestaci cytotoxických účinků. Předběžné výsledky ukazují, že citlivost nádorových buněk vůči cytostatikům *in vitro* je jejich další biologickou charakteristikou závislou pravděpodobně na stádiu nemoci a předchozí léčbě. Vyvinutá metodika nyní slouží k získávání dalších dat, která umožní ověřit, zda existuje korelace mezi odpovědí izolovaných buněk v *in vitro* testu a léčebnou odpovědí *in vivo*.

Klíčové slova: maligní výpotek, MTT test chemorezistence *in vitro*

Summary: Thirty-four abdominal and twenty-four pleural effusions were tested for the presence of malignant cells to examine the possibility of using isolated malignant cells to guide the treatment of oncology patients. Malignant cells were cytologically confirmed in 25% of the examined effusions. A method to isolate these cells devoid of benign cells was developed. The *in vitro* MTT chemoresistance test of cells to cytostatic agents was performed with cells from 11 abdominal and 6 pleural effusions where sufficient number of cells was obtained to conduct the test. The tests helped improve the method and find the concentrations of cytostatics that were efficient *in vitro*. Preliminary results show that the *in vitro* sensitivity/resistance of malignant cells to cytostatic agents is case-dependent and depends on the stage of the disease and previous treatment of the patient. The method will be used to study the correlation between the *in vitro* response of isolated malignant cells to cytostatics and the response of a patient to the same drugs.

Key words: malignant effusions, MTT test of chemoresistance *in vitro*

tvod

Nádorová onemocnění jsou charakterizována širokou variabilitou klinického vývoje. Průběh neléčeného onemocnění lze předpovědět pomocí prognostických faktorů. Volba účinné systémové léčby je založená na využití prediktivních faktorů, které umožní identifikovat nemocné jež budou mít ze stanoveného postupu největší prospěch. Snahy onkologů o úspěšnou léčbu nádorových onemocnění proto vedou k trendu individualizace léčby pacientů s využitím biologických vlastností nádorů, detekovatelných díky rychlému vývoji molekulárně-biologických metod. Jednou z nepříznivých vlastností nádorových buněk, která může limitovat terapeutickou odpověď pacienta, je původně geneticky podmíněná či v průběhu léčby získaná rezistence buněk vůči chemoterapeutickému agens. Jenom na úrovni buňky je mnoho mechanismů, které mohou tuto rezistenci navodit. Je to snížený vstup či zvýšené vylučování cytostatika buňkou, snížená schopnost aktivace či zvýšená schopnost inaktivace léku buněčným enzymatickým mechanismem, snížená či zvýšená hladina cílového enzymu v buňce, či jeho změněná struktura, zvýšená schopnost opravy lékem navozené DNA poruchy, změna v apoptotické signální dráze a další (pro přehled viz Tannock et al. 1998). Pomocí molekulárně biologických metod lze dneska tyto jednotlivé poruchy detekovat. Nabízí se však možnost detekovat rezistenci, podmíněnou na buněčné úrovni, jediným testem a to přímým testem chemorezistence maligních buněk *in vitro*. Existuje několik způsobů testu chemorezistence *in vitro* o jejichž přednostech i nedostatech bylo napsáno již mnoho článků (Bellamy 1992, Fruehauf 1993, Von Hoff 1990a, Wrisenthal 1991, Cree IA et al. 1997 a řada dalších). Z praktického hlediska je nejvýhodnější MTT test chemorezistence (Black et al. 1954, Carmichael et al. 1987). Je založený na testování viability buněk, které byly vystavené působení cytostatik. Mitochondriální enzym sukcinyl dehydrogenáza viabilních buněk redukuje žlutou tetrazoliovou sůl na tmavě modré, ve vodě nerozpustné krystalky. Po rozpuštění těchto krystalků lyzačním roztokem je spektrofotometricky měřena optická densita roztoku ukazovatelem množství přeživajících, resp. metabolicky aktivních buněk. Nedostatkem MTT testu je, že nedokáže odlišit metabolickou aktivitu příměsí benigních buněk v kultuře a že nedokáže rozeznat buňku dočasně metabolicky inaktivní (cytostatický účinek léku) od trvale inaktivní, definitivně poškozené buňky (cytotoxický účinek). Obecně může testování chemoterapeutik *in vitro* selhávat zejména na těchto klíčových krocích: izolace a identifikace nádorové buněčné popu-

lace pro *in vitro* test, uchování aktivity chemoterapeutik *in vitro* a použití takové koncentrace a délky expozice cytostatik *in vitro*, které by simulovali podání léku *in vivo*.

V systémové chemoterapii nádorových onemocnění se standardně využívají v klinických studiích ověřené režimy. Při selhání léčby první, druhé, nebo vyšší řady je výběr chemoterapie omezen a volba léčby není standardně určena.

U části nemocných se recidiva manifestuje maligním výpotkem. Cílem této práce bylo prozkoumat možnost použití buněk izolovaných z maligních výpotků těchto pacientů k vedení jejich další léčby.

V tomto článku přinášíme metodiku naší práce, kterou vyvíjíme, konzultujeme a upravujeme již delší dobu a naše experimentální výsledky a zkušenosti za první rok. Diskutujeme jejich výpovědní hodnotu.

Metody

Izolace maligních buněk z výpotků

Výpotky byly získané standardně provedenou hrudní či břišní punkcí nemocných onkologické kliniky či gynekologické kliniky VFNA I. LF UK. Prvních 500 ml punktováné tekutiny bylo zachyceno sterilně do infusní láhve. Vzorek punktátu byl zaslán ke standardnímu cytologickému vyšetření. Výpotek byl do zpracování skladován v pokojové teplotě, v případě že šlo o hemoragický, nebo vysoce viskózní výpotek, bylo do něj přidáno 5-10 ml Heparinu 25-500 tis. m. j. Po centrifugaci výpotků při 150 g byl sediment promytý v proplachovacím médiu a opět centrifugován. Sediment byl resuspendován v malém objemu kultivačního média, opatrně nanesen na vrstvu Percollu (Pharmacia Fine Chemicals) o hustotě 1,05 g/ml. Poté proběhla gradientová centrifugace 10 min při otáčkách 2000 g. Po skončení centrifugace byl viditelný na dně konické zkumavky sediment erytrocytů a bílých krvinek. Na rozhraní Percollu a média byl v případě přítomnosti maligních buněk ve výpotku vytvořen bílý prstenec. Ten byl izolován hrubou sterilní jehlou (0,9x70 mm, Braun) a zbaven zbytků Percollu promytím v proplachovacím médiu a centrifugací. V případě masivní hemorágie byla procedura s Percollem opakována 2-3krát. Po proplachu byly izolované buňky resuspendovány v kultivačním médiu, počítány v Bürkerově komůrce (Meopta) a vzorek byl opět odeslán na cytologické vyšetření.

Jako kultivační médium bylo používáno RPMI 1640 médium doplněné glutaminem (150 mg/500 ml média, Sevac), antibiotiky (penicilin a streptomycin, Biotika), 10% telecího séra (ZVOS

Tab.1: Zdroje výpotků vzhledem k původní diagnóze nemoci, jejich malignita a využitelnost pro test

Břišní výpotky			
lokalizace nádoru	počet pacientů	počet maligních výpotků	počet úspěšně provedených testů
ovarium	14	3	3 (Asc 54, Asc 58, Asc 65)
pankreas	6	2	0 (nedostatek buněk)
kolorektální karcinom	3	0	0
mléčná žláza	2	1	0 (nedostatek buněk)
ledvina	2	0	0
plice		0	0
pleura		0	0
žaludek		1	1 (Asc 17)
žlučník		2	2 (Asc 28, Asc 29)
játra		0	0
ovarium + mléčná žláza		1	0 (nedostatek buněk)
neznámy primární nádor		?	2 (Asc 18 Asc 22)
spolu	34	12	8

Hrudní výpotky			
lokalizace nádoru	počet pacientů	počet maligních výpotků	počet úspěšně provedených testů
mléčná žláza	12	7	3 (PL 6, PE 7, PE 8)
ovarium	2	1	0 (málo buněk)
neznámy primární nádor	2	2	0 (kontaminace; nedostatek buněk)
mléčná žláza + ovarium	1	1	0 (málo buněk, sferoidy)
mléčná žláza + endometrium	1	1	0 (málo buněk, sferoidy)
endometrium	1	1	0 (sferoidy)
pilce	1	1	1 (PE 22)
pleura	1	1	1 (PE 9)
brzlík	1	1	0
NH lymfom	1	1	1 (PE 38)
liposarkom plicní metastázy	1	0	0
spolu	24	17	6

Hustopeče), 2% embryonálního telecího séra (Sigma), 0,195% NaHCO₃, 0,02 M TES, N-Tris(hydroxymethyl)methyl-2-aminoethane sulfonic acid, Serva). Pomocí NaOH bylo pH média upraveno na 7,4.

Jako oplachovací médium bylo používáno H - M E M d médium s 2-násobně koncentrovanými antibiotiky (penicilin a streptomycin). Percoll (Pharmacia), původní koncentrace 1,13 g/ml, byl na konečnou koncentraci upraven naředěním standardním solním roztokem (PBS).

K centrifugaci výpotků byly použity 50 ml sterilní centrifugační polypropylenové zkumavky (NUNC) a k vysokootáčkové gradientové centrifugaci byly použity 15 ml sterilní centrifugační polypropylenové zkumavky (NUNC). Percoll tvořil 2,5 ml objemu, na to bylo opatrně naneseno 10 ml buněčné suspenze.

Příprava buněk na test

Získaná buněčná suspenze byla ředěna v kultivačním médiu na koncentraci 5x 10⁵ buněk/ml. Osmdesát ml této suspenze bylo pipetováno sterilní špičkou a mikropipetou (Gilson, 100-200 ml) do vnitřních jamek (všechny kromě A1-12, H1-12, B-G 1 a B-G 12) 96 jamkové sterilní destičky (NUNC, dále jenom destička) s kultivační úpravou povrchu jamek. Zevní, prázdné jamky, byly zaplněné 100 ml kultivačního média a při měření výsledku byly použity jako pozadí.

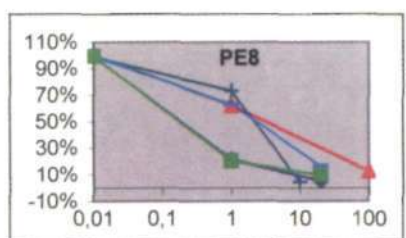
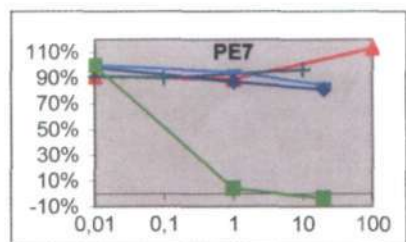
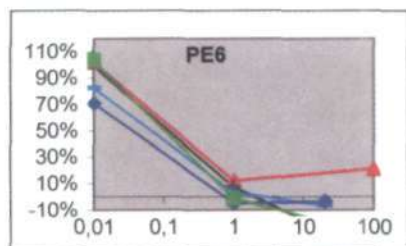
Aplikace cytostatik

Cytostatika byla aplikovaná bezprostředně k pipetované buněčné suspenzi. Celkový objem cytostatik byl 20 ml. Pro odvození *in vitro* testované koncentrace byla použita hodnota maximální dosažené plasmatické koncentrace cytostatika v krevní plasmě pacientů (peak plasma concentration = *ppc*), pro přehled jsou uvedeny v tabulce č.2. Zásobní roztok v koncentraci 100-násobku *ppc* se ukázal pro většinu cytostatik jako vhodná koncentrace k dlouhodobému uskladnění (6 měsíců) při -70 ° C bez poškození aktivity látky (Bosanquet 1986, Bosanquet 1996, Hunter et al. 1994, Von Hoff DD et al. 1983, Weisenthal et al. 1983). Ředění cytostatik probíhalo bezprostředně před jejich aplikací do testovací destičky.

V každém řádku (vyjma prvního A1-12 a posledního H1-12) byla testována účinnost jednoho cytostatika v různých koncentracích. Maximální testovaná koncentrace chemoterapeutika byla rovněž přidána k první jamce svého řádku, bez buněk, aby při vyhodnocování testu bylo možno odečíst změnu optické denzity, kterou způsobuje cytostatikum samotné. Výběr cytostatik se řídil množstvím získaných maligních buněk, histologií původního nádoru a předchozí léčbou pacienta. Celkově bylo možno v *in vitro* systému testovat tyto cytostatika, které nepotřebují ke své aktivaci jaterní enzymatický systém organismu: doxorubicin, epirubicin, 5-fluorouracil, gemcitabin, cisplatina, karboplatina, paklitaxel, bleomycin, topotekan, vinblastin, vinkristin, vinorelbin, dakarbazin (po jednodinové aktivaci na přímém slunečním světle, Von Hoff et al. 1990b), etoposid, teniposid, mafosfamid (*in vitro* aktivní analog cyklofosfamidů). Výrobci používaných substancí jsou uvedeni v tabulce č.2. Po pipetování cytostatik byla destička jemným zatřesením promíchána a uchovávána za standardních kultivačních podmínek (37 °C, 3,5% CO₂) po dobu 72 až 96 hodin.

Tab.2: Používané cytostatika a předpokládaná *ppc*.

chemická látka	obchodní přípravek a výrobce	předpokládaná <i>ppc</i>
bleomycin	Bleocin, Nippon Kayaku Co Ltd	2 µg/ml
cisplatina	Platidiam, Lachema	5 µg/ml
karboplatina	Cycloplatin, Lachema	20 µg/ml
doxorubicin	Doxolem, Medicom International s.r.o.	0,5 µg/ml
epirubicin	Farmorubicin, Farmitalia Carlo Erba	0,5 µg/ml
5-fluorouracil	Fluoro-uracil, Roche	30 µg/ml
gemcitabin	Gemzar, Lilly France S.A.	30 µg/ml
vinblastin	Vinblastin, Gedeon Richter Ltd.	1 µg/ml
vinkristin	Vincristin, Gedeon Richter Ltd.	0,5 µg/ml
vinorelbin	Navelbine, Pierre Fabre Oncologie	2 µg/ml
dakarbazin	Dacarbazin, Lachema	15 µg/ml
topotekan	Hycamtin, Smith Kline Beecham	1 µg/ml
paklitaxel	Taxol, Bristol Myers-Squibb	10 µg/ml
mafosfamid	Mafosfamide-L-Lysine, ASTA Medica AG	1 µg/ml
etoposid	Vepesid, Bristol Myers-Squibb	40 µg/ml
teniposid	Vumon, Bristol Myers-Squibb	20 µg/ml



Příloha č.3:

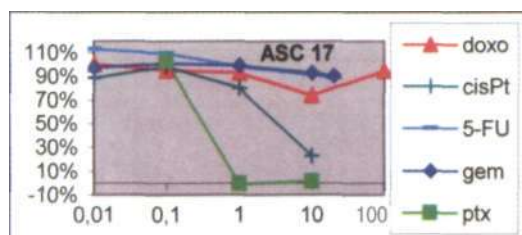
PE 6 - 82letá pacientka, karcinom prsu diagnostikován v prosinci 1997 ve stádiu T4N2M1 (postižení nadklíčkových uzlin). Do srpna 1998 nemoc stabilizovaná podáváním Tamoxifenu. Při lokoregionální progresi pak hormonoterapie změněna na Arimidex. V březnu 1999 se objevil hydrothorax (z tohoto výpotku izolován vzorek PE 6), pacientka za několik dní umřela po embolizaci do plic.

PE 7 - 66letá pacientka s ductálním, invazivně rostoucím karcinomem prsu po ablaci a exenteraci uzlin v roce 1987. Absolvovala adjuvantní chemoterapii CMF (6 cyklů) a lokoregionální aktinoterapii. V roce 1996 pro suspektní recidivu (plicní nález) pokračovala chemoterapií FAC a hormonoterapií Tamoxifenem. V březnu 1999 nález na plicích progredoval, objevil se fluidothorax, došlo k celkovému zhoršení stavu. Brzo po evakuaci výpotku (PE 7) došlo k úmrtí pacientky.

PE 8 - 47letá pacientka po ablaci prsu pro karcinom v únoru 1995 (pT2 NO M0). Adjuvantně podaná chemoterapie CMF. V únoru 1999 relaps nemoci s postižením měkkých tkání v oblasti nadklíčku, hydrothorax. Jeho evakuaci byl získán vzorek PE 8, malignita výpotku cytologicky potvrzena. Pacientka zahájila chemoterapii FAC, na které došlo ke kompletní regresi nemoci. Od jejího skončení sledována, bez známek nemoci.

Asc 17 - 56letý pacient s karcinomem žaludku po gastrektomii v březnu 1998, s infiltrovanými perigastrickými uzlinami, místy s extrakapsulárním šířením. Absolvoval pooperačně chemoterapii ELF 6-krát. Od listopadu 1998 pokračoval chemoterapií FU FA do února 1999. V březnu 1999 přichází na naši kliniku s recidivou procesu v břiše, sahající až do malé pánve a s břišním výpotkem. Jeho evakuaci byl získán vzorek Asc 17. Tumorózní masa způsobila oboustrannou hydronefrozou, pro kterou nebylo možné pokračovat v chemoterapii.

Na uvedených grafech je výsledek testu rezistence nádorových buněk vůči doxorubicinu (doxo), 5-fluorouracilu (5-FU), gemcitabinu (gem), cisplatině (cisPt) a paklitaxelu (ptx). Na ose x jsou v logaritmickém měřítku vyneseny koncentrace, ve kterých byly látky testovány (jako násobek *ppc*). Na ose y je vyneseno procento viabilních buněk.



Legenda u grafu Asc 17 je společná pro všechny čtyři grafy. Rezistence buněk vzorku PE 7 a Asc 17, které patřily více předléceným pacientům, je znatelně vyšší. Buňky PE 8 jsou *in vitro* citlivé vůči doxorubicinu i 5-fluorouracilu, viabilita buněk v těchto substancích klesá již při nízkých koncentracích. Analogicky tomu pacientka reagovala na chemoterapii FAC kompletní regresi nemoci.

MTT test

Po skončení inkubace buněk s cytostatiky (72-96 hod) bylo do každé jamky přidáno 10 ml MTT roztoku (3-[4,5-dimefthylthiazol-2-yl]-2,5-diphenyltetrazolium bromide, Sigma), čerstvě připraveného v koncentraci 5 mg/ml PBS a filtrovaného přes 0,2 mm filtr (Millipore). Po 6 hodinách inkubace v 37 °C a 3,5% CO₂, byla pod invertovaným mikroskopem s fázovým kontrastem (Olympus CK2) hodnocena v každé jamce přítomnost buněk, jejich viabilita a důsledně zkontrolováno, jestli nedošlo ke kontaminaci jamek (bakteriální či kvasinková kontaminace, mikroskopicky dobře detekovatelná, má zásadní vliv na výslednou optickou densitu jamek, ve které se nachází). Všechny odchylky byly pečlivě zaprotokolovány a brány v úvahu při hodnocení testu. Poté bylo do každé jamky přidáno 100 ml 10% lyzačního roztoku SDS (Lauryl sulfate, Sigma) s pH upraveným pomocí NaOH na 5,3. Destička byla dále kultivována přes noc při 37 °C. Po skončení inkubace byla změřena optická densita všech jamek v ELISA readeru (MR 700, Dynatech) při vlnové délce 550 nm a pozadí 630 nm.

Vyhodnocení testu

Získané hodnoty optické denzity jednotlivých jamek byly graficky zpracovány v programu Microsoft Excel. Na ose x byly zaznamenány koncentrace testovaných cytostatik v jejich relativní hodnotě (násobek *ppc*), na ose y procento viabilních buněk. Procento viabilních buněk bylo vypočteno jako podíl optické denzity v testovací jamce a optické denzity v jamce bez přítomných cytostatik. Od obou hodnot bylo odečteno pozadí - optická densita jamek, ve kterých bylo jenom médium, MTT a SDS. Od testovací jamky s maximální koncentrací cytostatika bylo odečteno i pozadí cytostatika, tj. optická densita jamek, ve které bylo k médiu přidáno jenom cytostatikum v této maximální testované koncentraci. V případě doxorubicinu bylo nutné takto korigovat optickou densitu všech jamek s výslednou koncentrací cytostatika vyšší než je 1 *xppc*. U ostatních cytostatik byl jejich vliv na výslednou optickou densitu jamek zanedbatelný.

Výsledky

V průběhu zhruba jednoho roku bylo pro další zpracování získáno 34 břišních a 24 hrudních výpotku. Přítomnost maligních elementů byla cytologicky potvrzena u 10 břišních a 17 hrudních výpotku. Dostatečné množství maligních buněk, potřebné k provedení testu (500 000 viabilních buněk na jedno cytostatikum), bylo však po centrifugaci 500 ml těchto výpotku získáno pouze

z 11 břišních a 6 hrudních výpotku. Zejména u hrudních výpotků bylo častým problémem po izolaci nádorových buněk jejich shlukování do velkých, dutých, mnohobuněčných koulí, které bránily vytvoření homogenní suspenze těchto buněk a tím provedení testu. V případě malého množství nádorových buněk byla z nich založena kultura s úmyslem namnožit tyto buňky a provést test chemorezistence po jejich pasáži *in vitro*. V jediném případě (Asc 29) byl pokus o založení kultury úspěšný. V ostatních případech došlo většinou k adhezi maligních buněk na povrch kultivační misky či lahvičky a poté již pouze k jejich degeneraci a buněčné smrti. Po několika dnech (7-10) došlo ve většině založených kultur k proliferaci příměsných fibroblastů a mezotelií a posléze, po asi 20 dnech, k jejich přemnožení. V tabulce č. 1 je přehled zdrojů výpotku a jejich využitelnosti vzhledem k primární lokalizaci nádoru.

Na několika prvních vzorcích byly testovány jenom tři koncentrace cytostatik velmi širokého rozptylu. Výsledná koncentrace byla rovná setině, jednonásobku a stonásobku *ppc*. V případě některých substancí, maximální koncentrace, která byla *in vitro* testována, musela být nižší, což bylo dáno koncentrací látky, v jaké byla dodávána. Tak 5-fluorouracil byl testován při maximální koncentraci 20 *xppc*, gemcitabin 20 *xppc* a cisplatin 10 *xppc*. Paklitaxel byl pro svoje vysoce viskózní vlastnosti testován maximálně v koncentraci 20 *xppc*. Každá koncentrace byla testována minimálně ve třech jamkách.

