

JE POUŽITÍ LITHIA K PROFYLAXI A K LÉČBĚ CHEMOTERAPIÍ INDUKOVANÉ NEUTROPENIE OPODSTATNĚNÉ A BEZ RIZIKA? KLINICKO-EXPERIMENTÁLNÍ STUDIE.

IS AN ADMINISTRATION OF LITHIUM FOR PROPHYLAXIS AND TREATMENT OF CHEMOTHERAPY INDUCED NEUTROPENIA WELL-FOUNDED AND SAFE?

SVOBODA M.^{1,3}, HAJDÚCH M.^{2*}, KLEINOVÁ J.¹, HOLÁNEK M.¹, RADOVÁ L.², LIPERT J.², ŠIMÍČKOVÁ M.¹, GOMBOŠOVÁ J.³, FOLBER F.³, CHOBOLA M.³, ANDRAŠÍNOVÁ T.³, PASEKA T.³, KONEČNÁ E.¹, SLEZÁKOVÁ R.¹, SOŠKOVÁ R.¹, NAGYOVÁ L.¹, GRELL P.^{1,3}, GARAJOVÁ I.^{1,3}, SOLAŘÍKOVÁ I.¹, ZVARÍKOVÁ M.¹, HANÁK L.¹, VALÍK D.¹, PETRÁKOVÁ K.¹ A VYZULA R.^{1,3}

¹MASARYKŮV ONKOLOGICKÝ ÚSTAV BRNO

²LABORATOŘ EXPERIMENTÁLNÍ ONKOLOGIE, DĚTSKÁ A ONKOLOGICKÁ KLINIKA LF

³LÉKAŘSKÁ FAKULTA MASARYKOVY UNIVERZITY V BRNĚ

Souhrn

Východiska: Hematologická toxicita patří k nežádoucím účinkům protinádorové léčby a může vést k závažnému iatrogennímu poškození pacienta. Lithium je tradičně využíváno k profylaxi a k léčbě chemoterapií indukované neutropenie, neboť jeho podávání indukuje reverzibilní leukocytózu. Výzkum z posledních let dokazuje, že lithium inhibuje apoptózu a stimuluje proliferaci buněk, a to prostřednictvím přímého vlivu na GSK-3 β a Akt/PKB kinázu. Obě kinázy hrají zároveň důležitou roli v procesu přežívání a chemorezistence nádorových buněk. **Soubor, metody:** V naší práci jsme u 53 primárních tumorů provedli 151 MTT testů chemorezistence k vybraným cytostatikům, a to za přítomnosti lithia nebo s cytostatikem samotným. Na souboru 106 pacientů jsme sledovali vliv lithia na hematopoézu a na vývoj nádorového onemocnění. Analyzovali jsme 349 párových vyšetření krevního obrazu a hodnotili jsme čas do progresu. **Výsledky:** Prokázali jsme enormní nárůst chemorezistence primárních nádorů testovaných In-vitro k doxorubicinu ($p < 0,0001$) a k paklitaxelu ($p < 0,0003$) za přítomnosti lithia. U vyselektované skupiny pacientů jsme prokázali, že vyšší počet aplikací lithia byl spjatý s časnou progresí onemocnění ($p = 0,0061$). Podávání lithia vedlo k vzestupu leukocytů a neutrofilů, výsledek však nebyl statisticky významný ($p = 0,21$ a $0,14$). **Závěr:** Užívání lithia k profylaxi a k léčbě chemoterapií navozené myelotoxicity není opodstatněné a je spjato s rizikem indukce chemorezistence nádoru.

Klíčová slova: lithium, chemoterapie, hematologická toxicita a neutropenie, chemorezistence, MTT test

Summary

Background: Hematologic toxicity belongs to the most common adverse effects of cancer chemotherapy and can lead to serious iatrogenic harm of the patient. Lithium is traditionally used for prophylaxis and treatment of chemotherapy induced neutropenia, because its application induces a reversible leucocytosis. Recent investigations demonstrate that Lithium inhibits apoptosis and stimulates cell proliferation through a direct effect on GSK-3 β and Akt/PKB kinase. Simultaneously, both kinases are playing an important role in survival process and chemoresistance of tumor cells. **Material, methods:** In 53 primary tumors we carried out 151 MTT tests of chemoresistance to selected cytotoxic drugs with presence or absence of Lithium. In a group of 106 patients the Lithium effect on hematopoiesis and on a development of cancer was evaluated. We analyzed 349 pair-examinations of blood counts and measured the time to progression. **Results:** We demonstrated an enormous increase in chemoresistance of primary in-vitro tested tumors to doxorubicin ($p < 0,0001$) and paclitaxel ($p < 0,0003$) in the presence of Lithium. In a selected group of patients we demonstrated that a higher rate of Lithium applications leads to early disease progression ($p = 0,0061$). Lithium administration resulted in increased count of leukocytes and neutrophiles, but the effect was not significant. **Conclusion:** Administration of Lithium for prophylaxis and treatment of chemotherapy induced neutropenia is unjustified and causes increased tumor chemoresistance.