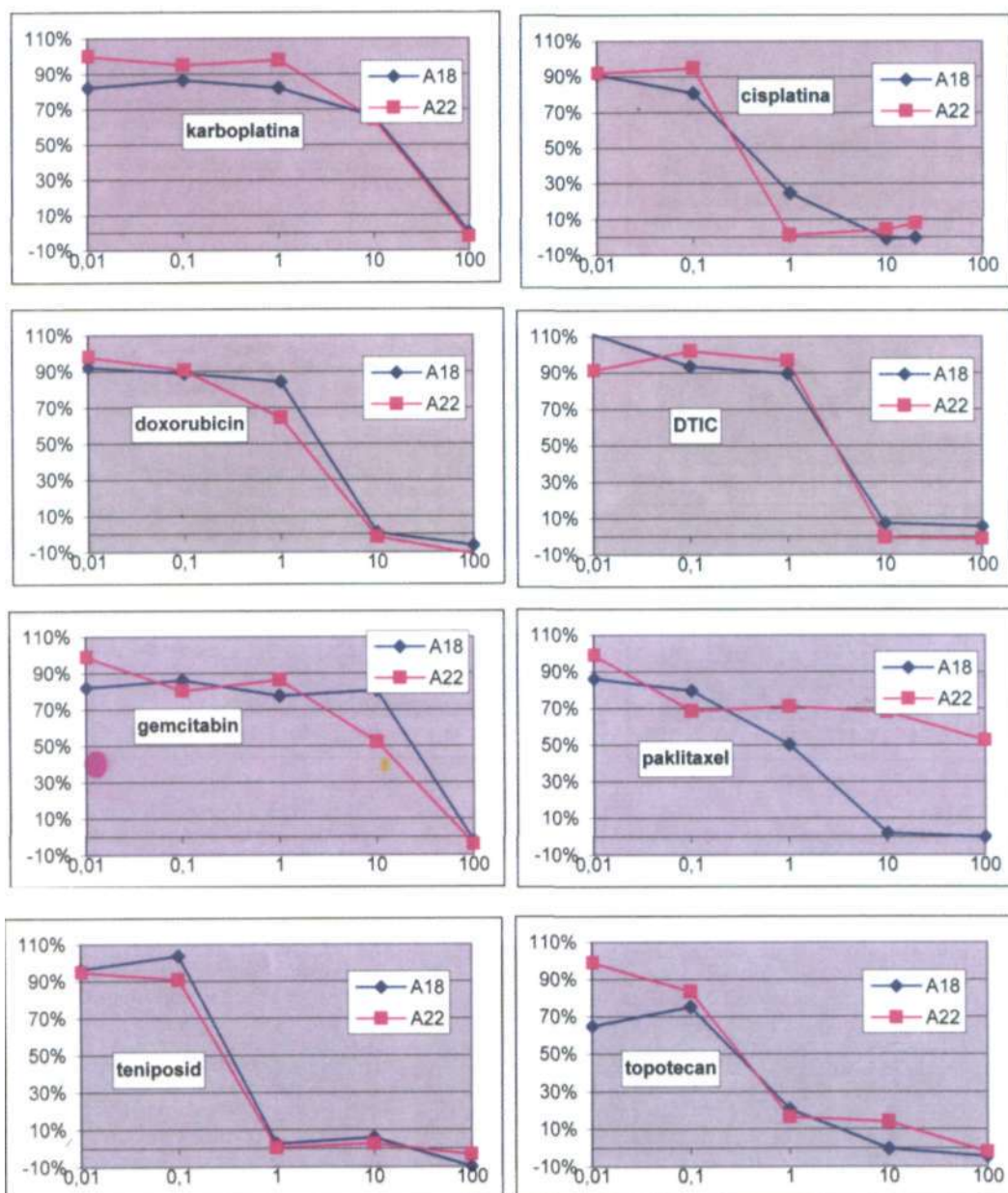
Výsledky testů potvrdily, že při důsledné homogenizaci buněčné suspenze je variabilita hodnot optické denzity naměřených v jamkách se stejnou koncentrací testovaného agens nízká. V grafech v příloze číslo 3 je uveden výsledek testování chemorezistence izolovaných buněk u čtyř pacientů (PE 6, PE 7, PE 8 a Asc 17). Nádorové buňky byly kultivovány v doxorubicinu, 5-fluorouracilu, cisplatině, gemcitabinu a paklitaxelu ve výše popsaných koncentracích. Výsledek testu ukázal, že buňky izolované z výpotku více předlécených pacientů (PE 7 a Asc 17) vykazují větší rezistenci vůči testovaným cytostatikům. Maligní buňky ze vzorku PE 8 nejevily *in vitro* rezistenci vůči doxorubicinu ani 5-FU. V korelaci s tím pacientka, která byla dále léčená chemoterapií FAC dosáhla kompletní regrese nemoci.

Následovalo několik testů, ve kterých byl zvětšen počet testovaných koncentrací nejdříve na pět, s každou koncentrací opakovanou 2krát. Protože se opět potvrdil malý rozptyl hodnot výsledné optické denzity při stejné koncentraci testovaného cytostatika, byl počet koncentrací jedné testované látky zvýšen na devět. V tom-

Příloha č.4:

Asc 18 a Asc 22 (A18, A22) - 27letá pacientka, přeložena na naši kliniku s primárním záchytem nádorového onemocnění, které se manifestovalo přítomností maligních výpotků - břišního, oboustranně hrudního, perikardiálního a zvětšených subklavikulárních uzlin vlevo. Dne 13.4.99 byla provedena evakuace břišního výpotku, z něhož byl získán vzorek Asc 18. Po jeho evakuaci bylo rozhodnuto, pro rychlou progresi nemoci a zhoršování stavu, o aplikaci chemoterapie paklitaxel + cisplatina. Několik dní po aplikaci, 26.4.99, byla nutná opakovaná evakuace břišního výpotku, z kterého byl získán vzorek Asc 22. V krátké době došlo u pacientky k celkovému metabolickému rozvratu a k exitu.

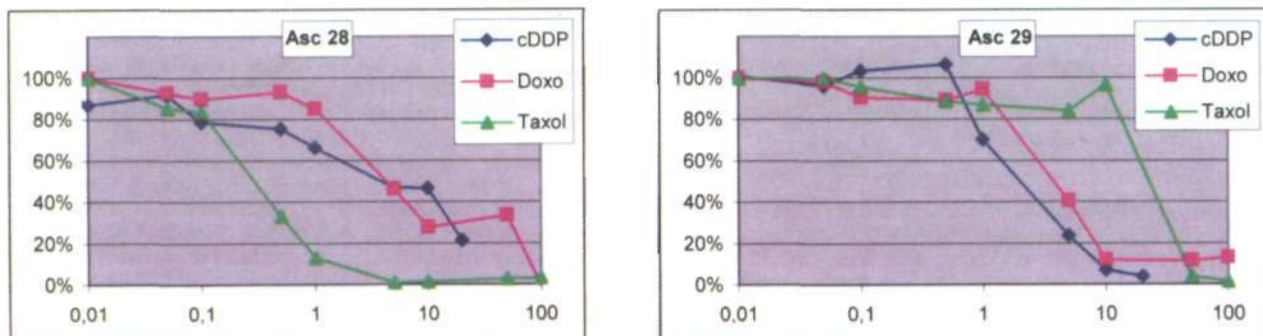
V každém grafu je vyneseno výsledky testování rezistence buněk izolovaných z Asc 18 a Asc 22 k jednomu chemoterapeutickému agens. Na ose x jsou v logaritmickém měřítku vyneseny koncentrace, ve kterých byly látky testovány (jako násobek ppc). Na ose y je vyneseno procento viabilních buněk. Zajímavý je fakt, že zatím co odpověď buněk izolovaných z dvou za sebou v krátké době (13 dní) následujících výpotků na většinu testovaných látek zůstává přibližně stejná, prudce stoupá rezistence vůči paklitaxelu.

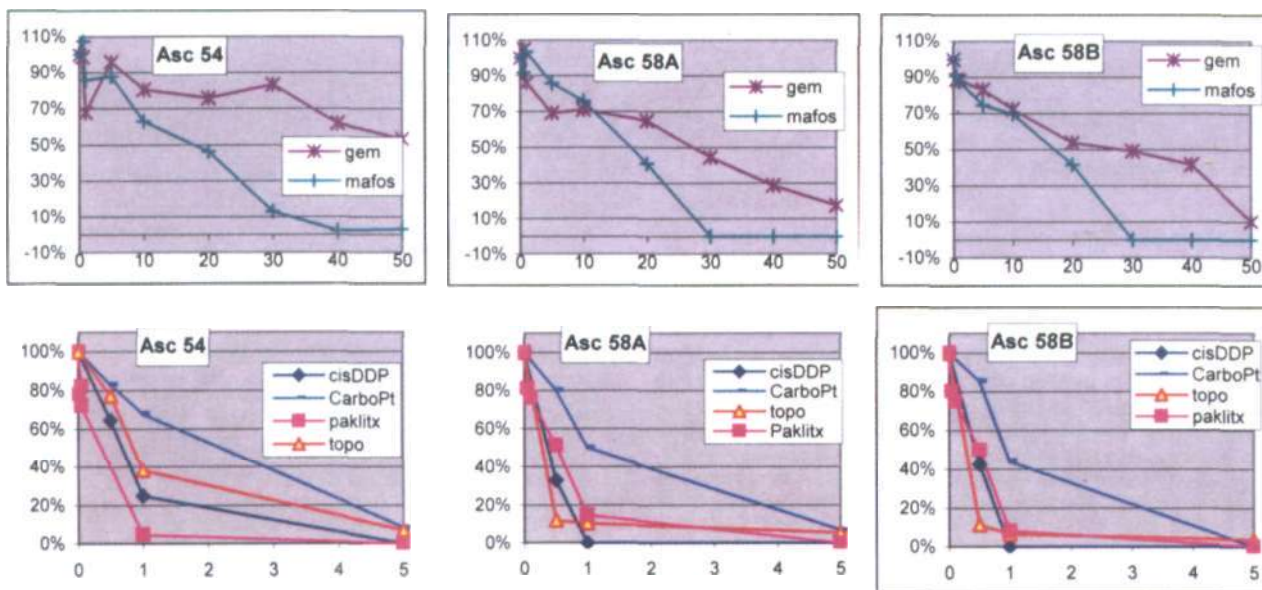


Příloha č. 5:

Asc 28 a Asc 29 - 50letý pacient od května 1999 s nádorem neznámé primární lokalizace, metastazujícím do krčních uzlin vpravo a do jater. V červnu a červenci 1999 absolvoval dva cykly chemoterapie cisplatina + vepesid, při kterých progresi stavu. Dne 16.8.99 byla provedena evakuace břišního výpotku, bohatá na nádorové buňky. Z této punkce byl získán vzorek Asc 28. Den po punkci byl aplikován intravenózně doxorubicin v monoterapii. 20.8. provedena další punkce břišního výpotku, získán vzorek Asc 29. Exitus nastal druhý den.

Grafy v příloze číslo 5 ukazují výsledky testování rezistence buněk izolovaných z obou výpotků vůči vybraným cytostatikům (cDDP - cisplatina, Doxo - doxorubicin, Taxol - paklitaxel). Na ose x jsou v logaritmickém měřítku vyneseny koncentrace, ve kterých byly látky testovány (jako násobek ppc). Na ose y je vyneseno procento viabilních buněk. Rovněž jako v předešlém případě došlo k indukci rezistence buněk vůči, jinak in vitro velmi účinnému, paklitaxelu. V tomto případě již bylo testováno 9 koncentrací v rozmezí 0,01 až 100 xppc, každá koncentrace pouze jedenkrát.





Příloha č. 6: Grafy ukazují výsledek testování rezistence buněk izolovaných z břišních výpotků dvou pacientek s ovariálním nádorem. V prvním případě byly izolovány buňky označené Asc 54. Ve druhém případě, Asc 58, izolované množství buněk umožnilo provedení testu se stejnými látkami opakovaně. Na ose x grafů je zaznamenána koncentrace testovaných látek v relativní hodnotě, jako násobek jejich *ppc*. Na ose y je zaznamenáno procento viabilních buněk po kokultivaci s testovanou chemickou látkou (gem - gemcitabin, mafos - mafosfamid, cisDDP - cisplatina, CarboPt - karboplatina, paklitx - paklitaxel, topo - topotekan). Je možné pozorovat, že odpověď buněk Asc 58 je v obou případech (Asc 58A a Asc 58B) stejná a liší se od odpovědi buněk Asc 54.

to provedení již pak nebylo možno testovat více jamek stejné koncentrace.

V grafech v příloze číslo 4 a 5 je výsledek testu s pěti (č.4) a devíti (č.5) koncentracemi testovaných látek provedeného na buňkách získaných z opakované břišní punkce dvou pacientů. V obou případech šlo o vysoce pokročilé nádorové onemocnění, málo předléčené, nereagující na podanou chemoterapii. V obou případech mezi evakuací prvního a druhého výpotku došlo k aplikaci 1 cyklu chemoterapie. Zajímavý je proto fakt, že v obou případech došlo u nádorových buněk z druhého výpotku k "indukci" rezistence vůči paklitaxelu, látce, vůči které většina testovaných buněk *in vitro* byla vysoce citlivá.

V další sérii testů bylo na základě výsledků předchozích testů vybráno užší rozmezí testovaných koncentrací. Pro většinu cytostatik je testována 0,5 až 50-násobná koncentrace *ppc*, v tomto rozmezí je testováno 8 koncentrací. Pro cisplatinu je testováno 6 koncentrací v rozmezí 0,5 až 20-ti násobku *ppc* a pro paklitaxel 8 koncentrací v rozmezí 0,05 až 20-ti násobku námi uvažované *ppc* koncentrace. V tomto uspořádání byli zatím provedené čtyři poslední testy (Asc 54, Asc 58, Asc 65 a PE 38). V případě výpotku ovariálního nádoru Asc 58 nám dostatek izolovaných buněk umožnil provést dva na sebe nezávislé testy se stejnými koncentracemi stejných chemoterapeutických látek. V příloze číslo 6 lze opět vidět, že dvě odlišné buněčné kultury Asc 54 a Asc 58 se liší svou odpovědí na testované koncentrace cytostatik, zatím co pro opakované provedení testu se stejnou buněčnou kulturou zůstává odpověď stejná.

Diskuse

Testování chemoterapeutik *in vitro* zahrnuje mnoho kroků, jejichž nesprávné provedení či interpretace může vést k selhání celého testu. Při testování nádorové buněčné populace získané rozvolněním solidních nádorů je prvním problémem již získání dostatečně velké vzorku, který lze použít pro *in vitro* test. Maligní výpotky jsou z tohoto pohledu lehce dostupným zdrojem nádorové buněčné populace. V našem souboru jen asi čtvrtina výpotků obsahovala dostatečné zastoupení nádorové populace. Izolace těchto buněk z příměsí benigních elementů (erytrocyty, granulocyty, malé i velké monocyty, mesotelie, často i degenerované, fibroblasty) je do určité míry možná pomocí gradientové centrifugace v Percollu. Přesto je nesporné, že část benigní populace zůstává i po opakovaném pročištění suspenze přítomná. Z každé izolované a pročištěné buněčné suspenze jsme zakládali souběžně buněčnou kulturu. K proliferaci benigních elementů docháze-

lo až po 7-10 denní pokojové fázi. K ovlivnění výsledků testu provedeného v prvních 3-5 dnech po izolaci buněk teda může dojít jedině v případě, že je zastoupení benigních buněk i po izolaci významné. Zůstává proto nezbytným ověření procentuálního zastoupení viabilních nádorových buněk v izolované buněčné suspenzi a v ideálním případě rovněž v negativní kontrole (nevystavené žádnému cytostatiku) po skončení testu. Suspenze s méně než 50% zastoupením viabilních nádorových buněk zcela určitě nelze považovat za použitelnou. Tento fakt je o to důležitější, že i benigní buněčná suspenze, s kterou byl *in vitro* proveden test s několika cytostatiky měla určitou charakteristickou citlivost či rezistenci vůči těmto látkám. Z výsledku testu nelze již pak zpětně odečíst jaká populace buněk byla testována.

Přesto, že MTT test patří k těm testům, jejichž provedení je relativně jednoduché, zjistili jsme, že pro získání validních dat je nutné při jeho provedení přesně dodržovat určitý postup v některých krocích. Buněčná suspenze, která bude v testu použita, musí být maximálně homogenní. Proto i v průběhu její aplikace do 96-jamkové destičky musí probíhat její neustálá resuspendace. Zároveň ale tento proces nesmí trvat dlouho, protože proudění vzduchu v laminárním boxu (sterilní prostředí je zcela nezbytné) dokáže v průběhu zdlouhavé manipulace s otevřenou destičkou zmenšit objem suspenze v jamkách až o 10%, což již není zanedbatelné. Totéž platí pro následnou práci s cytostatiky, které, pro uchování aktivity, je vhodné uchovávat koncentrované v -70 °C a fedit až před použitím. Manipulace s nimi po rozmrazení nesmí být příliš zdlouhavá pro jejich vysokou citlivost na světlo a pro možnou změnu jejich aktivity. Vynechání krajních jamek pouze pro médium je rovněž nevyhnutné, vypařování média z těchto krajních jamek po dobu inkubace bylo pozorováno i jinými autory (Pieters et al. 1990). Doba, po kterou je doporučeno inkubovat buňky v přítomnosti cytostatik se podle různých autorů liší od 1 hodiny (Von Hoff et al. 1990b), 4 hodin (Smith et al. 1990) až po 96 hodin (Bosquet et al. 1996). Nejvíce používanou dobou, zejména v MTT provedení zůstává 72 hodin. Při hodnocení viability buněk považujeme za zcela nezbytné, před zlyzováním MTT krystalků a s tím i úplným zlyzováním buněk, aby byl zhodnocen opticky obsah všech jamek. Lze tak předejít zanesení nespecifických hodnot do výsledku testů.

Výběr koncentrací, které budou v *in vitro* testu použité, je dalším klíčovým bodem úspěšnosti testu. Kultivace nádorových buněk v cytostatikách *in vitro* je v mnohém odlišná od *in vivo* situace. Proto není možné jednoduše odvodit koncentraci pro *in vitro* testování od léčebné dávky. Pomocí dosavadních výsledků jsme se

snažili zjistit kritickou koncentraci testovaných cytostatik *in vitro*, tj. koncentraci, při které dochází u většiny buněk k manifestaci cytotoxického účinku. Až po získání výsledků testů mnoha rozličných buněčných kultur testovaných v těchto kritických koncentracích budeme moci srovnat odpovědi různých kultur navzájem a zjistit, zda je možné z výsledku testu předpokládat odpověď pacienta na léčbu.

Závěr

Cílem práce, která nadále pokračuje, je zjistit, zda je možno buňky izolované z maligních výpotků pacientů s pokročilým nádorovým onemocněním použít k vedení jejich další léčby. Z předběžných výsledků experimentů lze tvrdit následující: (1.) Maligní výpotky (s cytologicky potvrzenou přítomností nádorových buněk) jsou cenným zdrojem nádorových buněk, které lze dále použít. (2.) Tyto maligní buňky lze izolovat od příměsných benigních buněk a tuto izolaci opět cytologicky potvrdit. (3.) Jedna z možností použití izolovaných nádorových buněk je testování účinku cytostatik *in vitro*. (4.) Většina cytostatik je aktivní i v *in vitro* kultivačním systému. (5.) Citlivost izolovaných maligních buněk na jednotlivá cytostatika *in vitro* je měřitelná pomocí testování viability buněk po jejich expozici testované látky. (6.) Odpověď buněčných kultur na testovaná cytostatika je pro ně charakteristická (opakování testu vede ke stejným výsledkům) a odlišuje je od jiných buněčných kultur. Je třeba získat ještě další srovnatelné data k ověření těchto hypotéz: (1.) Odpověď maligních buněk na cytostatika *in vitro* je ovlivněna stádiem nemoci a lze proto jejich citlivost či rezistenci považovat za další použitelný diagnostický či prognostický faktor. (2.) Z odpovědi maligních buněk *in vitro* lze analogicky odvodit pravděpodobnost odpovědi nádorových buněk *in vivo* na stejné agens.

Dodatek

Tato práce vznikla a pokračuje díky finančnímu příspěvku Interní grantové agentury Ministerstva zdravotnictví České republiky (číslo grantu NC-5614-3), díky finanční podpoře z výtěžku Běhu Terryho Foxe, a díky spolehlivé práci Martiny Vobořilové, Ing. Ivy Kudláčkové a Evy Taišlové.

Literatura:

1. Bellamy WT: Prediction of response to drug therapy of cancer. A review of *in vitro* assays. *Drugs* 44(5): 690-708,1992
2. Black MM, Speer FD: Further observation on the effects of cancer chemotherapeutic agents on the *in vitro* dehydrogenase activity of cancer tissue. *J Natl Cancer Inst* 14: 1147-1158,1954
3. Bosanquet AG: Stability of solutions of antineoplastic agents during preparation and storage for *in vitro* assays. *Cancer Chemother Pharmacol* 17:1-10,1986.
4. Bosanquet AG, Bell PB: Enhanced *in vivo* drug sensitivity testing of C L L using refined DiSC assay methodology. *Leukemia Res* 20:143-153,1996.
5. Carmichael J, De Graff W, Gazdar A, Minna J, Mitchell J: Evaluation of a tetrazolium-based semi-automatic colorimetric assay: Assessment of chemosensitivity testing. *Cancer Research* 47:936-942,1987.
6. Cree IA, Kurbacher CM: Individualizing chemotherapy for solid tumors - is there any alternative? *Anticancer Drugs* 8:541-548,1997
7. Fruehauf JP, Bosanquet AG: *In vitro* determination of drug response: a discussion of clinical applications. In: DeVita VT, Hellman S, Rosenberg SA, eds. *Cancer. Principles & practice of oncology - 4th edition*. Philadelphia, Lippincott Company; 1993.
8. Hunter EM, Sutherland LA, Cree IA, Subedi AM C, Hartmann D, Linder D, Andreotti PE: The influence of storage on cytotoxic drug activity in an ATP based chemosensitivity assay. *Anti Cancer Drugs* 5:171-176,1994.
9. Pieters R, Loonen AH, Huismans DR, Broekema GJ, Dirven MWJ, Heyenbrok MW, Hanlen K, Veerman AJP: *In vitro* drug sensitivity of cells from children with leukemia using the MTT assay with improved culture conditions. *Blood* 76(11): 2327-2336,1990.
10. Smith HS, Zoli W, Volpi A, Hiller A, Lippman M, Swain S, Mayall B, Dollbaum Ch, Hackett AJ, Amadori D: Preliminary correlations of clinical outcome with *in vitro* Chemosensitivity of second passage human breast cancer cells. *Cancer Res* 50:2943-2948,1990.
11. Tannock IF, Goldenberg GG: Drug resistance and experimental chemotherapy. In Tannock IF, Hill RP, eds. *The basic science of oncology - 3rd ed*. McGraw-Hill, Health Professions Division; 1998.
12. Von Hoff DD, Clark GM, Stogdill BJ, Sarosdy MF, O'Brien MT, Casper JT, Mattox DE, Page CP, Cruz AB, Sandbach JF: Prospective clinical trial of a human tumor cloning system. *Cancer Res* 43:1926-1931,1983.
13. Von Hoff DD: He's not going to talk about *in vitro* predictive assay again, is he? *J Natl Cancer Inst* 82(2): 96-101,1990 a.
14. Von Hoff DD, Sandbach JF, Clark GM, Turner JN, Forseth BF, Piccart MJ, Colombo A, Muggia FM: Selection of cancer chemotherapy for a patient by an *in vitro* assay versus a clinician. *J Natl Cancer Inst* 82:110-116,1990 b.
15. Weisenthal LM: Predictive assays for drug and radiation resistance. In: Master JRW, ed. *Human cancer in primary culture, a handbook*. Kluwer Academic Publisher; 1991.
16. Weisenthal LM, Dill PL, Kumick NB, Lippman ME: Comparison of dye exclusion assay with a clonogenic assay in the determination of drug-induced cytotoxicity. *Cancer Res* 43:258-264,1983.

ANALÝZA CHEMOSENZITIVITY BUNĚČNÝCH LINIÍ MALIGNÍHO PŮVODU A PRIMOKULTUR LIDSKÉHO MALIGNÍHO MELANOMU NA PANEL PROTINÁDOROVÝCH CHEMOTERAPEUTIK

CHEMOSENSITIVITY OF MALIGNANT CELL LINES AND PRIMARY HUMAN MALIGNANT MELANOMA CULTURES TO ANTICANCER DRUGS

CHUMCHALOVÁ J.¹, DUŠEKL², KOVAŘÍK J.³

BIOLOGICKÝ ÚSTAV LÉKAŘSKÉ FAKULTY MU, BRNO¹, KATEDRA CHEMIE ŽIVOTNÍHO PROSTŘEDÍ A EKOTOXIKOLOGIE PŘÍRODOVĚDECKÉ FAKULTY MU, BRNO², ODDĚLENÍ BUNĚČNÉ A MOLEKULÁRNÍ ONKOLOGIE MASARYKOVA ONKOLOGICKÉHO ÚSTAVU, BRNO³

Korespondující autor: Jitka Chumchalová, Oddělení buněčné a molekulární onkologie Masarykova onkologického ústavu, Žlutý kopec 7, Brno 656 53, telefon: 05-43133302, e-mail: jchumch@med.muni.cz

Souhrn: Ve studii byla hodnocena léková rezistence 12 buněčných linií maligního i normálního původu na panel 7 cytostatik a primokultur maligního melanomu na panel 8 cytostatik v podmínkách *in vitro* pomocí MTT testu. Vnímavost jednotlivých buněčných linií na poškození cytostatiky jsme analyzovali z hlediska histogenetického původu buněk a statusu genu p53. Výsledky ukázaly, že účinek DOX a v menší míře DDP, BLEO a VBL je závislý na histogenetickém původu modelových linií s vyšší rezistencí karcinomů než sarkomů. Pro 5-FU, MTX a TAX tato závislost prokázána nebyla. Souvislost mezi alteracemi v genu p53 a vnímavostí na cytostatika byla zjištěna pouze u 5-FU a VBL. Léková rezistence v primokulturách maligního melanomu byla hodnocena odděleně na buňkách, které po 24 hodinové kultivaci rostly v suspenzi či adherentní formě. Obě tyto formy dávaly pozitivní reakci s monoklonálními protilátkami (S100, HMB, NKI). S výjimkou jedné primokultury s vysokou rezistencí na všechna farmaka byly ostatní explantované buňky citlivé na VBL, DDP a DOX. Statistické hodnocení MTT testu prokázalo vyšší rezistenci buněk suspenzních než buněk adherentních. **Clíčová slova:** Chemosenzitivita *in vitro*, nádorové linie, maligní melanom

Summary: The study was designed to examine chemosensitivity of 12 established cell lines of malignant and normal origin on a panel of 7 cytostatics, and to explore the efficacy of 8 cytostatics on the primary cultures of malignant melanoma in *in vitro* conditions using the MTT assay. The rate of susceptibility of various cell lines to a damage induced by anticancer drugs was related to a histogenetic origin of cells and to the status of p53 gene. Our results showed that the effectiveness of DOX, and to a lesser extent of DDP, BLEO and VBL, was related to the histogenetic origin of cells with higher resistance of carcinoma than sarcoma cells. However, this association was not proved for 5-FU, MTX and TAX. The relationship between p53 gene alterations and the cell sensitivity to cytostatics was found only for 5-FU and VBL. Primary cultures of human malignant melanoma exerted an interesting feature. The cells partly grew in adherent phase and partly in suspension. Both of these forms gave positive reaction with three specific monoclonal antibodies (S100, HMB, NKI). The MTT assay was performed separately with each cellular fraction. With the exception of one primary culture showing high resistance to all drugs used the other tumour samples were markedly sensitive to VBL, DDP and DOX. Statistic analyses of MTT test results revealed higher resistance of melanoma cells growing in suspension comparing to adherent ones. **Key words:** Chemosensitivity *in vitro*, malignant cell lines, malignant melanoma

Úvod

V souvislosti s možným zlepšením léčby zhoubných nádorů je v poslední době středem pozornosti testování citlivosti nádorových explantátů *in vitro* a určení optimální léčby pro daného nemocného. Cílem je vyřadit málo nebo neúčinná farmaka, která mohou pacienta poškodit a dokonce mohou svými mutagenními účinky vést k diverzifikaci nádorové populace, a tak negativně ovlivňovat biologické chování nádoru např. selekcí rezistentních klonů nádorových buněk.

V naší studii jsme se orientovali na hodnocení lékové rezistence stabilizovaných lidských buněčných linií maligního a normálního původu na panel vybraných protinádorových chemoterapeutik. Analyzovali jsme souvislost mezi buněčným poškozením cytostatiky, histogenetickým původem buněk a statusem genu p53. Tento supresorický gen se významně podílí na regulaci buněčné odpovědi na poškození DNA, která zahrnuje zastavení buněčného cyklu v G1 fázi, aktivaci reparačních a apoptotických mechanismů. Je známo, že u většiny lidských nádorů jsou tyto fyziologické procesy defektní a že kromě řady jiných faktorů se na těchto patologických dysregulacích podílejí mutace v genu p53. Tyto genetické změny jsou převážně „missense mutace“ v jedné alele, které mohou mít za následek tvorbu nefunkčního proteinu, jeho overexpresi, která je detekovatelná u více jak 50% lidských neoplasií. Vzácné jsou delece nebo terminální mutace v obou alelách genu p53, charakterizované jako „null phenotype“.

V klinické části práce jsme hodnotili citlivost respektive rezistenci primokultur lidského metastatického maligního melanomu. Důvodem volby tohoto modelu byla skutečnost, že právě tento nádor vykazuje největší rezistenci a v diseminovaném stádiu nereaguje prakticky na žádné ze standardních chemoterapeutik. Druhým, neméně podstatným důvodem byla možnost získat relativně homogenní vzorek nádorových buněk s minimální kontaminací buňkami pojivové tkáně a definovat imunocytochemicky jejich původ.

Metody

Buněčné kultury

Celkem jsme testovali 12 lidských buněčných linií různého histogenetického původu a známým statusem v genu p53. Charakteristika buněčných linií je v tabulce 1.

Všechny buněčné linie byly kultivovány v DMEM médiu (Gibco, USA) s přidávkou 10% fetálního telecího séra a inkubovány při 37°C v atmosféře s 5% CO₂.

Explantovali jsme 20 maligních melanomů, ale pouze 8 mohlo být testováno. Primární kultura maligního melanomu v metastatickém stádiu byla získána z metastatické lymfatické uzliny s masivní infiltrací nádorem. Z této uzliny se velmi snadno, pouze mechanickým rozvolněním, izolují nádorové buňky bez nutnosti použít proteolytické enzymy, o nichž se domníváme, že mohou vedle řady dalších faktorů, být příčinou změněného biorytmu buněčné populace, zejména v časném stádiu kultivace *in vitro*. Buňky byly po explantaci několik dnů kultivovány, aby se adaptovaly na podmínky *in vitro* a vstoupily do buněčného cyklu. Před MTT testem jsme imunocytochemicky pomocí 3 monoklonálních protilátek S-100, NKI a HMB specifických převážně pro melanocyty a melanoblasty ověřili, že primokultura je více než 80-90% zastoupena nádorovými buňkami.

Cytostatika

V práci jsme hodnotili účinnost 8 vybraných cytostatik s různým mechanismem účinku. Použité koncentrace jsme volili na základě

Tabulka 1: Charakteristika buněčných linií.

Název linie	Histogenetický původ	Status genu p53
MRC5	diploidní fibroblasty	wt
MCF7	karcinom prsu	wt
ZR75	karcinom prsu	wt
MDA-MB-231	karcinom prsu	280 Arg>Lys
BT474	karcinom prsu	285 Gly>Lys
BT549	karcinom prsu	249 Arg>His
T47D	karcinom prsu	194Leu>Phe
SKBR3	karcinom prsu	175 Arg>His
HT29	karcinom tlustého střeva	273 Arg>His
SKUT1	leiomyosarkom	175 Arg>His 248 Arg>3In
HOS	osteosarkom	156 Arg>Pro
HS913T	fibrosarkom	deletovaný p53

Tabulka 2: Přehled použitých cytostatik a jejich koncentrací.

Koncentrace cytostatik ($\mu\text{g/ml}$)	Přežívající buňky (%) ¹				Statistická významnost ²
	Adherentní buňky		Suspenze		
VBL	20	85.7 (± 20.2)	82.9 (± 12.5)	$p = 0.790$	
	80	30.6 (± 14.1)	63.9 (± 14.5)	$p = 0.039$	
DDP	20	27.6 (± 12.3)	56.7 (± 10.1)	$p = 0.018$	
	80	36.8 (± 26.1)	42.1 (± 18.6)	$p = 0.696$	
MTX	20	97.3 (± 9.6)	105.9 (± 15.7)	$p = 0.374$	
	80	104.6 (± 13.3)	103.9 (± 19.1)	$p = 0.979$	
BLEO	0.4	90.3 (± 7.1)	101.8 (± 11.6)	$p = 0.188$	
	2	93.5 (± 13.1)	104.2 (± 17.1)	$p = 0.071$	
TAX	1	94.9 (± 11.7)	98.8 (± 18.4)	$p = 0.998$	
	5	94.2 (± 18.1)	90.9 (± 15.7)	$p = 0.418$	
DOX	2	22.7 (± 10.3)	53.5 (± 12.4)	$p = 0.019$	
	10	25.9 (± 12.4)	63.8 (± 16.2)	$p = 0.015$	
5-FU	10	81.9 (± 8.6)	96.3 (± 10.1)	$p = 0.009$	
	50	86.1 (± 8.6)	96.3 (± 5.3)	$p = 0.023$	
DTIC	80	91.4 (± 11.1)	93.2 (± 13.8)	$p = 0.576$	
	400	87.8 (± 11.0)	82.3 (± 20.1)	$p = 0.365$	

Tabulka 3: Rozdíly v *in vitro* chemosenzitivitě adherentních a suspenzních buněk maligního melanomu.

Cytostatikum		Použité koncentrace
Cisplatina	DDP	20 - 80 $\mu\text{g/ml}$
Vinblastin	VBL	20 - 80 $\mu\text{g/ml}$
Methotrexát	MTX	80 - 20 $\mu\text{g/ml}$
Bleomycin	BLEO	2 - 0.4 $\mu\text{g/ml}$
Taxol	TAX	5 - 1 $\mu\text{g/ml}$
Doxorubicin	DOX	10 - 2 $\mu\text{g/ml}$
5-fluorouracil	5-FU	50 - 10 $\mu\text{g/ml}$
Dakarbazin	DTIC	400 - 80 $\mu\text{g/ml}$

dě literárních údajů o koncentracích používaných v těchto *in vitro* testech. Koncentrace cytostatik pro testy na explantovaných maligních melanomech byly stejné jako u testů na buněčných liniích. Navíc byl testován dakarbazin (DTIC), jako standardně používaný lék pro léčbu maligního melanomu. Přehled cytostatik včetně jejich zkratk a použitých koncentrací uvádí tabulka 2.

Test chemosenzitivity MTT

MTT test je založený na redukci rozpustných tertazoliových solí na nerozpustný formazan mitochondriálními enzymy a vlastně hodnotí ireverzibilní poškození buněk. Pro stabilizované linie jsme připravili buněčnou suspenzi trypsinací, zatímco v případě primárních kultur maligního melanomu byla buněčná suspenze připravena bez použití trypsinu, pouze mechanickým uvolněním ze dna misek. Do 96 jamkových destiček jsme nasadili 10^4 buněk na jamku v celkovém objemu 200 μl včetně cytostatik. Každá koncentrace byla testována ve 4 paralelních jamkách. Pro každou linii jsme jako kontrolu nasazovali identickou buněčnou kulturu bez cytostatik. Buněčné suspenze byly kultivovány v $\text{C}0$, termostatu 48 hodin. Po této době byly buňky inkubovány 4h s 20 μl 3-4,5 dimethylthiazol-2,5 diphenyl tetrazolium bromid (5mg MTT/ml v PBS, pH 7). Následovala centrifugace destiček 5 minut při 4000 rpm a odstranění supernatantu. Do každé jamky se přidalo 200 μl dimethyl sulfoxidu (DMSO) a absorbance výsledného produktu se měřila při 580 nm.

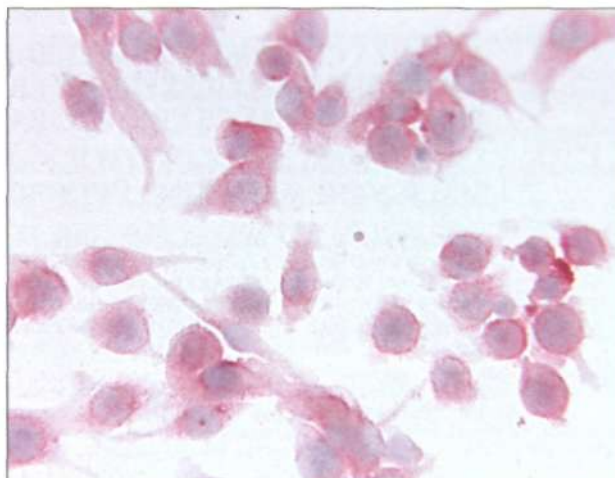
Statistické hodnocení

Základní analýza primárních dat je založena na běžných metodách explorační analýzy. K srovnání dvou nebo více pokusných variant byl použit standardní t-test a analýza rozptylu jednocestného třídění při splnění všech nezbytných předpokladů (homogenita rozptylu, normalita rozložení). Korelační vztahy proměnných byly testovány neparametrickou metodou Spearmanovy pořadové korelace.

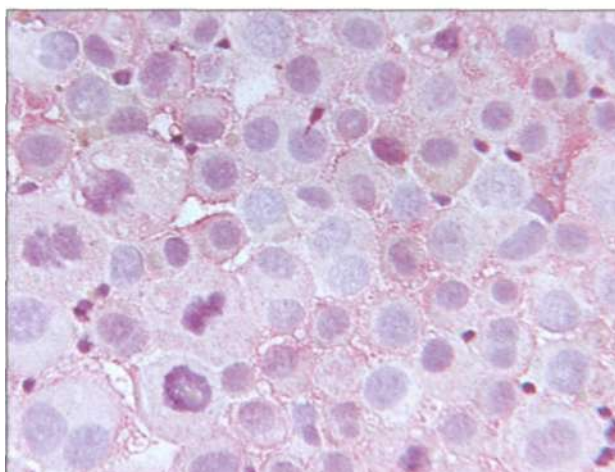
Výsledky

Studie na buněčných liniích

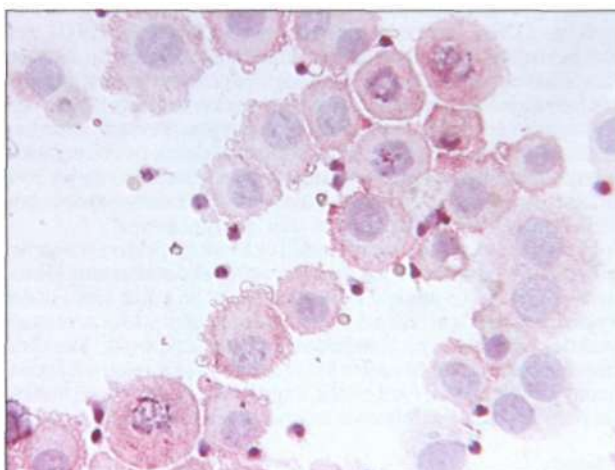
Výsledky MTT testu umožnily rozdělit cytostatika podle účinnosti do následujících tří skupin: a) farmaka s velmi malým cytotoxickým účinkem - MTX a BLEO se 70-100 % přežívajících buněk, b) farmaka se středním účinkem - TAX, DOX a 5-FU s 30-70 % přežívajících buněk, c) farmaka s vysokou cytotoxicitou - DDP a VBL s 10-30 % přežívajících buněk. Jsme si vědomi, že toto třídění nelze zobecnit a platí pouze pro tento konkrétní soubor linií.



Obrázek 1. Primokultura maligního melanomu v adherentní fázi - četné pseudopodie. Melanoblasty charakterizované pozitivní imunocytochemickou reakcí s MAb S100, vizualizace alkalickou fosfatázou. (x500)

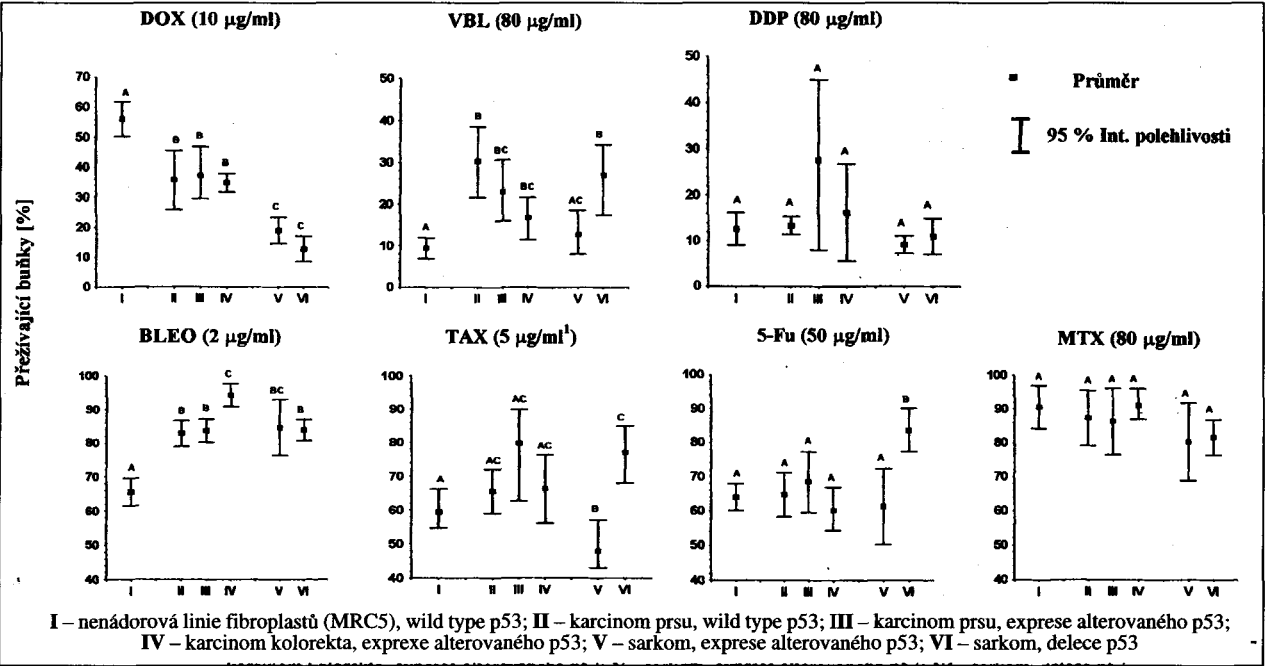


Obrázek 2. Suspenzivní primokultura maligního melanomu s charakteristickým kulovitým tvarem, vícejadernými buňkami a povrchově adheujícími krevními mononukleáry. Imunocytochemie s MAb S100, vizualizace alkalickou fosfatázou. (x500)

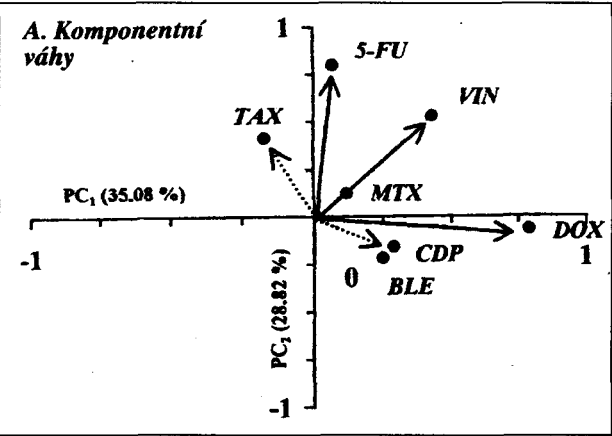


Obrázek 3. Suspenzivní primokultura maligního melanomu. Buňky kulovité morfologie s četnými mitózami, prominentními jádry a s výraznou povrchovou adhezí krevních mononukleárů. Imunocytochemie s MAb S100, vizualizace alkalickou fosfatázou. (x500)

Obrázek 4. Chemosenzitivita buněčných linií v relaci k histogenetickému původu a statusu p53.