Key words: Lithium, chemotherapy, hematologic toxicity, neutropenia, chemoresistance, MTT test

Úvod

Hematologická toxicita patří k častým a nejzávažnějším nežádoucím účinkům protinádorové léčby, zejména chemoterapie. Vznik febrilní neutropenie může přímo ohrozit život pacienta a podpůrná léčba těchto stavů je finančně značně nákladná (1). Asymptomatická neutropenie dokáže rovněž iatrogeně poškodovat pacienta v případech, kdy lékař u kurativní chemoterapie indikuje redukcí dávky cytostatika nebo prodloužení intervalů mezi jednotlivými sériemi léčby. Dochází tím ke snížení relativní intenzity dávky chemoterapie (RDI), což může mít nepříznivý dopad na výsledky protinádorové léčby, včetně délky celkového přežití (2).

Až do roku 1991, kdy se v klinické praxi začaly používat růstové faktory myelopoézy (RFM) (např. G-CSF a GM-CSF), byly možnosti profylaxe a léčby chemoterapií indukované neutropenie (CIN – chemotherapy induced neutropenia) a febrilní neutropenie (FN) značně omezené. Kromě snížení RDI bylo možné použít granulocytárních transfúzí nebo leukocytózujičích léčiv. Jednalo se o léčiva primárně určená pro jiný účel, jejichž vedlejším účinkem byla benigní a reverzibilní leukocytóza (např. kortikoidy a lithium). V současné době, kdy máme RFM běžně k dispozici, je přístup v podobě snižování RDI u kurativní chemoterapie spornou volbou, a aplikace granulocytárních transfúzí a kortikoterapie jsou obecně spojeny s vysokým rizikem infekčních komplikací. Podávání lithia však nadále zůstává empiricky ověřenou, úspěšnou, dobře tolerovanou a cost-effective alternativou k aplikaci RFM (3-5).

Až dosud bylo používání lithia za účelem stimulace hematopoézy považováno za relativně bezpečné. Pozornost lékařů se maximálně zaměřila na poučení o možném výskytu jeho nežádoucích účinků (především nauzea, průjem, třes rukou a zmatenost). Vycházelo se přitom jak z vlastní zkušenosti, tak i z více než 50 let historie používání lithia v psychiatrii, kde je indikováno k profylaxi a k léčbě bipolární poruchy (6). Podávání lithia probíhalo i přesto, že molekulární mechanismy jeho působení nebyly dostatečně vysvětleny. Až v posledních pěti letech zejména neuropsychiatrické literární zdroje publikují práce, které se tomuto aspektu věnují a mimo jiné dokazují, že lithium má i silný neuroprotektivní účinek. Mechanismus tohoto účinku spočívá ve schopnosti lithia přímo regulovat aktivitu AKT/PKB (dále jen AKT) a GSK-3 β kinázy (7-9).

Obě kinázy jsou součástí PI3K/AKT signální dráhy, která je spojnicí extracelulárních receptorů růstových faktorů s efektorými jejich funkcí. PI3K/AKT dráha je základní signální cestou, která se uplatňuje v procesech buněčné proliferace, kterou stimuluje, a programové smrti buňky – apoptózy, kterou inhibuje. PI3K/AKT signální dráha v normální buňce nabyvá na významu především tehdy, nastanou-li pro její životaschopnost nepříznivé extracelulární podmínky (např. přítomnost toxických látek) (10). Její aktivita je schopna zabránit jak vzniku, tak i realizaci již iniciovaného apoptotického děje. Bohužel, stejnou funkci plní PI3K/AKT signální dráha i v nádorové buňce. In vitro provedené experimenty s nádorovými buněčnými liniemi dokazují, že aktivace této dráhy vede ke zvýšenému přežívání a proliferaci nádorových buněk a spolupodílí se na vzniku primární a sekundární chemorezistence (10). O významu PI3K/AKT cesty svědčí i to, že některé její inhibitory již dosáhly fáze klinického zkoušení (12).

Přehledovou práci, která předkládá současné poznatky o mechanismu působení lithia a popisuje jeho využití za účelem stimulace hematopoézy, publikujeme v časopisu Klinická onkologie (13).