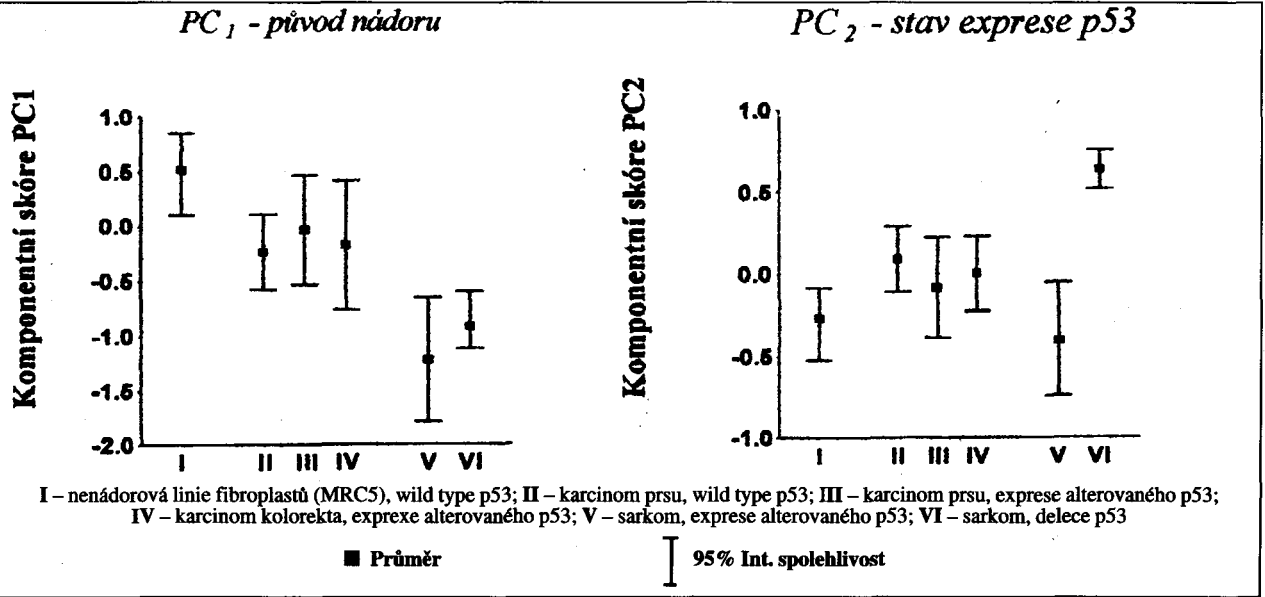
Obrázek 5. Modelová analýza účinku jednotlivých cytostatik k histogenetickému původu linie a statusu p53.

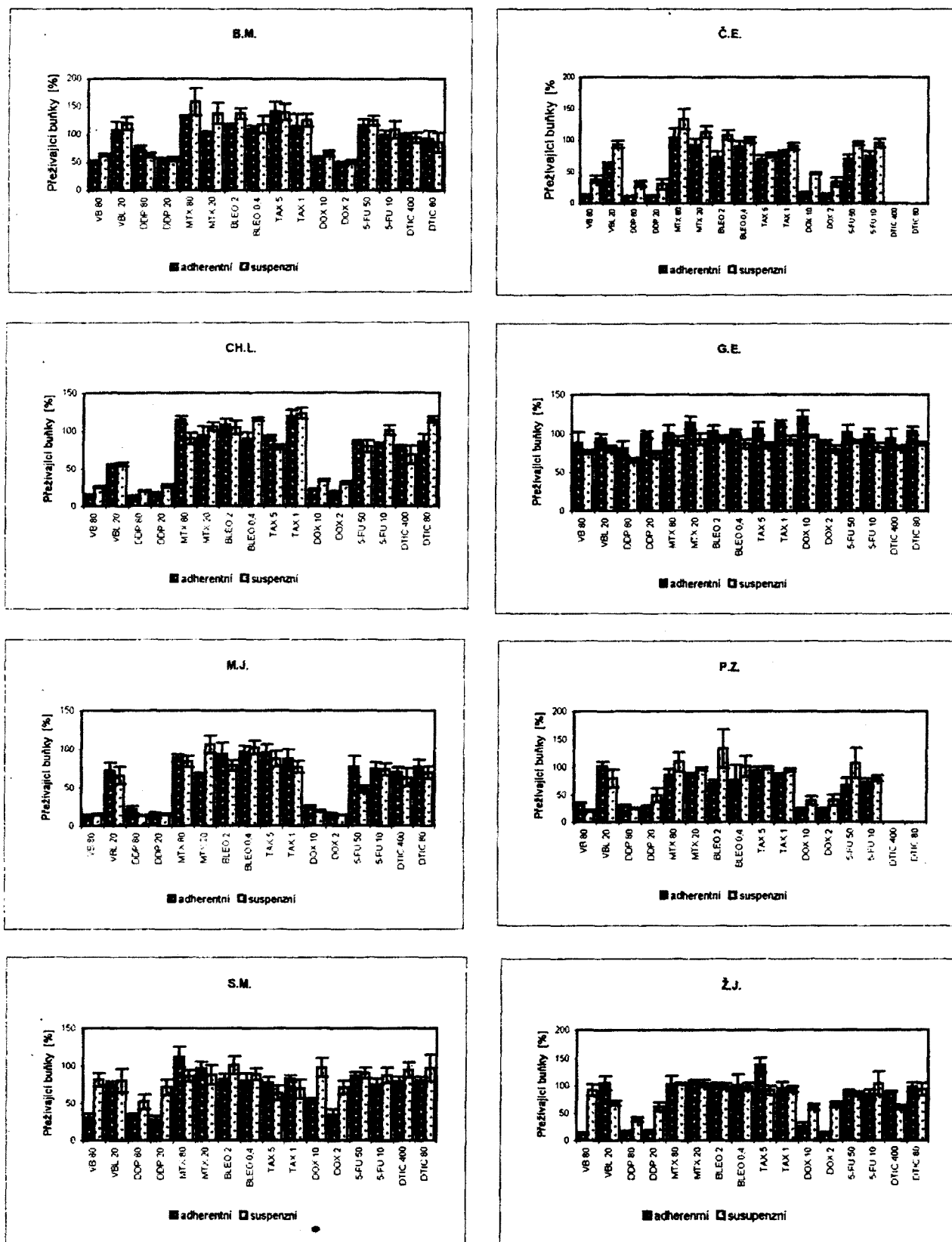


Pro statistické hodnocení jsme linie rozdělili do kategorií podle statusu genu p53 a histogenetického původu. Další testy byly prováděny v rámci těchto kategorií.

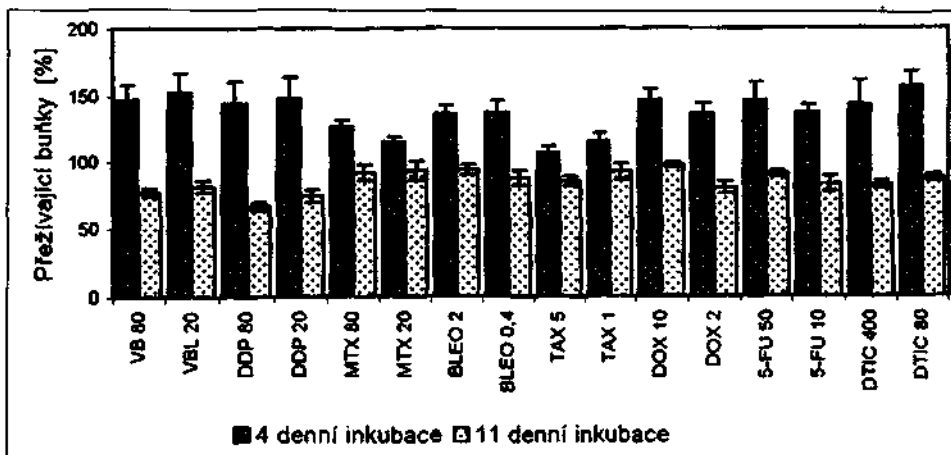
- I - nenádorová linie fibroblastů s wild type p53, (MRC5)
 - II - karcinom prsu s wild type p53, (MCF7 a ZR75)
 - III - karcinom prsu s mutací v genu p53, (BT474, BT549, MDA-MB-231, SKBR3, T47D)
 - IV - karcinom kolorekta s mutací v genu p53 (HT29)
 - V - sarkom s mutací v genu p53 (SKUT-1 a HOS)
 - VI - sarkom s delecí p53, (HS913T)
- Diskriminační potenciál provedených testů ve vztahu k charakteru linií, byl počítán po vyloučení kontrolní nenádorové linie MRC5, která se chovala zcela náhodně. Statistická analýza výsledků umožnila zařadit testovaná cytostatika do čtyř kategorií vzhledem k histogenetickému původu linie a statusu genu p53. První skupina jsou cytostatika jejichž účinek je závislý na původu nádorové linie a je dominantně reprezentována DOX a v menší míře je

B. Rozlišení testovaných linií na základě komponentních skóre





Obrázek 6. Chemorezistence primokultur lidského maligního melanomu.



Obrázek 7. Ovlivnění výsledku MTT testu délkou preinkubace před jeho provedením.

tato závislost patrná i u BLEO a DDP. Do druhé skupiny je možno zařadit pouze 5-FU, jehož cytotoxická aktivita koreluje s mutacemi v genu p53. Třetí skupina je zastoupena VBL, jehož účinek je závislý jak na původu linie, tak částečně na statusu genu p53, což je v protikladu s MTX a TAX reprezentující čtvrtou skupinu. U těchto látek jsme neprokázali souvislost účinku se statusem p53 ani s původem nádorové linie.

Jak ukazuje obr. 4. a obr. 5., můžeme účinek jednotlivých cytostatik v našem testovaném souboru charakterizovat takto: MTX má v dané koncentraci velmi malý účinek na většinu linií, který není závislý na původu buněčné linie ani na statusu genu p53. BLEO vykazuje také velmi malou účinnost na většinu linií, ale statistické hodnocení prokázalo vysoce významně zvýšenou účinnost tohoto cytostatika na kontrolní nenádorovou linii MRC 5. DDP je v aplikovaných koncentracích vysoce cytotoxická s použitými 10 - 20 % přežívajících buněk. Test s DDP je zatížen značnou variabilitou v rámci skupiny karcinomů prsu a kolorekta, kde se vyskytují linie jak citlivé, tak rezistentní. Účinek TAX a 5-FU není závislý na původu nádorových linií. Sarkomová linie s deletovaným genem p53 (HS913T) však vykazovala na obě tato cytostatika významně zvýšenou rezistenci se statistickou významností pouze u 5-FU. U DOX jsme prokázali nejzřetelnější závislost mezi původem linie a účinkem cytostatika, kde rezistence klesá statisticky významně v následující řadě: normální fibroblasty > karcinomy > sarkomy. Status p53 nemá na účinnost DOX konsistentní vliv. Cytotoxicita VBL je závislá jak na původu linie, s výrazně vyšší rezistencí karcinomů mléčné žlázy, tak i na statusu p53, kde je zřejmá snížená citlivost sarkomů s deletovaným p53.

V daném experimentálním modelu jsme prokázali, že původ linie má větší vliv na účinek cytostatik než status genu p53.

Studie na primárních kulturách maligního melanomu

Při mikroskopickém sledování kultur jsme si povšimli, že již po 24 hodinovém transferu do kultivačního média asi polovina buněk adhezuje a další část roste v suspenzi. Imunocytochemickou analýzou jsme prokázali, že většina jak adheřujících, tak suspenzních buněk pozitivně reaguje s kteroukoliv ze 3 monoklonálních protilátek, a že tedy v kultuře je více jak 90% buněk maligního melanomu. Buňky obou fází však vykazovaly určité odlišnosti. Adheřované elementy měly intenzivní metabolickou aktivitu, ale jen sporadické mitózy, naproti tomu buňky suspenzní byly vesměs kulovitěho tvaru s vysokou mitotickou aktivitou Obr. 1,2. Lze se domnívat, že suspenzní frakce obsahuje buňky v pre- a časně postmitotické fázi růstu, kdy se buňky zakulacují a mají nízkou adheřenci k substrátu. Nelze však vyloučit ani přítomnost různých, fenotypově a možná i biologicky odlišných buněčných populací, čemuž by odpovídaly rozdíly v citlivosti na chemoterapeutika mezi adherentními a suspenzními buňkami.

Zajímavým nálezem bylo ulpívání reziduálních mononukleárů na povrchu suspenzních buněk Obr. 3. Často jsme nacházeli buňky v mitóze s částečnými rozetami lymfoidních elementů. Spekulace o tomto fenoménu je nad rámec tohoto sdělení a závěry budou vyžadovat fenotypovou analýzu mononukleárů. To, že explantovaná populace roste ve dvou fázích, může mít význam pro praco-

viště, která před testováním odstraňují supernatant a tedy i část maligní populace a provádějí vlastní mechanickou selekci.

U explantovaných nádorů jsme, na základě výše uvedených charakteristik, prováděli testy citlivosti zvláště na adherentních a zvláště u suspenzních buněk. Hodnotili jsme pouze nádory s dostatečnou výtěžností buněk a s jejich *in vitro* proliferacím potenciálem. Explantovali jsme 20 nádorů z nich pouze 8 splňovalo výše uvedená kritéria. Výsledky MTT testů na primokulturách těchto osmi pacientů jsou graficky dokumentovány na obr. 6. Vzhledem k tomu, co je známo z kliniky

překvapuje *in vitro* podmínkách vysoká citlivost na DDP s výjimkou pacientky G.E., ale i na DOX. U citlivých kultur je však možno pozorovat individuální rozdíly v rozsahu buněčného poškození. Na jedné straně vysoký stupeň destrukce cytostatiky DDP a DOX u nemocných M.J., Č.E. a P.Z., a na straně druhé částečnou rezistenci na obě farmaka u nemocných B.M. a S.M. Překvapující je citlivost na VBL, patrná u pacientky Č.H.L. v obou koncentracích a u pacientů M.J. a B.M. v nejvyšší koncentraci. Výsledky s ostatními farmaky potvrzují očekávaný vysoký stupeň rezistence maligního melanomu.

Srovnání profilů citlivosti suspenzních a adherentních buněk naznačuje, že až na jedinou výjimku tj. primokulturu pacientky G.E., jsou rezistentnější suspenzní buňky. Z tabulky 3 je patrný trend vyšší rezistence suspenzních buněk se signifikantními rozdíly ve vyšších koncentracích u VBL, BLEO a 5-FU a v nižších koncentracích u DDP, DOX a 5-FU. Přijmeme-li, že suspenzní populace je zastoupena převážně buňkami v pre- a časně postmitotické fázi, potom naše výsledky jsou v protikladu ke znalostem o obecně vyšší *in vitro* vnímavosti k buněčnému poškození buněk v pozdní G2 a M fázi. Zcela atypický případ je kultura nemocné G.E. s obecně vysokou rezistencí na všechna farmaka i když jak je z grafu zřejmé, jsou buňky adheřující rezistentnější než buňky v suspenzi.

Zaměřili jsme se rovněž na posouzení, do jaké míry doba inkubace buněk *in vitro* do provedení testu ovlivní jeho výsledek. Jak ukazuje obr. 7. délka inkubace u pacientky G.E. výrazně ovlivnila citlivost na cytostatika. Srovnáním 4 a 11 denní kultivace vidíme výrazný vzestup citlivých buněk po 11 denní kultivaci ve srovnání s 4 denní kultivací. To pravděpodobně souvisí s počtem buněk, které jsou schopny cyklovat a s adaptací na podmínky *in vitro*. Nejde jen o zvýšení citlivosti, ale mění se i stupeň účinnosti jednotlivých cytostatik.

Diskuse

Jednu z největších studií vztahu chemorezistence ke genu p53 provedli O'Connor a spol. Studovali tumor supresorový dráhu p53 v 60 liniích *in vitro* (National Cancer Institute) a vztah mezi integritou této dráhy a inhibičním účinkem 123 protinádorových látek. 39 linií z 58 analyzovaných mělo mutace v genu p53. Tato studie ukázala, že linie s imitovaným genem p53 měly tendenci k nižší citlivosti na chemoterapeutika v jejichž účinku dominuje interkalace, inhibice topoizomerázy I a II a interference s prekurzory nukleových kyselin. Linie s imitovaným p53 genem byly méně citlivé k účinku bleomycinu, 5-fluorouracilu a cisplatině. Autoři neprokázali závislost chemorezistence na statusu genu p53.

Naše studie ukázala významně zvýšenou rezistenci fibrosarkomové linie s deletovaným p53 (HS913T) na 5-FU a VBL ve srovnání s liniemi téže histogeneze nesoucími mutace v p53 (HOS, SKUT1). V podmínkách *in vivo* autoři Goto a spol. sledovali na souboru osteosarkomů vztah LOH genu p53 k preoperační chemoterapii a k přežití pacientů. Jejich práce ukázala, že pouze 15% nádorů s LOH v p53 je citlivá na preoperační chemoterapii, na rozdíl od 64% citlivých nádorů bez LOH v p53. Autoři neprokázali souvislost mezi LOH v p53 a délkou přežití nemocných.

V experimentálním modelu buněčných linií Fan a spol. prokázali souvislost účinku Cisplatiny na statusu p53 zatímco pro taxol a vinkristin tato souvislost prokázána nebyla. Zdá se tedy, že status p53 není dominantní pro stupeň buněčného poškození cytostatiky ze skupiny inhibitorů mitózy. Souhlasně s výše zmíněnou prací jsme nepozorovali souvislost mezi účinností TAX a statusem genu p53, avšak v rozporu s výsledky skupiny Fan jsme tento vztah neprokázali ani pro DDP.

I když se zdá, že v *in vitro* modelovém systému hrají alterace v genu p53 významnou úlohu v citlivosti na některá Protinádorová chemoterapeutika, je málo pravděpodobné, že analogické závislosti platí i pro *in vivo* systém. Je třeba si uvědomit, že v modelových liniích s definovanou mutací/deleci v genu p53 se jedná o alteraci homogenně zastoupenou téměř ve všech buňkách, na rozdíl od situace *in vivo*, kdy změny p53 genu jsou popisovány pouze u určitého procenta nádorových buněk. Nicméně to nevylučuje, že znalost statusu p53 explantovaného nádoru může zpřesnit interpretaci *in vitro* testů lékové rezistence.

Souhlasně s klinickými zkušenostmi ukazují i naše výsledky na modelových buněčných liniích, že účinek cytostatik do značné míry souvisí s histogenetickým původem buněk. Tuto korelaci jsme prokázali pro DOX, DDP, BLEO a VBL. V případě TAX a MTX závislost účinku na histogenetickém typu nebyla patrná. Statistická analýza našich výsledků MTT testů na *in vitro* modelovém systému buněčných linií ukazuje na jejich značnou variabilitu a dokladuje, že z těchto studií lze dělat závěry platné pouze pro tento experimentální systém.

V práci jsme se rovněž zaměřili na hodnocení *in vitro* lékové rezistence primokultur lidského maligního melanomu. První práce tohoto typu se objevují již počátkem 80. let, po vypracování metody kultivace melanomových buněk *in vitro* na měkkém agaru. Schadendorf a spol. (10), testovali chemorezistenci nádorů 19 pacientů s maligním melanomem metodou HTCA k cytostatikům. Pro testy chemorezistence použili následující cytostatika v koncentracích: DTIC 75 g/ml, DDP 40 (Ag/ml), 5-FU 400 µg/ml, DOX 200 µg/ml, BLEO 32 µg/ml, VBL 0,1 (Ag/ml) a MTX 5 µg/ml. Jako nejúčinnější uvádějí 5-FU, VBL a DOX. Srovnáním s klinickou odpovědí zjistili vysokou korelaci mezi rezistencí *in vitro* a *in vivo* a potvrzují tak, že tyto testy mohou vyloučit z léčby málo nebo neúčinná farmaka. Výsledky této skupiny jsme v naší studii potvrdili pro VBL a DOX, nikoliv pro 5-FU. Navíc v našich testech se ukázala jako účinná DDP. Pro tato dvě cytostatika mohou být příčinnou odlišných výsledků značné rozdíly v použitých koncentracích obou látek.

Podobnou studii publikovala skupina Tveita a spol. Autoři explantovali 402 maligních melanomů z nichž ve 240 primokulturách hodnotili chemorezistenci metodou HTCA na 3 cytostatika ve 4 koncentracích: DTIC 80, 250, 800 a 2500 µg/ml, VBL 0,01, 0,1, 1,0 a 10 a lomustine (CCNU) 0,04, 0,4 a 40 µg/ml. Jako nejúčinnější cytostatikum uvádějí DTIC a nejméně účinný VBL. Ani v tomto případě jsme v naší práci nezískaly shodné výsledky, což

s nejvyšší pravděpodobností souvisí jednak v rozdílné metodice hodnocení buněčného poškození (HTCA vs. MTT) a rozdílných koncentracích testovaných farnak.

Velmi zajímavou studii prezentují Tveit a spol. (6), kteří srovnávali citlivost explantovaných primokultur nádorů a od nich ustavených buněčných linií. Autoři udávají pozitivní korelaci na většinu použitých cytostatik, i když některé z ustavených linií vykazovaly zvýšenou chemosensitivitu. Tito badatelé se rovněž zaměřili na velmi zásadní problém, tj. na otázku do jaké míry lze modelové podmínky *in vitro* interpretovat z hlediska podmínek *in vivo*. Práce prokázala výraznou změnu a to jak ve smyslu zvýšené, tak i snížené chemosensitivity po přenosu buněk z *in vitro* do *in vivo* na modelu nu-nu myši a vice versa. Tyto výsledky naznačují, že v *in vivo* systému spolurozhoduje o účinku cytostatik celá řada faktorů, které nelze modelovat v podmínkách *in vitro*.

Cesta individualizované terapie na základě *in vitro* testů se zdá nadějná, ale jak metodický přístup, limitace testů a ověření klinické validity výsledků vyžaduje řadu dalších studií.

Poděkování

Studie byla realizována s finanční podporou „Výzkumného záměru Masarykova onkologického ústavu č. MZ 00020980501“.

Literatura:

1. Levine A. J.: p53, the cellular gatekeeper for growth and division, Cell. 88: 323-31, 1997.
2. Prives C. and Hall P. A.: The p53 pathway, J Pathol. 187: 112-26, 1999.
3. Mendelson J., Howley P. M., Israel M. A. and Liotta L. A.: The Molecular Basis of Cancer, Philadelphia, 1995.
4. Fan S., Cherney B., Reinhold W., Rucker K. and O'Connor P. M.: Disruption of p53 function in immortalized human cells does not affect survival or apoptosis after taxol or vincristine treatment, Clin. Cancer Res. 4: 1047-54, 1998.
5. Furukawa T., Kubota T., Watanabe T., Kase S., Takahara T., Yamaguchi H., Takeuchi T., Teramoto T., Ishibiki K., and et al.: Chemosensitivity testing of clinical gastrointestinal cancers using histoculture and the MTT end-point. Anticancer Res. 12:1377-82, 1992.
6. Tveit K. M., Fodstad O. and Pihl A.: The usefulness of human tumor cell lines in the study of chemosensitivity. A study of malignant melanomas, Int J Cancer. 28:403-8, 1981.
7. Tveit K. M., Gundersen S., Hoire J. and Phil A.: Predictive chemosensitivity testing malignant melanoma: reliable methodology-ineffective drugs, Br J Cancer. 58: 734-7, 1988.
8. O'Connor P. M., Jackman J., Bae I., Myers T. G., Fan S., Mutoh M., Scudiero D. A., Monks A., Sausville E. A., Weinstein J. N., Friend S., Fornace A. J., Jr. and Kohn K. W.: Characterization of the p53 tumor suppressor pathway in cell lines of the National Cancer Institute anticancer drug screen and correlation with the growth-inhibitory potency of 123 anticancer agents, Cancer Res. 57:4285-300, 1997.
9. Goto A., Kanda H., Ishikawa Y., Matsumoto S., Kawaguchi N., Machinami R., Kato Y. and Kitagawa, T.: Association of loss of heterozygosity at the p53 locus with chemoresistance in osteosarcomas, Jpn J Cancer Res. 89: 539-47, 1998.
10. Shadendorf D., Worm M., Algermissen B., Kohlms C. M., and Czarnetzki, B. M.: Chemosensitivity testing of human malignant melanoma. A retrospective analysis of clinical response and in vitro drug sensitivity. Cancer. 73: 103-8, 1994.

VZŤAH MEDZI EXPRESIOU PROTEÍNOV ASOCIOVANÝCH S LIEKOVOU REZISTENCIOU A VÝSLEDKAMI IN VITRO CYTOTOXICKÉHO MTT TESTU U PACIENTOV S NSCLC

RELATION BETWEEN EXPRESSION OF DRUG RESISTANCE ASSOCIATED PROTEINS AND RESULTS OF CYTOTOXIC IN VITRO MTT-ASSAY IN NSCLC PATIENTS

ŠKARDA J.¹, +HAJDÚCH M.², BOUCHAL J.¹, NOSKOVÁ V.², LUDKOVÁ A.², DŽUBÁK P.², TICHÝ T. \ KLEIN J.³, KOLEK V.⁴, KOLÁR Z.¹, KRÁL V.³, MIHAL V.²

¹LABORATOR MOLEKULÁRNI PATOLÓGIE, CMBM UP & ÚSTAV PATOLÓGIE LF UP OLOMOUČ

²LABORATOR EXPERIMENTÁLNI MEDICÍNY PRI DETSKÉ KLINIKE LF UP A FN OLOMOUČ

³I. CHIRURGICKÁ KLINIKA FN OLOMOUČ

⁴KLINIKA TUBERKULÓZY A RESPIRACNÍCH NEMOCI

+korespondujúci autor: Laboratoľ experimentálnej medicíny pri Detskej klinike LF UP a FN Olomouc, Puškinova 6, 775 20 Olomouc, hajduchm@atlas.cz

Súhrn: Mnohopočetná lieková rezistencia (MDR) je častou príčinou neúspešnosti chemoterapie nemalobunkového karcinómu pľúc (NSCLC). U NSCLC rozlišujeme 2 základné typy MDR: typickú MDR asociovanú s expresiou P-glykoproteínu a atypickú MDR asociovanú s expresiou proteínu MRP, alternovanou expresiou topoizoméráz II, expresiou lung rezistance proteínu (LRP), aktivitou glutatión S transferázového systému. Predkladaná práca pojednáva o vzťahu medzi imunohistochemickou expresiou vybraných markerov MDR (MRP, Pgp, topoizomérázy Ha.) a niektorých regulátorov bunčného cyklu a apoptózy - p53, p27, kaspázy3 (pcasp3), tkanivovej transglutaminázy (Tga) s výsledkami testu in vitro chemosenzitivity nádorových buniek pacientov s NSCLC po neoadjuvantnej chemoterapii. Expresia vyššie uvedených faktorov bola stanovená nepriamou imunoperoxidázovou metódou na parafinovom bioptickom materiáli od 64 pacientov s NSCLC po neoadjuvancii na báze karboplatiny (CDDP) a taxolu (TAX) alebo cisplatinu (DDP) a navelbínu. K stanoveniu in vitro citlivosti nádorových buniek na cytostatiká boli použité natívne resekáty od uvedených pacientov. Výsledky boli štatisticky spracované pomocou Spearmanovho korelačného koeficientu, Mann-Whitneyho testu a t-testu. Zistili sme pozitívnu koreláciu medzi imunohistochemickou expresiou MRP/p53 ($p=0,006$), pcasp3/p53 ($p=0,0001$) a inverznú koreláciu p27/Tga ($p=0,027$). Expresia MRP zároveň negatívne korelovala s in vitro citlivosťou na TAX ($p=0,043$). Expresia p53 pozitívne korelovala s in vitro rezistenciou na aktinomycín D ($p=0,01$), daunorubicín ($p=0,026$) a vinkristín ($p=0,044$).

Kľúčové slová: nemalobunčný karcinóm pMc, mnohopočetná lieková rezistencia, apoptóza, bunkový cyklus, terapia

Summary: Multidrug resistance is one of the major causes of treatment failure in NSCLC. Two types of multidrug resistance (MDR) have been detected in lung cancer: typical multidrug resistance associated with the overexpression of P-glycoprotein (Pgp) and atypical MDR associated with the expression of MRP (multidrug resistance protein), altered activity of topoisomerase IIa, increased expression of LRP (lung resistance protein), activation of glutathione S transferase system, etc. This work deals with mutual correlation of immunohistochemical expression of selected markers of MDR (Pgp, MRP, and topoisomerase IIa) and several markers of tumor differentiation and/or apoptosis - p27, p53, procaspase3 (pcasp3), tissue transglutaminase (Tga) with results of in vitro chemosensitivity assay. 64 formaldehyde fixed and paraffin embedded biptic specimens were used for indirect immunoperoxidase detection of the above mentioned markers. MTT test was carried out from native tumors of the same group. Significant positive relationships were detected in between p53/MRP ($p=0,006$), p53/pcasp3 ($p=0,0001$), inverse correlation was found between p27/Tga ($p=0,027$). Expression of p53 was positively associated with the resistance to actinomycin-D ($p=0,01$), daunorubicin ($p=0,026$) and vincristine ($p=0,044$). Expression of MRP negatively correlated with in vitro sensitivity to taxol ($p=0,043$).

Keywords: non-small cell lung carcinoma, multidrug resistance, apoptosis, cell cycle, therapy

Zoznam použitých skratiek:

ACT-D - aktinomycín-D; CDDP - karboplatina (karbo-diaminodichlor platina); DAU - daunorubicín; DDP - cisplatina (diaminodichlorplatina); G MC - gemcitabín; LRP - lung resistance protein; MDR - mnohopočetná lieková rezistencia (multi-drug resistance); MRP - multi-drug resistance protein; MW - Mann Whitney test; NSCLC - non-small cell lung carcinoma; NVB - navelbín; pcasp3 - proenzým kaspázy3; Pgp - P-glykoproteín; TAX - taxol; TCS₅₀ - tumor cell survival 50%; Tga - transglutamináza; TopoII - topoizoméráza IIa; VIN - vincristín

Úvod

Jednou z hlavných príčin neúspešnosti chemoterapie NSCLC je výskyt konštitutívnej a získanej liekovej rezistencie. Medzi významné vlastnosti nádoru, ktoré sa podieľajú na mechanizmoch liekovej rezistencie, patria napr. stupeň vaskularizácie, percento buniek v senescencii ašpecifické mechanizmy MDR (1,2,3). Rozlišujeme 2 základné typy MDR: typickú MDR zapríčinenú funkciou ATP dependentného transportného proteínu P-glykoproteínu (Pgp) a atypickú MDR asociovanú s expresiou MRP proteínov, alternovanou aktivitou topoizoméráz U, zmenou intracelulárnej distribúcie cytostatík asociovanou s expresiou lung rezistance proteínu (LRP) (5,6), glutatión S transferázovým systémom (27), atď. Pgp je membránový transportér zo substrátovou špecifitou napr. pre doxorubicín, vinca alkaloidy a taxány (7,8). Zvýšená expresia mdr1/Pgp nekoreluje s klinickými parametrami u pacientov s NSCLC (9,10,11). Z uvedeného vyplýva, že daný mechanizmus MDR sa na klinickej rezistencii u pacientov s NSCLC výraznou mierou pravdepodobne nepodieľa (12,13). Ďalším MDR asociovaným génom je mrp1 kódujúci proteín MRP (multidrug resistance protein). Funkcia MRP v bronchiálnom epiteli spočíva v transporte cytostatík konjugovaných s glutatiónom v glutatión S-transferázovom systéme (14,15,16). U pacientov s NSCLC korelovala expresia mrp1 mRNA a mrp3 mRNA s in vitro rezistenciou na vinkristín, etoposid a DDP (17). Zároveň bol zistený významný vzťah medzi expresiou MRP a prognózou pacientov s NSCLC, ktorých nádory boli resekované v štádiu JU bez neoadjuvantnej chemoterapie (18). Uvedenému súboru paci-

entov bola následne aplikovaná adjuvantná chemoterapia na báze DDP v kombinácii s vindesinom (VDS) alebo CDDP v kombinácii s etopozidom (VP-16).

Ďalším významným mechanizmom MDR, ktorý sa uplatňuje v rezistencii na niektoré cytostatiká ako napr. DDP a doxorubicín (DOX) je zmena v ich intracelulárnej distribúcii, ktorá spočíva v zabránení vstupu do jadra rezistentných nádorových buniek. Na uvedenom mechanizme sa pravdepodobne výraznou mierou podieľa LRP. Zvýšená expresia LRP bola detekovaná napr. v bunkovej línii A-549 rezistentnej na VP-16. Prognostický význam LRP u pacientov s NSCLC však nie je zatiaľ objasnený (19).

Mechanizmus rezistencie na inhibítory topoizoméráz II spočíva v ich zníženej intracelulárnej akumulácii spôsobenej zníženou aktivitou a expresiou daných enzýmov. Génové mutácie topoizomérázy IIa (TopoII) boli pozorované v líniiach NSCLC rezistentných na daunorubicín (DAU) a VP-16. Výskyt uvedených mutácií v klinických vzorkách pacientov s NSCLC je však veľmi sporadický (20).

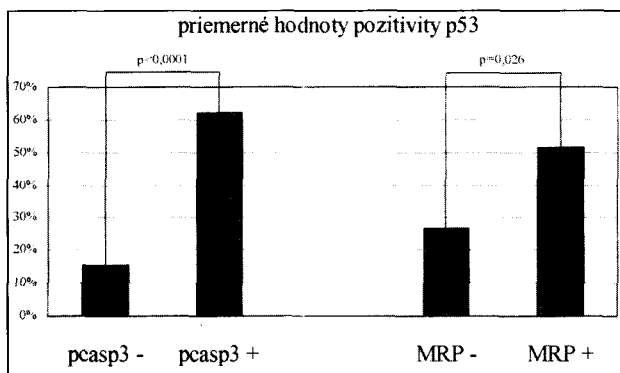
Expresia tkanivovej transglutaminázy bola popisovaná v súvislosti s indukciou rezistencie na DOX a skríženou rezistenciou na VIN v bunkovej línii PC-14/ADR. Prognostický význam exprese daného enzýmu vo vzorkách pacientov s NSCLC taktiež nie je objasnený (21,22,23).

K vzniku MDR prispievajú kvantitatívne a kvalitatívne alterácie v expresii onkogénov a génov fungujúcich ako nádorové supresory. Expresia uvedených génov hrá kľúčovú úlohu v regulácii bunkového cyklu a apoptózy. Nemutovaný gén p53 (wild-type) je akti-

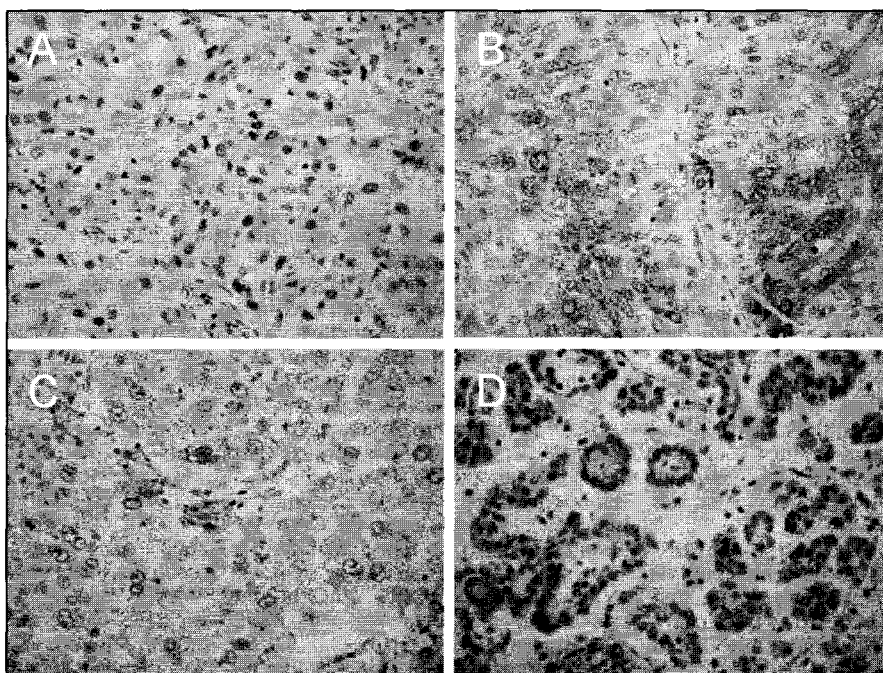
vovaný poškodením DNA v súvislosti s chemoterapiou a rádioterapiou. Následkom aktivácie daného génu dochádza k zastaveniu bunecného cyklu vo fáze G₁ a k indukcií apoptózy. Štúdie in vitro potvrdili, že väčšina protinádorových liečiv je účinnejšia pri prítomnosti wild-type p53 než pri prítomnosti mutantných foriem. Fujivara et al. (11) zistili, že adenovírusový transfer génu p53 do bunkových línií odvodených od NSCLC výrazne zvýšil ich senzitivitu na DDP. In vitro štúdie potvrdili, že znalosť funkčného stavu p53 je významným znakom chemosenzitivity. Doposiaľ bola publikovaná len jediná štúdia zaoberajúca sa alteráciou génu p53

Tabuľka 1: Signifikantne významné hodnoty (p) Spearmanova korelačného koeficientu (r) pre indikované dvojice parametrov; n-počet vyšetrení.

korelované znaky	n	r	p
p53 - MRP	65	0,34	0,006
p53 - procasp3	55	0,52	0,0001
p27-Tga	59	-0,29	0,027
p53 - ACT-D	29	0,47	0,010
p53 - DAU	40	0,35	0,026
p53 - VIN	35	0,34	0,044
MRP - TAX	48	-0,29	0,043



Obrázok 1. Ilustrácia pozitívneho vzťahu medzi expresiou p53/pcasp3 a p53/MRP (p-hladina významnosti t-testu). Negativita pcasp3 ($r=0,52$) i MRP ($r=0,34$) koreluje s nízkou expresiou p53 a naopak.



Obrázok 2. Ilustrácia imunohistochemickej exprese niektorých proteínov pri zväčšení 400x: nukleárna expresia MRP (A), cytoplazmatická expresia p53 (B), nukleárna expresia Topo 2α (C), cytoplazmatická expresia Pgp (D).

a chemosenzitivitou in vivo. Oshika et al. (26) vyšetrovali vzťah medzi overexpresiou (overexpresia = mutácia) p53 a chemosenzitivitou in vivo u pacientov s NSCLC v štádiu IIIa, ktorí sa podrobili neoadjuvantnej chemoterapii. Zistili signifikantný vzťah medzi overexpresiou p53 a rezistenciou na chemoterapiu.

Taktiež expresia inhibítorov cyklin-dependentných kináz p16 a p27 vo vzorkách pacientov s NSCLC sa ukázala byť významným pozitívnym prognostickým faktorom (22,23,24). Stratá ich funkcie je často pozorovaná u nádorov po neoadjuvantnej terapii (22,23). Niektoré štúdie uvádzajú, že expresia p16 a p27 koreluje u nádorov pľúc s chemorezistenciou in vitro. Volm et al. (22) naproti tomu zaznamenali signifikantne výraznejšiu klinickú odpoveď na DDP u pacientov s recidivujúcimi NSCLC, ktorých nádory exprimovali p27.

Cieľom predkladanej práce je overenie vzájomnej korelácie imunohistochemickej exprese parametrov asociovaných MDR s výsledkami testu in vitro chemosenzitivity u pacientov s NSCLC po neoadjuvantnej terapii. Uvedené výsledky môžu prispieť k posúdeniu prediktívnej hodnoty vyšetrenia imunohistochemickej exprese MRP, Pgp, p53, Tga, p27, pcasp 3 a TopoII vzhľadom k in vitro rezistencii na bežné protinádorové liečivá u pacientov s karcinómom po neoadjuvantnej terapii.

Materiál a metódy

Súbor pacientov

Do štúdie bol zaradený biopsický materiál od 64 pacientov s NSCLC po neoadjuvantnej chemoterapii na báze CDDP+TAX alebo CDDP+NVB. Vek pacientov sa pohyboval od 40-60 rokov, z toho bolo 51 mužov a 13 žien, histopatologická diagnóza zahŕňovala adenokarcinómy (n=21) spinocelulárne karcinómy (n=37) a veľkobunkové karcinómy (n=6).

Imunohistochemická detekcia proteínov MDR

Rutinne pripravené vzorky v parafrínových blokoch boli narezané a prenesené na silanizované sklá, následne odparafrínované a rehydratované. Odmaskovanie antigénnych epitopov vzoriek bolo docielené v mikrovlnom generátore o výkone 800 W, v 0,01M citrátovom pufrí po dobu 15min. Po následnom premytí v destilovanej vode bola aktivita endogénnej peroxidázy odstránená v 10% roztoku H₂O₂ po dobu 3x10 minút. Po následnom premytí destilovanou vodou boli nešpecifické väzbové miesta zablokované prevrstvením vzoriek 5% odčúneným mliekom v TRIS pufrí pH 7,6. Po odstránení prebytočného mliečného pufru z povrchu rezu, boli na jednotlivé rezy následne aplikované primárne protilátky. Protilátky boli riedené v izotonickom TRIS pufrí (pH 7,6) následovne: monoklonálna myšia protilátka anti-p53 typ DO-1 1:1000 (MOÚ Brno), monoklonálna myšia protilátka anti-p53 typ FP 3111 1:500 (MOÚ Brno), monoklonálna myšia anti-Pgp klon UIC2 1:100 (Dako), monoklonálna myšia anti-Topo IIα klon SWT3D1 1:100 (Dako), monoklonálna myšia anti-p27 klon SX5368 1:100 (Dako), polyklonálna králičia anti-procaspáza3 klon NCL-CPP32p 1:100 (Dako), myšia anti-kaniová transglutamináza klon CUB7402 1:50 (Dako) a polyklonálna králičia anti-MRP klon MRPm5 1:20 (Alexis). Vzorky boli následne inkubované pri teplote 4°C po dobu 12 hodín. Po premytí (3x5 min) v izotonickom TRIS pufrí (pH 7,6) bol následne aplikovaný farbiaci systém anti-myšia/králičia EnVision (Dako) na dobu 30 minút. Po premytí vzoriek v izotonickom TRIS pufrí (pH 7,6) bola vizualizovaná aktivita peroxidázy pomocou 0,01M diaminobenzidínu v TRIS pufrí s 0,01% H₂O₂. Rezy boli dofarbené hematoxylinom, dehydratované, prejasnené a zamontované do kanadského balzámu. Pozitivita bola hodnotená v 10 zorných poliach pri 400-násobnom zväčšení a vyjadrená percentuálne.

Stanovenie in vitro citlivosti pomocou MTT testu

Na stanovenie in vitro citlivosti primárných nádorových buniek NSCLC na protinádorové liečivá bol použitý MTT test (29). Jeho princípom je premena MTT (3,4,5-dimethythiazol-2yl-2,5 difenyl-tetrazolium bromid) vitálnymi bunkami na nerozpustný formazán. Po rozpustení kryštálov formazánu bola stanovená absorbancia v pomocou ELIS A readeru pri 540 nm. Následne sme pre jednotlivé cytostatiká počítačovo vyhodnotili letálne dávky zabíjajúce 50% buniek (TCS_{50}).

Štatistická analýza

Výsledky imunohistochemickej detekcie boli spracované a porovnané medzi sebou a taktiež s výsledkami testu in vitro citlivosti na cytostatiká v programe GraphPad Prism pomocou Spearmanovho korelačného koeficientu, Mann-Whitneyho testu a t-testu.

Výsledky

Porovnali sme imunohistochemickú expresiu sledovaných znakov navzájom a s výsledkami MTT testu. Signifikantné korelácie sú zachytené v tabuľke 1. Zo všetkých sledovaných znakov boli zistené korelácie len medzi expresiou p53/MRP ($r=0,33$, $p=0,006$), p53/pasp3 ($r=0,52$, $p<0,0001$), p27/Tga ($r=-0,29$, $p=0,027$). Expresia p53 korelovala s in vitro rezistenciou na ACT-D ($r=0,47$, $p=0,01$), DAU ($r=0,35$, $p=0,026$) a VIN ($r=0,34$, $p=0,044$). Zároveň bola zistená korelácia medzi expresiou MRP a citlivosťou na TAX ($r=-0,29$, $p=0,043$). Súborný výkazujúce štatisticky významné korelácie boli rozdelené podľa jedného z parametrov a ich mediány/priemery porovnané Mann-Whitney testom/t-testom. V tejto analýze sme potvrdili významný vzťah iba medzi p53/pasp3 (MW $p<0,0001$, t-test $p<0,0001$) a p53/MRP (MW $p=0,015$, t-test $p=0,026$). Na obrázku 1 sú zobrazené priemerné hodnoty p53 po rozdelení podľa pozitivity/negativity prokaspázy3 alebo MRP. Obrázok 2 zobrazuje typickú imunohistochemickú expresiu vybraných znakov.