Rozhodli jsme se proto zrealizovat klinicko-experimentální studii, která si vytyčila následující cíle: 1. zhodnotit vliv lithia na chemorezistenci primárních tumorů k vybraným cytostatikům v in-vitro experimentu, 2. provést retrospektivní analýzu

souboru pacientů, kterým bylo lithium aplikováno za účelem profylaxe nebo léčby CIN, a vyhodnotit jeho vliv na krevní elementy a případně i na vývoj nádorového onemocnění.

Materiál a metody

Soubor primárních tumorů

Na 53 vzorcích primárních tumorů bylo v in vitro podmínkách provedeno 151 cytotoxických MTT testů chemorezistence. Histogenetický původ nádorů udává tabulka č. 1.

Tabulka 1: Charakteristika primárního souboru		
Počet pacientů s min. 1 aplikací lithia v letech 2003-04	648	
Počet pacientů zařazených do studie*	106	
z toho počet s hodnotitelným vývojem choroby	88	
Počet pacientů v kontrolním souboru	51	
Zastoupení zhoubných novotvarů v primárních souborech		
Zhoubné novotvary (ZN)	Soubor pacientů	Soubor primárních tumorů (MTT test)
ZN prsu	29	8
ZN vaječníků	20	20
ZN gastrointestinální	16	3
ZN těla a hrdla dělohy	8	0
ZN bronchogenní	7	9
ZN neznámého origa	4	4
ZN urogenitální	2	2
ZN měkkých tkání	1	0
ZN krevních buněk	1	7

*Poznámka: pacienti, kteří splnili kritéria užšího výběru – viz. text

MTT test

K analýze *in-vitro* senzitivity nádorových buněk na cytostatika byl použit třídení MTT test. Suspenze vitálních nádorových buněk byla získána z dodaných vzorků použitím enzymatického trávení a gradientovou centrifugací na hustotním gradientu Ficoll-Metatrizoát (1,077 g/ml; Pharmacia, Švédsko). Buňky byly dvakrát promývány v RPMI 1640 (s přísadkami: 2mM glutamin, bikarbonát sodný, 100U/ml penicilin, 100 μ g/ml streptomycin; Sigma, USA) Po druhém promytí byla buněčná peleta suspendována v kultivačním médiu RPMI 1640 s přísadkami antibiotik (viz výše) a 15% fetálního hovězího séra (Biocrom, Česká republika), 5 μ g/ml inzulínu a 5 μ g/ml transferinu, v konečné koncentraci 1–2x10⁶ buněk / ml obohaceného média. Osmdesát μ l buněčné suspenze bylo rozkapáno do 96-jamkových panelů obsahujících 20 μ l vhodně naředěného cytostatika. Nádorové buňky byly vystaveny působení každého léčiva ve dvou opakovaných a v šesti různých koncentracích po dobu tří dnů při teplotě 37°C a v atmosféře obohacené s 5% CO₂. V našem experimentu byla chemorezistence/chemosenzitivita primárních tumorů testována k cisplatině, melfalanu, doxorubicinu a paklitaxelu. Tato cytostatika byla testována samostatně, nebo v přítomnosti 10mM či 2mM lithia (LiCl, chlorid lithný, Sigma, USA). Kontrolní nádorové buňky byly kultivovány bez použití cytostatik a lithia. Na závěr kultivace bylo ke každé jamce přidáno 10 μ l MTT (5mg/ml) a inkubováno dalších 6 hodin. Žlutá tetrazoliová sůl byla redukována na modrý formazan pouze živými buňkami. Formazanové krystaly byly rozpuštěny pomocí 100 μ l 10% vodného roztoku laurylsulfátu sodného (pH = 5,5) přes noc při 37°C. Optická denzita byla měřena při 540nm pomocí přístroje Labsystem iEMS Reader MF (UK) a přežívání nádorových buněk bylo vypočítáno pomocí vzorce: IC₅₀ = (absorbance v jamkách s cytostatiky / absorbance v kontrolních jamkách) x 100. IC₅₀ hodnota je koncentrace cytostatika letální pro 50% nádorových buněk a byla vypočítána ze získaných křivek dávkové závislosti.