Diskusia

V našej práci sme dospeli k niekoľkým záverom. Zistili sme, že expresia Pgp nekorelovala s in vitro rezistenciou na žiadne z testovaných cytostatík. Uvedené zistenie je v súlade s početnými štúdiami, ktoré uvádzajú, že expresia Pgp a hladiny mdr1 mRNA nekoreluje s in vitro rezistenciou u NSCLC (1). Jedným z možných vysvetlení je skutočnosť, že až 40 % nádorov exprimujúcich Pgp je citlivých na DNR (30). V podstate to znamená, že nie je možné z exprese Pgp usudzovať na jeho funkčnú aktivitu. Táto skutočnosť pravdepodobne zodpovedá za množstvo sklamaní, ktoré nám priniesla aplikácia blokátorov Pgp (cyklosporín A, verapamil, atď.) s Pgp transportovanými cytostatikami v klinickej praxi.

Ďalším významným zistením bol signifikantný vzťah medzi expresiou MRP a citlivosťou na TAX. Súčasný štúdie potvrdzujú, že taxol nie je transportovaný MRP (3). V našej štúdii bol zároveň potvrdený vzťah medzi expresiou p53 a MRP. Dokázali sme, že mutantné formy p53 spôsobujú zvýšenú syntézu MRP, čo je pravdepodobne jeden z mechanizmov, ktorým nefunkčnosť proteínu p53 prispieva k vzniku MDR. Expresia p53 taktiež korelovala s in vitro rezistenciou na ACT-D, DAU a VIN. Recentné in vitro štúdie ukazujú, že väčšina protinádorových liečiv je účinnejšia v prítomnosti wild type p53, v porovnaní s mutantnou formou (28). Jedinou výnimkou v tomto smere je taxol (3). Domnievame sa, že táto skutočnosť súvisí s väzbou medzi expresiou mutovanej formy p53 a MRP. Ako už bolo uvedené, MRP nie je spojený s transportom TAX, ale celej škály iných cytostatík.

Na potvrdenie prognostického významu p53 sú potrebné prospektívne štúdie na veľkej skupine prípadov so sledovaním klinickej odpovede na chemoterapiu. Paradoxné je naše zistenie, že expresia p53 súvisí s expresiou prokaspázy 3. Uvedený fenomén sa dá pravdepodobne vysvetliť tým, že akumulácia prokaspázy ešte nemusí znamenať apoptózu. Pre spresnenie daného vzťahu je nutné vyšetriť p53-independentné apoptotické mechanizmy spolu s ostatnými kaspázami aktivovanými kaspázou 3.

Podakovanie

Práca bola čiastočne podporená grantami IGA MZČR 4132-5, MSMVTJ14/981511 00001, VŠ 96154 a Nadáciou pre výskum rakoviny v Olomouci.

Literatúra:

1. Crino L, Corgoña E, Porrozi S, Palladino MA, Darwish S, Ninotti V: A better therapeutic profile for the combination of mitomycin C, ifosfamide and cisplatin in advanced non-small-cell lung cancer: a useful dose schedule modification. *Ann Oncol* 1997; 8:709-711.
2. Kubota K, Furuse K, Kawahara M, Kodama N, Ogawara M, Takada M: Cisplatin-based combination chemotherapy for elderly patients with non-small-cell lung cancer. *Cancer Chemother Pharmacol* 1997; 40:469-474.
3. Berger W, Elbling L, Hauptmann E, Micksche M: Expression of the multidrug resistance-associated protein (MRP) and chemoresistance of human non-small-cell lung cancer cells. *Int J Cancer* 1997; 73:84-93.
4. Ohmori T, Nishio K, Ohta S, Kubota N, Adachi M, Komiya K, Saio N: Ouabain-resistant non-small-cell lung cancer cell line shows collateral sensitivity to cis-diamminedichloroplatinum (U) (CDDP). *Int J Cancer* 1994; 57:111-116.
5. Morikage T, Ohmori T, Nishio K, Fujiwara Y, Takeda Y, Saio N: Modulation of cisplatin sensitivity and accumulation by amphotericin B in cisplatin-resistant human lung cancer cell lines. *Cancer Res* 1993; 53:3302-3307.
6. Tomonari A, Nishio K, Kurokawa H, Fukumoto H, Fukuoaka K, Iwamoto Y: Proximal 5'-flanking sequence of the human gamma-glutamylcysteine synthetase heavy subunit gene is involved in cisplatin-induced transcriptional up-regulation in a lung cancer cell line SBC3. *Biochem Biophys Res Commun* 1997; 236:522-527.
7. Shen H, Kauvar L, Tew KD: Importance of glutathione associated enzymes in drug response. *Oncology Res* 1997; 9:295-302.
8. Yokomizo A, Kohno K, Wada M, Ono M, Morrow CS, Cowan KH, Kuwano M: Markedly increased expression of glutathione S-transferase p mRNA in human cancer cell lines resistant to buthionine sulfoximine, an inhibitor of cellular glutathione synthesis. *J Biol Chem* 1995; 270:19451-19457.
9. Nakagawa K, Yokota J, Wada M, Sasaki Y, Fujiwara Y: Levels of glutathione S transferase mRNA in human cancer cell lines correlate with the resistance to cisplatin and carboplatin. *Jpn J Cancer Res* 1988; 79:301-304.
10. Kelly SL, Basu A, Teiger BA, Hacker MP, Hamer DH, Lazo JS: Overexpression of metallothionein confers resistance to anticancer drugs. *Science* 1988; 241:1813-1815.
11. Fujiwara Y, Sugimoto Y, Kasahara H, Bungo M, Yamakido M, Tew KD, Saio N: Determinants of drug response in a cisplatin-resistant human lung cancer cell line. *Jpn J Cancer Res* 1990; 81:527-535.
12. Bruhn SL, Pii PM, Essigmann JM, Housman DE, Lippard SJ: Isolation and characterization of human cDNA clones encoding a high mobility group box protein that recognizes structural distortions to DNA caused by binding of the anticancer agent cisplatin. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1992; 89:2307-2311.
13. Huang JC, Zambie DB, Reardon JT, Lippard SJ, Sancar A: HMG-domain proteins specifically inhibit the repair of the major DNA adduct of the anticancer drug cisplatin by human excision nuclease. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1994; 91:10394-10398.
14. Ohga T, Koike K, Ono M, Makino Y, Itagaki Y, Tanimoto M: Role of the human Y box-binding protein YB-1 in cellular sensitivity to the DNA-damaging agents cisplatin, mitomycin C, and ultraviolet light. *Cancer Res* 1996; 56:4224-4228.
15. Kasahara K, Fujiwara Y, Sugimoto Y, Nishio K, Tamura T, Matsuda T, Saio N: Determinants of response to the DNA topoisomerase II inhibitors doxorubicin and etoposide in human lung cancer cell lines. *J Natl Cancer Inst* 1992; 84:113-118.
16. Wessel I, Jensen PB, Falck J, Mirski SE, Cole SP, Sehested M: Loss of amino acids 1490Lys-Ser-Lys 1492 in the COOH-terminal region of topoisomerase IIa in a human small cell lung cancer cells selected for resistance to etoposide results in an extranuclear enzyme localization. *Cancer Res* 1997; 57:4451-4454.
17. Kanzawa F, Nishio K, Kubota N, Saio N: Antitumor activities of a new indolocarbazole substance, NB-506, and establishment of NB-506-resistant cell lines. *SBC-3/NB. Cancer Res* 1995; 55:2806-2813.
18. Akerley W, Glantz M, Choy H, Rege V, Sambandam S, Joseph P: Phase I of weekly paclitaxel in advanced lung cancer. *J Clin Oncol* 1998; 16:153-158.
19. Kirkbride P, Gelmon K L, Eisenhaur E, Fisher B, Dulude H: A phase I/II study of paclitaxel (TAXOL) and concurrent radiotherapy in advanced non-small cell lung cancer. *Int J Radiat Oncol Phys* 1997; 39:1107-1111.
20. Ohta S, Nishio K, Kubo S, Nishio M, Ohmori T, Takahashi T, Saio N: Characterisation of a vindesine-resistant human small-cell lung cancer cell line. *Br J Cancer* 1993; 68:74-79.
21. Ginopoulos P, Spyropoulos K, Kardamakis D, Dougenis D, Onyeadum A, Gogos CH, et al.: Advanced non-small cell lung cancer chemotherapy: a randomized trial of two active regimens (MVP and PE). *Cancer Lett* 1997; 119:241-247.
22. Volm M, Rittgen W, Drings P: Prognostic value of ERBB-1, VEGF, cyclin A, FOS, JUN and MYC in patients with squamous cell lung carcinomas. *Br J Cancer* 1998; 77:663-669.
23. Marchetti A, Dogliani C, Barbareschi M, Buttitta F, Pellergini S, Gaeta P: Cyclin D1 and retinoblastoma susceptibility gene alterations in non-small cell lung cancer. *Int J Cancer* 1998; 75:187-192.
24. Hama S, Heike Y, Naruse I, Takahashi M, Yoshioka H, Arita K: Adenovirus-mediated p16 gene transfer prevents drug-induced cell death through G1 arrest in human glioma cells. *Int J Cancer* 1998; 77:47-54.
25. Fukuoaka K, Adachi J, Nishio K, Arioka H, Kurokawa H, Fukumoto H: p16^{INK4} expression is associated with the increased sensitivity of human non-small cell lung cancer cells to DNA topoisomerase I inhibitors. *Jpn J Cancer Res* 1997; 88:1009-1016.
26. Oshika Y, Nakamura M, Tokunaga T, Fukushima Y, Abe Y, Ozeki Y, Yamazaki H, Tamaoki N, Ueyama Y: Multidrug resistance-associated protein and mutant p53 protein expression in non-small cell lung cancer. *Mod Pathol* 1998; 11(11): 1059-63.
27. Savas B, Arslan G, Gelen T, Karpuzoglu G, Ozkaynak C: Multidrug resistant malignant melanoma with intracranial metastasis responding to immunotherapy. *Anticancer Res* 1999 Sep-Oct; 19(5C):4413-20.
28. I. Komiya T, Hirashima T, Kawase I: Clinical significance of p53 in non-small-cell lung cancer. *Oncol Rep* 1999 6(1):19-28.
29. Hajdúch M, Mihal V, Minarik J, Faber E, Safarova M, Weigl E, Antalek P.: Decreased in vitro chemosensitivity of tumour cells in patients suffering from malignant diseases with poor prognosis. *Cytotechnology* 1996; 19(3):243-5.
30. Marie JP, Zittoun R, Sikik BI.: Multidrug resistance (mdr1) gene expression in adult acute leukemias: correlations with treatment outcome and in vitro drug sensitivity. *Blood* 1991 Aug 1; 78(3):586-92.

CHEMOTERAPIE OVARIÁLNÍHO KARCINOMU S OHLEDEM NA STANOVENÍ IN VITRO CHEMOSENSITIVITY - VYBRANÉ KAZUISTIKY

CHEMOTHERAPY OF OVARIAN CANCER WITH RESPECT TO RESULTS OF IN VITRO CHEMOSENSITIVITY ASSAY - SELECTED CASE REPORTS

CWIERTKA K.^{1*}, HAJDÚCH M.², PILKA R.³, NOSKOVÁ V.², ŠVĚBIŠOVÁ H.¹, LUDKOVÁ A.², MACHÁČEK J.¹, KUDELA M.³, MINÁRIK J.¹, MIHÁL V.⁴

¹ ONKOLOGICKÁ KLINIKA LF UP A FN, OLOMOUC

² LABORATOR EXPERIMENTÁLNÍ MEDICÍNY, DĚTSKÁ KLINIKA LF UP A FN, OLOMOUC

³ GYNEKOLOGICKÁ KLINIKA LF UP A FN, OLOMOUC

⁴ DĚTSKÁ KLINIKA LF UP A FN, OLOMOUC

* Korespondující autor: Onkologická klinika FN Olomouc, I.P. Pavlova 6.775 20 Olomouc

Souhrn: Pokročilé nebo recidivující ovariální karcinomy jsou i v dnešní době velkým terapeutickým problémem. Na příkladu kazuistik 3 nemocných, u kterých bylo provedeno stanovení rezistence na cytostatika in vitro, se pokoušíme o vysvětlení průběhu nemoci. 1. pacientka s ovariálním karcinomem ve III klinickém stadiu, po suboptimálním debulkingu, překvapuje velmi rychlou odpovědí na kombinaci cyklofosfamid, doxorubicin, cisplatina, kdy po 3 cyklech je dosaženo histologické kompletní remise. U 2. pacientky ve III. klinickém stadiu dochází k progresi v průběhu intenzifikace chemoterapie (karboplatina v monoterapii nahrazena kombinací karboplatina + paklitaxel). 3. pacientka léčena pro recidivu ovariálního karcinomu, u které selhává 2. a 3. řada chemoterapie má 4. řadu provedenou na základě výsledku testu rezistence a dochází u ní k posunu směrem k rezistentnější formě již po 1. cyklu chemoterapie. Na základě dosud publikovaných prací i na základě našich zkušeností lze předpokládat pozitivní přínos výběru cytostatika na základě výsledku testu in vitro. Pro zavedení do běžné klinické praxe je nutné ještě optimalizovat interpretaci výsledků in vitro testů a ověřit korelaci s klinickým výstupem v randomizovaných klinických studiích.

Klíčová slova: karcinom ovaria, Protinádorová chemoterapie, rezistence na cytostatika, testování chemorezistence in vitro

Summary: Advanced ovarian cancer is a serious therapeutical problem. This paper shows on example of three patients the importance of in vitro drug resistance assay for explanation of disease outcome. The first patient was diagnosed in stage III. After suboptimal surgery she was treated with combination of cyclophosphamide, doxorubicin and cisplatin with very good response (in vitro drug sensitive). The second patient also in stage III progressed rapidly on both carboplatin alone or in combination with paclitaxel (in vitro drug resistant). The third patient was suffering from relaps of ovarian cancer. She failed on 2nd and 3rd line of chemotherapy, so she was treated according to results of in vitro chemosensitivity assay with transient response. Patient outcomes are discussed in correlation with in vitro drug sensitivity assay.

Key words: ovarian cancer, anti-cancer chemotherapy, multidrug resistance, in vitro chemoresistance assay

Použité zkratky: MTT test = MTTassay -, IDS - interval debulking surgery, AUC - area under curve, TCS₅₀ - 50% tumor cell survival, CAP režim - kombinace cyklofosfamid, doxorubicinu a Cisplatinu

Úvod

Karcinomy vaječníků patří mezi prognosticky nejméně příznivé z gynekologických zhoubných nádorů. Incidence v ČR v roce 1996 byla 22,3/100 000 (1181 nově diagnostikovaných nádorů) a mortalita 12,4/100 000 (656 úmrtí). Většina žen je diagnostikována s pokročilým nádorem, tj. ve III. nebo IV. stadiu, kdy se nádor šíří po peritoneu mimo oblast pánve nebo jsou již přítomny vzdálené metastázy (1). Prognóza dlouhodobého přežití v takové situaci je špatná. Základním terapeutickým zásahem je chirurgické odstranění makroskopického tumoru s následnou chemoterapií. Tento přístup u mnoha žen není technicky proveditelný pro pokročilost nádoru v oblasti pánve. Optimálně provedený debulking nebo množství nádorové tkáně ponechané in situ zůstává vedle stadia onemocnění jedním z nejdůležitějších faktorů, který ovlivňuje prognózu nemocných. Chemoterapie ovariálního karcinomu prodělala vývoj od monochemoterapie cyklofosfamidem, přes uplatnění Cisplatinu v kombinaci s cyklofosfamidem až po dnešní doporučený standard pro léčbu I. řady - kombinaci paklitaxelu s cisplatinou ev. karboplatinou. Přes významné zlepšení vyhlídek nemocných s pokročilým ovariálním karcinomem v důsledku zavedení nových terapií prognóza dlouhodobého přežití zůstává spíše špatná a u vysokého procenta žen s pokročilým nádorem přes počáteční dobrou odezvu na cytostatickou léčbu dochází k recidivám. S vývojem v oblasti molekulární biologie a s přibývajícím poznatkami na poli lékové rezistence v posledním desetiletí opět zesilují snahy o nalezení vhodné metody pro testování rezistence na cytostatika ve snaze přizpůsobit podávanou chemoterapii výsledku testu in vitro. Následující kazuistiky jsou uvedeny s následnou diskusí nad výsledky testu rezistence in vitro prováděným MTT testem. (2,3)

1. kazuistika

49letá žena s dvouměsíční anamnézou dysurických potíží, s postupným zvětšováním objemu břicha, s následnou anorexií a oligurií, u které byl diagnostikován suspekt nález na vaječnících, byla 15.3.1999 provedena na gynekologii laparotomie. V operačním nálezu dominuje 6 litrů ascitické tekutiny a tumor vycházející z levého ovaria, na který nasedají střevní klíčky.

Omentum, játra i uzliny jsou bez známek nádoru, makroskopické nádorové změny na serose tenkého střeva. Uzavřeno jako stadium in B. Provedena subtotální resekce levých adnex, pro široké nasedání nádorových mas na stěnu pánevní a pánevní cévy nebylo možné dokončit radikální výkon a část nádoru velikosti 10x5x3 cm byla ponechána in situ. Histologický nález stanoví diagnózu níže diferencovaného serosního papilokarcinomu. Pacientka byla indikována k chemoterapii a vzhledem k souhlasu s účastí ve studii IDS (interval debulking surgery) byl u ní zahájen režim CAP (cyklofosfamid 600 mg/m², doxorubicin 60 mg/m² a cis-platina 75 mg/m²). Podány celkem 3 cykly chemoterapie od 1.4.1999 do 19.5.1999. V průběhu chemoterapie dochází k poklesu nádorového markeru CA 125 ze 154,5 U/ml na 7,3 U/ml (Graf 1). 30.6.1999 provedena abdominální hysterektomie, oboustranná adnexotomie, resekce omenta, appendektomie, pravostranná lymfadenektomie. Peroperační nález ukazuje vlevo v páni zbytek tumoru s nekrózami, adhezií k rektosigmoidu, jinak v dutině břišní bez známek nádoru. Proveden výplach dutiny břišní - tekutina odeslána rovněž na cytologické vyšetření. Histologický nález z tumoru v oblasti levých adnex - bez nádorových změn, vzorek z peritonea - nekróza, lipogranulomatózní reakce, bez nádorových změn, uzliny - sinusová histiocytóza, omentum normální nález, bez nádorových změn, pravé ovarium - endometroidní cysta, bez nádorových změn, tuby oboustranně bez nádorových změn, děloha se subserózním leiomyomem, bez nádorových změn, laváž dutiny břišní - cytologicky negativní, čípek děložní s mírným chronickým zánětem a ovula Nabothi. Po 3 cyklech chemoterapie lze hodnotit jako mikroskopickou kompletní remisi. Pooperačně dle protokolu IDS podány 3 cykly chemoterapie paklitaxel (175 mg/m²) a karboplatina (AUC = 5,5). Léčba ukončena v září 1999. Následně je pacientka dispenzarizovaná - poslední kontrola v červenci 2000 - gynekologický nález bez známek recidivy, CA 125,8 U/ml uzavřeno jako trvající kompletní remise.

Průběh léčby na první pohled není překvapivý a neobvyklý. Zajímavé je však rychlost a úplnost odpovědi (pokles nádorových markerů do normálních hodnot po 2. cyklu chemoterapie a mikroskopická kompletní remise po 3 cyklech předoperační

chemoterapie CAP). Když se podíváme na výsledek MTT testu, který byl proveden na vzorku nádorových buněk z primární operace před zahájením léčby cytostatiky, vidíme zde možnost velmi dobré odpovědi na cisplatinu (TCS_{50} : 0,755 mg/ml) a hraniční pro doxorubicin (TCS_{50} : 1,0149 mg/ml) (viz tab. 1).

Tabulka 1. Výsledek testu rezistence na cytostatika - 1. kasuistika (odběr materiálu 15.3.1999)

Cytostatikum ⁺	TCS_{50} (μg/ml)	Cytostatikum ⁺	TCS_{50} (μg/ml)
cisplatina	0,75	vinorelbin	13,21
paklitaxel	17,64	etoposid	nad 50,00
doxorubicin	1,01	daunorubicin	0,01
karboplatina	1,70	vincristin	12,50
gemcitabin	nad 300,00	docetaxel	nad 50,00
topotecan	1,46	aktinomycin D	0,21
mitoxantron	nad 2,00	bleomycin	nad 50,00

+ in vitro rezistentní cytostatika jsou tučně

2. kazuistika

69letá žena přijata 8.6.1998 na interní kliniku pro pocit plného břicha, zvýšené teploty dosahující 38 °C, nechutenství. Klinickým vyšetřením zjištěna rezistence na rozhraní epigastria a mesogastria velikosti 5x10 cm. Ultrazvukové vyšetření břicha prokazuje ascites. CT dutiny břišní potvrzuje pouze ascites, nevylučuje tumor v oblasti pánve. 10.7.1998 provedena laparotomie s nálezem 4 litrů ascitické tekutiny, karcinomatózu peritonea, omentum přeměněno v plastron velikosti 15x20 cm o tloušťce 2-3 cm. V malé pánvi přítomen tumor, do kterého zavazaty tuby s dělohou a sigmoidem, vytvářející obraz „frozen pelvis“. Stav uzavřen jako inoperabilní. Odebrána biopsie z omenta. Histologický nálezn svědčí pro nízké diferencovaný adenokarcinom s hlenotvorbou a fokální dladicobuněčnou diferenciací. Primární ložisko je nejspíše ovarium. Rentgen hrudníku a ultrazvuk jater bez známek metastáz. V nádorových markerech dominuje hodnota CA 125 -16960 U/ml. Vzhledem k celkovému stavu nemocné zahájena chemoterapie karboplatinou v monoterapii v dávce 350 mg/m², v intervalu 21 dní. Po 3 cyklech dochází po přechodném vzestupu CA 125 (32 170 U/ml), který mohl být způsoben rozpadem tumoru a následně k poklesu na 6 430 U/ml (Graf 2). Dle ultrazvuku břicha došlo ke zmenšení tumoru v epigastriu. Vzhledem ke zlepšení celkového stavu rozhodnuto o změně chemoterapie na kombinaci paklitaxel (350 mg/m²)+karboplatina (AUC = 5,5) v 4-týdenním intervalu. 2 cykly chemoterapie jsou provázeny ještě poklesem markerů až na hodnotu 847 U/ml a zlepšováním klinického nálezu, nicméně po 3. cyklu chemoterapie dochází opět k vzestupu CA 125 na hodnoty vyšší než 5000 U/ml, ultrazvukové vyšetření břicha 15.1.1999 je bez nálezu tumoru. Vzhledem k vzestupu markerů podána 1 série chemoterapie karboplatinou v monoterapii, dochází k dalšímu vzestupu markerů na 20 160 U/ml. Vzhledem k příznivému klinickému nálezu rozhodnuto o laparotomické revizi, která provedena 3.2.1999 s nálezem ascitu, tumorosních mas v bři-

še, znesnadňujících přístup k játrům, rozsev po peritoneu, přístup do pánve znemožněn nádorovými hmotami. Operace ukončena jako explorativní. Po operaci podány ještě 2 cykly chemoterapie karboplatinou v monoterapii, nicméně pro progresi v markerech (CA 125 až na 162500 U/ml) a klinickou progresi dále doporučena symptomatická terapie. 16.6.1999 nemocná umírá v důsledku progresi onemocnění. V tomto případě nás překvapily signály progresi v průběhu intenzifikované chemoterapie v situaci, kdy klinický nálezn a ultrazvukové vyšetření spíše vypovídá o opaku. Při pohledu na vyšetření rezistence na cytostatika vidíme riziko rezistence na cisplatinu a paklitaxel (tab 2). Odpovídalo by to i původní dobré odpovědi na monoterapii platinovým derivátem a posléze i na kombinaci s paklitaxelem. Nicméně o dalším průběhu se můžeme domnívat, že byl ovlivněn progresí vyselektovaného rezistentního nádorového klonu. Rezistence na karboplatinu bohužel nebyla testována s ohledem na malé množství dodaného materiálu.

3. kazuistika

51 letá žena sledovaná 2 roky pro myomatózní dělohu, pro progresi nálezu indikovaná abdominální hysterektomie. 17.3.1998 provedena laparotomie s nálezem myomatózní dělohy, vlevo pevně adhezuje ovariální tumor cystického charakteru do Douglasu a k zadnímu listu, vpravo ovarium normální velikosti pevně adhezuje k zadnímu listu, kde suspektul infiltrace, ascites nepřítomen, nástěnné peritoneum, uzliny a játra bez známek metastatického postižení. Provedena abdominální hysterektomie s oboustrannou adnexotomií. Makroskopicky se jeví výkon jako radikální. Histologický nálezn na obou ovariích ve smyslu středně až nízké diferencovaného cystadenopapilokarcinomu převážně serosního původu, místy s mucinosní diferenciací, levá tuba s ložiskem ovariálního karcinomu, děloha s metastázou ovariálního karcinomu v myometriu. U nemocné aplikováno v období od 25.3. do 15.7.1998 6 cyklů adjuvantní chemoterapie paklitaxel (135 mg/m²) a cisplatina (75 mg/m²). Před zahájením chemoterapie hodnoty markerů CA 125 58,7 U/ml klesají po 1. cyklu do normálních hodnot. Dále je pacientka dispenzarizovaná. 14. 4.1999 dochází ke zvýšení CA 125 na 41,7, začátkem července se objevují dechové potíže, bolesti na hrudníku vpravo a suchý kašel. Pro tyto potíže pacientka přešetřena. Snímek plic prokazuje hydrothorax vpravo a suspektul ložisko velikosti 5 cm. 6.8.1999 provedeno CT vyšetření břicha a pánve s nálezem recidivy v oblasti poševního pahýlu, dále zvětšené pánevní uzliny, suspektul hmoty v oblasti omenta, ascites. Hodnota CA 125 stoupla na 593 U/ml (Graf 3). U nemocné provedena evakuace 1300 ml tekutiny z dutiny hrudní, tato vyšetřena cytologicky s nálezem maligních buněk velmi pravděpodobně serosního papilokarcinomu. Dále zahájena paliativní chemoterapie karboplatinou v monoterapii (AUC = 7) v 28 denním intervalu od 12.8.1999 do 6.1.2000. Po přechodném poklesu hodnot CA 125, vymizení nálezu na snímku plic a vymizení subjektivních potíží, dochází opět k progresi. Proto chemoterapie změněna na monoterapii topotecanem (2 mg/m²) v 5-denním podání. Léčba provázena výraznou hematologickou toxicitou. Po 2 cyklech pro rychlý růst rezistence v malé pánvi, kdy klinicky hmatná rezistence nad

Tabulka 2. Výsledek testu rezistence na cytostatika - 2. kasuistika

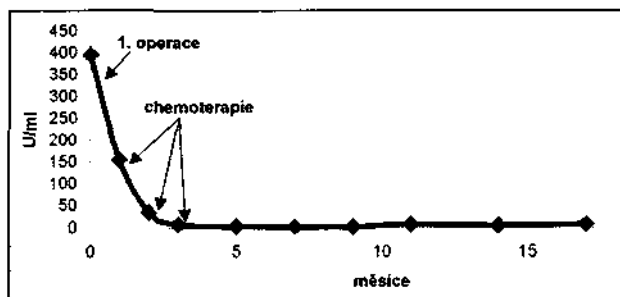
Cytostatikum ⁺	TCS_{50} (μg/ml)
1. vyšetření (odběr materiálu 10.7.1998)	
cisplatina	9,38
paklitaxel	10,46
daunorubicin	nad 2,00
2. vyšetření (odběr materiálu 3.2.1999)	
cisplatina	4,18
paklitaxel	10,87
daunorubicin	nad 2,00
etoposid	17,86
vincristin	0,34

+ in vitro rezistentní cytostatika jsou tučně

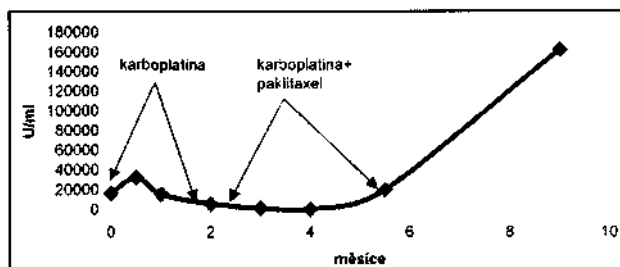
Tabulka 3. Výsledek testu rezistence na cytostatika - 3. kasuistika

Cytostatikum ⁺	TCS_{50} (μg/ml)	Cytostatikum ⁺	TCS_{50} (μg/ml)
1. vyšetření (odběr materiálu 28.3.2000)			
cisplatina	42,56	vinorelbin	nad 50,00
paklitaxel	4,01	etoposid	nad 12,50
doxorubicin	nad 2,00	daunorubicin	0,47
karboplatina	nad 100,00	vincristin	nad 50,00
gemcitabin	4,95	bleomycin	nad 50,00
topotecan	2,72		
2. vyšetření (odběr materiálu 10.5.2000)			
cisplatina	32,05	gemcitabin	23,99
paklitaxel	12,91	topotecan	1,68
doxorubicin	nad 2,00	vinorelbin	nad 50,00
karboplatina	27,94	etoposid	nad 50,00

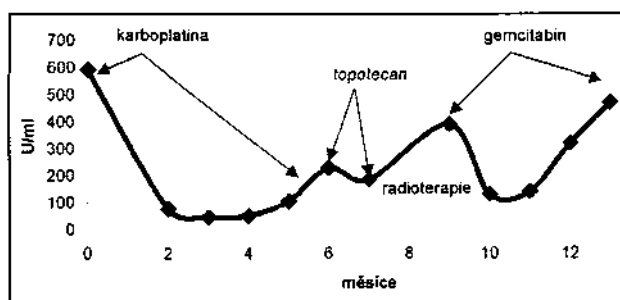
+ in vitro rezistentní cytostatika jsou tučně



Obrázek 1: Průběh hodnot markeru CA 125 od začátku terapie – 1. kazuistika



Obrázek 2: Průběh hodnot markeru CA 125 od začátku terapie – 2. kazuistika



Obrázek 3: Průběh hodnot markeru CA 125 od začátku terapie relapsu onemocnění – 3. kazuistika

symfysou velikosti 13x10 cm indikuje paliativní radioterapii. Od 27.3. do 28.4.2000 ozařena rezistence v pánvi do 46 Gy. Současně se objevuje výpotek v pohrudniční dutině, pro který opakovaně evakuace. Od 4.5. 2000 zahájena již 4. řada chemoterapie gemcitabinem v monoterapii (1200 mg/m²). Léčba je komplikovaná značnou dřeňovou toxicitou (leukopenie 3. stupně a trombocytopenie 4. stupně dle WHO), pro kterou nelze dodržet dávkovací schéma. Marker CA 125 opět klesá z 391 U/ml v květnu 2000 na 129 U/ml v červnu 2000. Nicméně 4.7.2000 opět zjištěna progres v markerech, která pokračuje. U nemocné dále doporučena symptomatická terapie. K výběru chemoterapie 4. řady přispěl výsledek testu rezistence z buněk v pleurálním výpotku viz tab 3. Nicméně opakované vyšetření rezistence na cytostatika po prvním cyklu chemoterapie s gemcitabinem ukazuje posun TCS₅₀ k vyšším hodnotám a navíc 45% buněk přežívá i nejvyšší testovanou koncentraci cytostatika.

Diskuse

V současné době jsou režimy paklitaxel s cisplatinou a paklitaxel s karboplatinou považovány na základě publikovaných velkých randomizovaných klinických studií za standardní léčbu 1. linie (studie G O G 111 kanadsko-evropská studie, dále G O G 158). Studie G O G 111 srovnává režim cis-platina + cyklofosfamid s režimem cis-platina + paklitaxel. Tato studie prokazuje zlepšení léčebných výsledků v případě použití režimu s paklitaxelem ve smyslu odpovědi (CR+PR 73% vs. 60%) i ve smyslu přežívání (medián 38 vs 24 měsíců) (4). Kanadsko-evropská studie tuto skutečnost potvrzuje (CR+PR 77% vs. 66%, medián přežívání 35 vs. 25 měsíců) (5). Studie G O G 158 srovnává kombinaci karboplatina + paklitaxel s kombinací cisplatina + paklitaxel. Tato studie prokazuje stejnou účinnost obou režimů a snížení gastrointesti-

nální a metabolické toxicity v rameni s karboplatinou (6). Na ASCO 2000 jsou prezentovány předběžné výsledky studie ICON 3 srovnávající následující režimy: karboplatina v monoterapii (AUC min. 6), paklitaxel (175 mg/m²) + karboplatina (AUC 6) a režim CAP (cyklofosfamid 500 mg/m², doxorubicin 50 mg/m² a cisplatina 50 mg/m²) a překvapivě neproказuje statisticky signifikantní rozdíly mezi jednotlivými režimy pokud se týče účinnosti, nicméně prokazuje tendenci směrem k lepším výsledkům u režimu s paklitaxelem u nemocných s větším reziduálním nádorem. (7)

Testování rezistence na cytostatika jako prostředek k predikci klinické odpovědi je již dlouhou dobu velmi diskutovaným problémem. V roce 1990 von Hoff prezentuje práci zabývající se hodnocením do té doby publikovaných v literatuře. Na vybraném souboru 54 in vitro/in-vivo korelačních studií ukazuje, že prediktivní hodnota pozitivní testu je 69% (správně pozitivní/(správně pozitivní+falešně pozitivní) a prediktivní hodnota negativní testu je 91 % (správně negativní/správně negativní+falešně negativní). Tyto výsledky jsou srovnatelné se spolehlivostí stanovení hormonálních receptorů nebo testování senzitivity na antibiotika. Podivuje se nad tím, že prediktivní využití stanovení rezistence in vitro není akceptováno v klinické praxi (8,9). Taylor se spolupracovníky prezentuje soubor 37 nemocných, u kterých byla vyšetřena rezistence na cytostatika MTT testem a kde byla dostupná klinická data. U 11 ze 17 pacientů v senzitivní skupině bylo dosaženo kompletní remise, zatímco v rezistentní skupině to byli 3 z 20 pacientů (10). Orr et al. srovnává režim cyklofosfamid + cisplatina vs. paklitaxel + cisplatina, kdy chemoterapie byla podána s ohledem na výsledek testu rezistence. Rozdíly v tříletém přežití v obou skupinách nebyly signifikantně rozdílné. Autoři rovněž rozebírají vliv na léčebné náklady, kdy testování rezistence se jeví jako prospěšné (11). Eltabbakh et al. posuzuje význam EDR (extreme drug resistance) testu pro predikci klinické odpovědi. V závěru uvádí, že rezistence na paklitaxel není spolehlivým ukazatelem rezistence na kombinovaný režim paklitaxel + cisplatina (12). Kurbacher et al. s použitím ATP-TCA (ATP tumor chemosensitivity assay) předpovídá, že s přidáním třetího cytostatika dle výsledku testu in vitro k režimu paklitaxel + cisplatina může se zvýšit procento odpovědi ze 70% na 88% a může zvýšit i nákladovou efektivitu léčby (13). Dottino et al. rovněž uvádí prospěšnost využití výsledků testování rezistence u recidivujících ovariálních karcinomů při rozhodování o terapii 2. a vyšší řady (14). Fruehauf et al. s využitím EDR testu zdůrazňuje prediktivní hodnotu rezistence na cisplatinu pro klinický výsledek léčby a zvažuje, zda v případě rezistence na cisplatinu by nebylo vhodnější použít kombinaci paklitaxelu s jiným cytostatikem ev. novou kombinaci dle výsledku testu rezistence a zda tato léčba nezlepší prognózu nemocných (15).

Naše dosavadní zkušenosti ukazují, že u nemocných, u nichž výsledek testu ukazuje rezistenci nádorové populace in vitro na všechna testovaná cytostatika, dochází k progresi nádorového onemocnění ještě v průběhu protinádorové chemoterapie nebo efekt chemoterapie je velmi krátkodobý a prakticky vždy končí onemocnění ve velmi krátké době úmrtí. Dále v případě terapie 2. a vyšší řady pokud přizpůsobíme cytostatický režim výsledkům testu rezistence, pak i v případě výrazně předléčených nemocných můžeme sledovat terapeutický efekt, a to i v případě použití ne zrovna typických cytostatik pro konkrétní diagnózu.

K diskusi na téma prediktivní váhy testování rezistence na cytostatika in vitro nutno přes všechny publikované výsledky a naše příznivé zkušenosti doporučit velmi opatrné převádění do klinické praxe, a to zvláště pro léčbu 1. řady. Nicméně v případě léčby 2. a vyšší řady stojí za zvážení, zda výběr kombinace cytostatik dle výsledku in vitro testu nebude znamenat lepší paliativní a ekonomický efekt případně snížení toxicity terapie.

Závěr

Prognóza pacientek s pokročilým nebo recidivujícím karcinomem ovaria přes určité zlepšení léčebných výsledků zavedením nových cytostatických kombinací zůstává i nadále spíše špatná. Uvedením kazuistik a diskusí s ohledem na predikci odpovědi na léčbu na základě testů rezistence in vitro jsme chtěli poukázat na určité možnosti zlepšení léčebných výsledků a ekonomizaci nákladů. Publikované výsledky i naše zkušenosti vyznívají povzbudivě. Je nutno však dořešit řadu problémů, z nichž jako nejdůležitější se nám jeví:

- získání dostatečného množství vitálních nádorových buněk pro testování nejen jednotlivých cytostatik, ale i cytostatických kombinací,
- optimalizovat interpretaci výsledků testu rezistence in vitro,
- ověření korelace predikce in vitro s klinickým výstupem v době postavené randomizované klinické studii.

Rovněž kombinace výsledků in vitro s dalšími ukazateli lékové rezistence jako je exprese glykoproteinu p170, exprese topoizomeráz, mutace tubulinů atd. může přinést další informace, které by mohly vést v budoucnu k individuální optimalizaci léčebných výsledků.

Poděkování:

Práce je podporována z vědecko výzkumného záměru MŠMT J 14/98: 151100001, grantem IGA MZ 4132-5 a Nadací pro výzkum rakoviny v Olomouci.

Literatura:

1. Novotvary 1996, <http://www.uzis.cz/cz/nor/novotv96.html>
2. Mihál, V., Hajdúch, M., Weigl, E., Videmanová, L., Šafářová, M.: Naše první zkušenosti s testováním citlivosti leukemických buněk na cytostatika. Čs. Pedi-at. 50, 1995, s. 195-200.
3. Hajdúch, M., Mihál, V., Minařík, J., Faber, E., Šafářová, M., Weigl, E., Antá-lek, P.: Decreased in vitro chemosensitivity of tumour cells in patients suffering from malignant diseases with a poor prognosis. Cytotechnology. 19, 1996, s. 243-245.
4. Mc Guire, W.P., Hoskins, W.J., Brady, M.F., Kučera, P.R., Partridge, E.E., Look, K.Y., Clarke-Pearson, D.L., Davidson, M.: Cyclophosphamide and cisplatin compared with paclitaxel and cisplatin in patients with stage III and stage IV ovarian cancer. N. Engl. J. Med. 334, 1996, s. 1-6.
5. Stuart, G., Bertelsen, K., Mangioni, C., Trope, C., James, K., Cassidy, J., Kaye, S., Timmers, P., Roy, J.A., Piccart, M.J.: Updated analysis shows a highly sig-nificant improved overall survival (OS) for cisplatin-paclitaxel as first line tre-atment of advanced ovarian cancer: Mature results of the EORTC-GCCG, NOCOVA, NCIC CTG and Scottish intergroup trial. Proc. Am. Soc. Clin. Oncol. 17, 1998, s. 361a. (abstrakt 1394).
6. Ozols, R.F., Bundy, B.N., Fowler, J., Clarke-Pearson, D., Mannel, R., Harten-bach, E.M., Baergen, R.: Randomized phase III study of cisplatin (CIS)/pacli-taxel (PAC) versus carboplatin (CARBO)/PAC in optimal stage III epithelial ovarian cancer (OC): A Gynecologic Oncology Group trial (GOG 158). Proc. Am. Soc. Clin. Oncol. 18, 1999, s. 356a. (abstrakt 1373).
7. Colombo, N., on behalf of the ICON collaborators: Randomized Trial of pacli-taxel (PTX) and carboplatin (CBDCA) versus a control arm of carboplatin or CAP (cyclophosphamide, doxorubicin & cisplatin): The Third International Col-laborative Ovarian Neoplasm Study (ICON 3). Proc. Am. Soc. Clin. Oncol. 19, 2000, s. 378a. (abstrakt 1500).
8. Von Hoff, D.D.: Hees not going to talk about in vitro predictive assays again, is he? Commentary. J. Natl. Cancer Inst. 82, 1990, s. 96-101.
9. Von Hoff, D.D., Sandbach, J.F., Clark, G.M.: Selection of cancer chemothera-py for a patient by an in vitro assay versus a clinician. J. Natl. Cancer Inst. 82, 1990, s. 110-116.
10. Taylor, C.G., Sargent, J.M., Elgie, A.W., Reid, F.D., Alton, P.A., Hill, J.G.: The clinical relevance of chemosensitivity testing in ovarian cancer. Cancer Detect. Prev. 22, 1998, s. 305-312.
11. Eltabbakh, G.H., Piver, M.S., Hempling, R.E., Recio, F.O., Lele, S.B., Marche-ti, D.L., Baker, T.R., Blumenson, L.E.: Correlation between extreme drug resi-stance assay and response to primary paclitaxel and cisplatin in patients with epithelial ovarian cancer. Gynecol. Oncol. 70, 1998, s. 392-397.
12. Orr, J.W. Jr., Orr, P., Kem, D.H.: Cost-effective treatment of women with advan-ced ovarian cancer by cytoreductive surgery and chemotherapy directed by art in vitro assay for drug resistance. Cancer J. Sci. Am. 5, 1999, s. 174-178.
13. Kurbacher, C.M., Janát, M., Brenne, U., Cree, I.A., Andreotti, P.E., Brucner H.W.: Optimized use of paclitaxel and platinum for primary ovarian cancer guided by an ex vivo chemosensitivity assay. Proc Am Soc Clin Oncol. 19, 2000, s. 385a, (abstrakt 1524).
14. Dottino, P., Evans, S.S., Segna, A., Beddoe, A.M., Sommers, B., Nagourney, R.A.: EVA-assay-directed therapy of advanced ovarian cancer. Proc Am Soc Clin Oncol. 19, 2000, s. 387a, (abstrakt 1532).
15. Fruehauf, J.P., Sahá, S., Mehta, R.S., Nora, D., Singh, T., Arora, M., Wilson, D., Metz, J., Ng, P.S.: Extreme Drug Resistance (EDR) assay to CIS platinum (CP) and survival in ovarian cancer (OC) patients - a comparative analysis. Proc Am Soc Clin Oncol. 19, 2000, s. 399a, (abstrakt 1579).

HLAVNÍ KLINICKÉ INDIKACE PRO TESTOVÁNÍ CHEMOREZISTENCE NÁDORŮ *IN VITRO* PRINCIPAL CLINICAL INDICATIONS FOR *IN VITRO* CHEMORESISTANCE TESTING OF MALIGNANT TUMORS

KISS I., ŽALOUDEK J., VYZULA R., TOMÁŠEK J., COUFAL O., KOCÁKOVÁ I.

UNIVERZITNÍ ONKOLOGICKÉ CENTRUM BRNO - ODDĚLENÍ KLINICKÉ ONKOLOGIE, CHIRURGICKÁ KLINIKA FN
BRNO, MASARYKŮV ONKOLOGICKÝ ÚSTAV

Korespondující autor: I Kiss, FN Brno-Bohunice, Oddělení klinické onkologie, Jihlavská 20, Brno 639 00

Souhrn: Na základě testů chemorezistence by teoreticky bylo možné vybrat optimální složení chemoterapie z více možností standardních schémat, zvažovat zda vůbec chemoterapii zahájit, eventuálně zařadit do léčebného schématu nestandardně používaná cytostatika. Nepřímé testy chemorezistence mohou být založeny na a) parametrech obecné biologické aktivity nádorů jako je proliferace, apoptóza, exprese některých regulačních proteinů, b) na specifických mechanismech detoxikace nebo metabolismu cytostatik, například aktivitu P-glykoproteinové pumpy, enzymů jako thymidylát syntáza nebo glutathion-S-transferáza, c) stanovení receptorů pro vazbu specifických inhibitorů jako jsou receptory steroidních hormonů nebo HER2-receptor. Přímé testy hodnotí přímý efekt kontaktu nádorových buněk v kultuře s cytostatikem. Jednoznačnou indikací k testování chemorezistence jsou nádory, u nichž dosud neexistuje statisticky dostatečně účinná chemoterapie jako jsou maligní melanom, adenokarcinom ledvin, nádory centrální nervové soustavy, nemalobuněčný karcinom plic, sarkomy měkkých tkání, hormonálně rezistentní karcinom prostaty, nádory dělohy a čípku, stejně jako nádory horní části zažívacího traktu, tedy jícnu, žaludku, pankreatu, jater a žlučových cest. Léčebné odpovědi na různé režimy chemoterapie v těchto indikacích zřídka přesahují 15-30%. U ostatních nádorů, kde jsou standardizovány relativně účinné režimy mohou testy chemorezistence přispět k rozhodování při progresi v průběhu primární léčby u recidiv k primární terapii již necitlivých. Autoři zdůrazňují potřebu korelací laboratorních nálezů a klinického průběhu a komentují v přehledu některé již publikované práce na toto téma.

Klíčová slova: chemorezistence nádorů, přímé a nepřímé testy chemorezistence, klinické indikace

Summary: Cancer chemotherapy may be optimized based on chemoresistance testing. In theory, the ineffective drug could be omitted and even replaced by another with pre-tested sensitivity. In indirect testing following parameters can be investigated: a) proliferation, apoptosis, regulatory proteins etc. as markers of biological activity of tumors, b) specific detoxication mechanisms and enzymes of drug metabolism as P-glycoprotein, thymidylate synthase, glutathion-S-transferase, etc., c) specific receptors for inhibitory drugs as steroid hormone receptors, HER2 receptor, etc. Direct testing is based on direct contact of cancer cells in tissue culture with a particular anti-cancer drug. Primary chemoresistant tumors as are melanomas, gliomas, soft tissue sarcomas, kidney carcinomas, non-small cell lung carcinomas, uterine cancer, hormone-independent prostatic carcinomas and especially malignant tumors of upper gastrointestinal tract, pancreas and bile ducts are among the first candidates for chemoresistance testing. Chemotherapy response rates in such tumors rarely achieve 15 to 30%. Even the tumors with good primary responses to standardized chemotherapy regimens as are breast, colorectal, testicular and ovarian cancers may qualify for chemoresistance testing in case of progression under standard chemotherapy or recurrence after therapy. The authors suggest the need for studies correlating the laboratory results with clinical outcomes in order to promote a vision of tailored chemotherapy.

Key words: tumor chemoresistance, indirect and direct tests, clinical indications

Význam prediktivních a prognostických markerů v klinické onkologii

Pravděpodobnost léčebné odpovědi nádorového onemocnění na podávání cytostatik může být velmi rozdílná. Nádorová onemocnění můžeme z klinického pohledu rozdělit na primárně chemorezistentní (maligní melanom s kurativním efektem téměř 0%) a chemosenzitivní (testikulární nádory s kurativním efektem až 100%). Toto orientační dělení se opírá o výsledky klinických studií v léčbě jednotlivých onemocnění. Dále však existuje individuální rezistence k chemoterapii v rámci jedné skupiny onemocnění, ať se již jedná o primárně rezistentní, například testikulární nádor s progresí v průběhu standardní chemoterapie, či vznik sekundární rezistence podmíněné přerůstající chemorezistentní subpopulací nádorových buněk v průběhu léčby chemoterapií první linie. Současná klinická onkologie staví na výsledcích klinických studií a za nejlepší léčebný standard je přijímán statisticky nejlepší léčebný postup, odpovídající dané histologické diagnóze a konkrétnímu klinickému stadiu, stanovenému na základě TNM klasifikace. Tato, svým způsobem neselektivní chemoterapie, v řadě případů může pacienta poškodit zbytečným toxickým působením neefektivní chemoterapie, prohloubením chemorezistence nádoru na jiná cytostatika, oslabením metabolismu a obranyschopnosti organismu. Jde ovšem také o zbytečné vynakládání finančních prostředků na cytostatika a podpůrnou léčbu.

Na základě testů chemorezistence by teoreticky bylo možné vybrat optimální složení chemoterapie z více možností standardních schémat, zvažovat zda vůbec chemoterapii zahájit, eventuálně zařadit do léčebného schématu nestandardně používaná cytostatika, včetně farmakologického ovlivnění mechanismů chemorezistence. Otázkou je postoj pacienta a příbuzných v případě nádorové polyrezistence na jejímž základě bychom eventuálně paliativní chemoterapii neindikovali.

Jednotlivé testy, odrážející s různou spolehlivostí a specificitou pravděpodobnou neúčinnost chemoterapie, je možno zařadit do několika kategorií:

1. **Nepřímé testy asociované s obecnou biologickou aktivitou nádoru** a sekundárně také s rezistencí k antiproliferační a genotoxické léčbě - proliferace, mitotická aktivita, proapoptická

pohotovost, genomová instabilita, telomerázová aktivita a typ metabolismu pacienta (1).

2. **Testy založené na specifickém vztahu k určitému cytostatiku** - P-glykoproteinová detoxikační pumpa - taxany, antracykliny, inhibitory topoizomerázy, MRP transportní protein a léková rezistence u platinových derivátů, testy asociované přímo s mechanismem účinku jednotlivých cytostatik. Například thymidylát syntáza (TS) a dihydropyrimidin dehydrogenáza (DPD) v případě fluoropyrimidinů se v současné době považují za silný prediktivní faktor efektu terapie fluoropyrimidiny (TS, DPD) a vedlejších účinků vyplývajících z toxicity přípravků DPD (2,3,4).

3. **Vyšetření receptorů hormonů**, například estrogenů, progesteronů nebo aromatázové aktivity patří do skupiny testů vázaných na mechanismus účinku antihormonálních preparátů v léčbě hormonálně dependentních nádorů.

4. Celé spektrum je doplněno o **testy přímé**, založené na testování citlivosti či rezistence resekaného a explantovaného nádoru k jednotlivým cytostatikům v primokulturách či stabilizovaných kulturách *in vitro*. Nejčastěji se jedná o **EDR testy** (Extreme Drug Resistance) s autory deklarovanou 99% úspěšností predikce nádorové rezistence k testovanému cytostatiku a **MTT test**, což je kolorimetrická metoda s jistou možností poloautomatizace, což by mohlo přinést možnost rutinního vyšetření většího množství vzorků nádorové tkáně. Obecně lze konstatovat, že v současné době není možné rutinní provádění testování chemorezistence touto posledně jmenovanou metodou, která je technologicky náročnější, dosud ne zcela standardizovaná a jistě ani do budoucna nebude dostupná pro většinu pracovišť.

Kombinace jednotlivých testů skýtá samozřejmě i další možnosti využití, jako je například testování možností modulační chemorezistence (5,6,7). Kombinací cytoflowmetrického stanovení exprese P-glykoproteinu s *in vitro* expozičním testem rezistence k doxorubicinu byl v laboratorních podmínkách prokázán efekt tamoxifenu a cepharanthinu na snížení chemorezistence doxorubicinu k nádorovým buňkám onemocnělých gastrointestinálního traktu, stejně tak i jejich synergický efekt.

Klinické indikace pro testování chemorezistence nádorů.

Jednoznačnou indikací k provádění výše uvedených testů chemorezistence je skupina nádorů, které patří mezi primárně rezistentní a pro které není standardizován žádný dostatečně účinný režim chemoterapie. Jedná se maligní melanom, adenokarcinom ledvin, nádory centrální nervové soustavy, nemalobuněčný karcinom plic, sarkomy měkkých tkání, hormonálně rezistentní karcinom prostaty, nádory dělohy a čípku, stejně jako nádory horní části zažívacího traktu, tedy jícnu, žaludku, pankreatu, jater a žlučových cest. Léčebné odpovědi na různé režimy chemoterapie v těchto indikacích zřídka přesahují 15-30%.

Druhou skupinu tvoří semirezistentní nádorová onemocnění jako jsou kolorektální karcinom, karcinom prsu, karcinom močového měchýře a karcinomy ORL oblasti.

Primárně chemosenzitivní nádory jako jsou karcinomy varlat, ovaríí, choriokarcinom a lymfomy asi není účelné vyšetřovat před zahájením chemoterapie první řady. Spolu s předchozími se však zde otevírá prostor pro testování chemorezistence v období relapsu onemocnění a po vyčerpání možností standardizované chemoterapie.

V současné době patří k nejčastěji testovaným karcinomům právě nádory zažívacího traktu, které jsou běžně resekovány a u nichž bývá k dispozici dostatek nádorové tkáně.

Dosavadní výsledky klinického zkoušení predikce chemorezistence

V případě karcinomu žaludku pro klinické stadium II. a III. i přes radikální operační výkon včetně následné adjuvantní chemoterapie výsledky 5 letého přežívání jsou 5-20%. Při pokročilém onemocnění stadium IV. na paliativní chemoterapii pod 1%. Standardně se chemoterapie používá jako léčebná modalita v paliativní indikaci. Aplikace v adjuvantní či neoadjuvantní indikaci je předmětem klinického zkoušení. Možná právě cíleněji vedená adjuvance fluoropyrindiny pro selektovanou skupinu pacientů na základě testů chemorezistence může dlouhodobě výsledky přežívání zlepšit. V případě paliativní chemoterapie nám výsledky testů chemorezistence umožní vybrat nejvhodnější chemoterapeutické schéma z rutinně používaných (DDP/FU/FA, FAMTX, FAM, EAP, apod.). Na druhou stranu širší paleta testovaných cytostatik k rezistenci může alternativně poukázat na využití cytostatik, která se v dané indikaci standardně neobjevují, např. irinotecan, CPT-11 (8,9).

Zajímavé výsledky klinického zkoušení individualizované chemoterapie na základě MTT testů publikovali japonští autoři (10). U 20 pacientů s karcinomem žaludku ve stadiu IV. onemocnění popisují 12 klinických odpovědí (12/20, RR 60%), z toho 5 pacientů dosáhlo kompletní remise. Další 7 pacientů dosáhlo partiální remise, z toho 3 s maligním ascitem, 3 s metastatickým postižením uzlin, 1 s objemným intraabdominálním tumorem. Autoři testovali v *in vitro* podmínkách chemosenzitivitu MTT testem po předchozí purifikaci odebraného vzorku nádorové tkáně. Úspěšnost metody MTT testu byla 51 kultivací z 58 odebraných vzorků (88%), s tím že po zpracování snížili kontaminaci nádorových buněk stromatem na pouhých 10%. Zbývající počet 31 pacientů z 51 úspěšně testovaných obdrželo fluoropyrindiny v adjuvantní terapii. Doba přežívání pacientů byla sledována u pacientů po kurativním chirurgickém řešení původního klinického stadia III a IV (17). Zde byli pacienti pro adjuvantní chemoterapii rozděleni na chemosenzitivní (alespoň najedno z testovaných cytostatik FU, MMC,) a rezistentní na MMC a FU. Adjuvantní chemoterapie byla aplikována ve všech případech. Výskyt relapsů onemocnění byl v senzitivní podskupině ve 3/10 případů a v rezistentní podskupině v 18/22 případů s tím že doba do relapsu a doba přežívání byly signifikantně lepší pro podskupinu chemosenzitivních onemocnění dle výsledků testů *in vitro* ($p < 0,005$).

Dále byla testována retrospektivně korelace tymidilát syntázy (TS) jako prognostického faktoru v případě karcinomu žaludku po kurativní resekci (67 pacientů) s následnou adjuvantní chemoterapií 5-fluorouracilem, stadium III.B (pT3/pN2). Skupina pacientů TS negativních měla dobu přežití signifikantně lepší ($p < 0,05$), 5leté přežití 42,3% než skupina TS pozitivní 25,1% ($p < 0,05$) (18).

Více výsledků korelace chemorezistence s klinickou odpovědí je k dispozici v případě **kolorektálního karcinomu**. Aktivita tymidilát syntasy jako prediktivního faktoru chemosenzitivity k léčbě fluoropyrindiny byla již prokázána v řadě studií. V součas-

ně době se hovoří o tymidilát syntase i jako o prognostickém faktoru v případě kurativně resekovaných karcinomů kolorekta (11,12). Pacienti byli rozděleni do skupiny TS negativní a TS pozitivní. Celková doba přežívání byla signifikantně lepší pro skupinu 107 pacientů TS negativních ve srovnání se skupinou 41 pacientů TS pozitivních ($p = 0.0003$). Současně byl hodnocen i vliv adjuvantní chemoterapie na obě skupiny pacientů. V souboru TS negativních byl zaznamenán jen nevýznamný rozdíl v podskupinách s léčbou cytostatiky nebo bez chemoterapie. V souboru TS pozitivních pacientů podskupina s adjuvantní chemoterapií vykazovala signifikantní prodloužení doby přežití ve srovnání s podskupinou bez chemoterapie ($p = 0.0439$). Jako adjuvantní chemoterapie byla podávána chemoterapie 5-fluorouracilem. Do budoucna může mít TS status vliv na vhodnost indikace adjuvantní chemoterapie v léčbě nádorů horní části gastrointestinálního traktu vůbec, či v případě kolorektálního karcinomu na složení adjuvantní chemoterapie. Částečnou odpověď budeme znát z výsledků EORTC studie, která selektuje nemocné s kolorektálním karcinomem pro chemoterapii 5-fluorouracilem nebo irinotekanem (CPT-11) právě podle stavu exprese tymidilát syntasy.

V léčbě pokročilého kolorektálního karcinomu byly výsledky MTT testů chemorezistence využívány v rámci klinického hodnocení jak v lokoregionální, tak i systémové aplikaci. V případě metastatického onemocnění do jater byla podávána intraarteriální chemoterapie cestou arteria hepatica (13). Autoři zde použili k predikci chemorezistence *in vitro* HTC assay. Korelace s klinickými výsledky je popisovaná pro kompletní a partiální remise 55%. Při výběru systémové chemoterapie byly zohledněny výsledky MTT testů u 15 pacientů s tím že klinická odpověď byla 5/15 s tím, že ve skupině odpovídajících na léčbu byl prokázán vyšší inhibiční efekt Cisplatinu (14). Obdobné závěry na základě MTT testů jsou i z pracoviště Dr. Hajdúcha z Laboratoře experimentální medicíny v Olomouci (9). Autoři se zamýšlí nad dobrými výsledky *in vitro* testů pro cisplatinu a patrně neprávem přehlíženým efektem platinových derivátů u karcinomu kolorekta.

Obdobně v případě **bronchogenního karcinomu** výsledky testů chemorezistence *in vitro* umožňují větší výběr ze spektra standardně používaných léčebných schémat. K testování by byl vhodný panel standardně používaných cytostatik jako cisplatin, karboplatin, topotekan, vinorelbin, vinblastin, paklitaxel, 5-fluorouracil, mitomycin C, etoposid a gemcitabin. Vzhledem k obtížnějšímu odběru dostatečného vzorku nádoru potřebného k testování nádorů plic nejsou zatím dostupná data klinické korelace. V případě podskupiny pacientů s extensivní formou malobuněčného karcinomu plic byla retrospektivně klinická korelace demonstrována současně i s ovlivněním délky přežití (15).

V případě **maligního melanomu** byla možnost vyhnout se neefektivní chemoterapii na základě testů chemorezistence potvrzena v retrospektivní studii (16). Celkově bylo testováno 26 onemocnění metastatického melanomu z nichž dle výsledku testů a možnosti sledování klinické odpovědi bylo pouze 19. Celkově bylo 8 pacientů označeno jako senzitivních na základě *in vitro* testů. Klinické odpovědi, z toho kompletní remise 1x a partiální remise 2x, byly zaznamenány v případě 3 senzitivních onemocnění (3/3). Stabilizace onemocnění byly zjištěny u dalších 4 chemosenzitivních případů a progresse onemocnění pouze u jednoho pacienta z podskupiny senzitivních. Naopak v 11 případech (10 rezistentních a 1 senzitivní) nastala progresse onemocnění.

V současné době probíhá jen několik aktivních studií k verifikaci testů chemorezistence klinickými korelátory. Jedná se o studii zaměřenou na recidivující **karcinom ovaria** (M.D. Anderson Protocol GYN 97), metastatický **karcinom prsu** (UCLA, M.D. Anderson a dalších 13 center v U.S.A.), neoadjuvantní chemoterapii pro **karcinom ovaria** (EORTC 55971) a rekurentní **glioblastom** (UCLA).

(Práce je podpořena grantem MŠMT J07/98-141100003)

Literatura:

1. Žaloudík J.: Chemorezistence jako bioparametr prediktivní onkologii. E RA 2000, Brno 13.4.2000, 123-124.
2. Coufal O, Žaloudík J, Malaska J, Vyzula R.: Tymidilát syntaza a její význam v prediktivní onkologii. Klinická onkologie, 2000, 4, 116-121.
3. Kiriha Y, Yamoto W, Toge T, Nishiyama M.: Dihydropirimidine dehydrogenase, multidrug resistance-associated protein, and thymidilate synthase gene expression levels can predict 5-fluorouracil resistance in human gastrointestinal cancer cells. Int J Oncol 1999 Mar; 14(3): 551-556.

4. Gamelin E, Boisdron-Celle M, Guérin-Meyer V, Delva R, Lortholary A, Genevieve F, Larra F, Ifrah A, Robert J: Correlation between uracil and dihydrouracil plasma ratio fluorouracil (5-FU) pharmacokinetic parameters, and tolerance in patients with advanced colorectal cancer: A potential interest for predicting 5-FU toxicity and determining optimal 5-FU dosage. *J Clin Oncol* 1999 Apr; 17(4): 1105-1110.
5. Hotta T, Tanimura H, Yamaue H, Iwahashi M, Tani M, Tsunoda T, Tamai M, Noguchi K, Mizobata S, Arii K, Terasawa H: Tamoxifen circumvents the multidrug resistance in fresh human gastrointestinal cancer cells. *Anticancer Res* 1997 Mar-Apr; 17(2A): 885-889.
6. Hotta T, Tanimura H, Yamaue H, Iwahashi M, Tani M, Tsunoda T, Tamai M, Noguchi K, Mizobata S, Arii K, Terasawa H: Modulation of multidrug resistance by cepharanthine in fresh human gastrointestinal tumor cells. *J Surg Res* 1996 Nov; 66(1): 31-35.
7. Hotta T, Tanimura H, Yamaue H, Iwahashi M, Tani M, Tsunoda T, Tamai M, Noguchi K, Mizobata S, Terasawa H: Sinergistic effect of tamoxifen and cepharanthine for circumventing the multidrug resistance. *Hum Cell* 1995 Dec; 8(4): 185-188.
8. Tsunoda T, Tanimura H, Hotta T, Tani M, Iwahashi M, Tanaka H, Matsuda K, Yamaue H: *In vitro* antitumor effect of topoisomerase-I inhibitor, CPT11, on freshly isolated human gastric and colorectal cancer. *Anticancer Res* 1999; 19: 5451-5455.
9. Zaloudik J, Hajduch M, Coufal O, Kiss I, Vyzula R: Možnosti testování chemorezistence nádorů trávicího traktu. *Brněnské onkologické dny*, 24.-26.5.2000., abstr. 60
10. Yamaue H, Tanimura H, Noguchi K, Hotta T, Tani M, Tsunoda M, Iwahashi M, Tamai M, Iwakura S: Chemosensitivity testing of fresh human gastric cancer with highly purified tumor cells using MTT assay. *Br J Cancer* 1992; 66:794-799.
11. Takenoue T, Nagawa H, Matsuda K, Fujii S, Nita M E, Hatano K, Kitayan T, Muto T: Relation between thymidilate synthase expression and survival for colon carcinoma, and 'determination of appropriate application xxxxx fluorouracil by immunohistochemical method. *Ann Surg Oncol* 2000 Apr; 7(3): 193-198.
12. Edler D, Kressner U, Ragnhammar P, Johnston PG, Magnusson I, Glimel, Pahlman L, Lindmark G, Blomgren H: Immunohistochemically detected thymidilate synthase in colon cancer: an independent prognostic factor of survival.
13. Link K H, Kornmann M, Leder G H, Butzer U, Pillasch J, Staib L, Gansauge F, Beger H G: Regional chemotherapy directed by individual chemosensitivity testing in vitro: a prospective decision-aiding trial. *Clin Cancer Res* 1996 Apr; 2(4): 623-33.
14. Yamaue H, Tanimura H, Nakamori M, Noguchi K, Iwahashi M, Tani M, Hotta T, Murakami K, Ishimoto K: Clinical evaluation of chemosensitivity testing for patients with colorectal cancer using MTT assay. *Cancer Lett* 1996 Oct 1; 107(1): 117-123.
15. Gazdar AF, Steinberg S M, Russel E K, Linoaila I L, Oie H K, Ghosh B C, Cotelingam J D, Johnson B E, Minna J D, Hide D C: Correlation of in vitro drug-sensitivity testing results with response to chemotherapy and survival in extensive-stage small cell lung cancer: a prospective clinical trial. *J Natl Cancer Inst* 1990; 82: 117-124.
16. Schandendorf D, Worm M, Algermissen B, Kohlbus C M, Czarnetzki B M: Chemosensitivity testing of human malignant melanoma: A retrospective analysis of clinical response and in vitro drug sensitivity.
17. Furukawa T, Kubota T, Hoffman M: Clinical applications of the histoculture drug response assay. *Clin Cancer Res* 1995 Mar; 1: 305-311.
18. Suda Y, Kuwashima Y, Tanaka Y, Uchida K, Akazava S: Immunohistochemical detection of thymidilate synthase in advanced gastric cancer: a prognostic indicator in patients undergoing gastrectomy followed by adjuvant chemotherapy with 5-fluorouracil. *Gan To Kagaku Ryoho* 1999 Feb; 26(3): 321-327.