Soubor pacientů

Pomocí nemocničního informačního systému Masarykova onkologického ústavu jsme v období let 2003 až 2004 identi-

fikovali 648 pacientů, kterým bylo aplikováno lithium za účelem stimulace hematopoézy. Z tohoto počtu bylo vybráno 106 pacientů, kteří splnili následující kritéria: 1) byli léčeni paliativní chemoterapií, 2) alespoň dvě aplikace chemoterapie byly doprovázeny podáváním lithia, a to po dobu 5 až 10 dnů, v denní dávce 1000 mg, 3) měli provedeno alespoň jedno párové vyšetření krevního obrazu, přičemž první vyšetření nastalo v době předpokládaného nejvyššího poklesu elementů bílé krevní řady po aplikaci chemoterapie (den 1), a druhé vyšetření následovalo po ukončení podávání lithia (podrobněji viz. dále). Časné parametry efektivity léčby bylo možné na základě údajů ve zdravotnické dokumentaci spolehlivě vyhodnotit u 88 z původních 106 pacientů. Zvlášť byl hodnocen soubor 46 pacientů, kteří byli léčeni prvními liniemi paliativní chemoterapie obsahujícími i jiné, než pouze alkylační cytostatikum. Stanovení léčebné odpovědi bylo založeno na RECIST kritériích. Podrobnosti o souborech pacientů udává tabulka č. 1 a 2.

Počet pacientů v klinickém souboru	88	
z toho léčených 1. linií paliativní chemoterapie	55	
Počet aplikací chemoterapie u 1 pacienta - průměr	7	
Počet sérií podání lithia v průběhu chemoterapie - průměr	3	
Medián relativní intenzity dávky chemoterapie (RDI) v souboru	86 %	
Charakteristika podsouboru pacientů léčených 1. linií paliativní chemoterapie obsahujícími i jiné, než pouze alkylační cytostatikum		
Počet pacientů	46	
Progrese choroby	< 7 měsíců	≥ 7 měsíců
Počet pacientů	25	21
z toho počet pacientů s podáním lithia u ≥ ½ aplikací chemoterapie	20	8
Medián RDI	90%	84%
ZN prsu	8	9
ZN bronchogenní	4	2
ZN těla a hrdla dělohy a vaječníků	3	4
ZN gastrointestinální	7	5
ZN urogenitální	1	0
ZN jiné a neznámého orgánu	2	1

Pacientům (počet v závorce) byly aplikovány následující režimy chemoterapie: AC (3), CAP (4), CBDCA (2), CBDCA/CFA (5), CBDCA/CFA/ADM (1), CBDCA/IFO (1), CAMPTO (3), DBD (1), DDP/CAMPTO (3), DDP/Gemzar (2), DDP/VP (2), FAC (2), FEM (1), FED (1), FOLFIRI (5), Gemzar (5), Gemzar/CBDCA (3), Gemzar/NVLB (1), Hycamtin (5), CHOP (1), IP (4), NVLB (3), NVLB/Xeloda (2), Paklitaxel (4), Paklitaxel/CBDCA (4), Paklitaxel/Gemzar (1), Docetaxel (7), Docetaxel/CBDCA (3), Docetaxel/NVLB (3), Docetaxel/Xeloda (1), VP (1), VP/CBDCA (3), XELIRI (1). Zkratky a podrobnosti k uvedeným režimům chemoterapie naleznete v publikaci: „Diagnostika a léčba vybraných maligních nádorových onemocnění“ (14).

Soubor párových vyšetření krevních obrazů

Za účelem vyhodnocení působení lithia na krevní elementy bylo v testovacím souboru 106 pacientů zpracováno celkem 261 párových vyšetření (pv) krevního obrazu. Dvojice vyšetření byla tvořena hodnotou příslušného krevního elementu v den zahájení (den 1) a v den ukončení měření. Z těchto vyšetření bylo 83 pv vyřazeno pro leukocytózu (leukocyty > 10,1x10⁹/l) a/nebo granulocytózu (neutrofilů > 5,7x10⁹/l) ve druhém odběru, a to z důvodu, že nebylo možné vyloučit případný vliv jiného leukocytózujičícího činitele, např. infekci. Kontrolní soubor tvořilo dalších 42 pacientů, od kterých jsme zpracovali 50 pv krevního obrazu. U 30 z těchto pacientů nebyla podávána žádná podpůrná léčba myelosuprese (36 pv) a u 12 pacientů byly v období 7 dnů aplikovány 3 dávky RFM G-CSF (14 pv). V případech, kdy byly podávány RFM jsme nepoužili vylučovací kritérium leukocytózy a granulocytózy. Abychom mohli statisticky vyhodnotit vliv lithia na myelopoézu, byl testovací soubor upraven tak, aby měly hodnoty neutrofilů získané při prvním vyšetření (den 1) v testovacím i v kontrolním souboru shodnou distribuci. Tato úprava způsobila redukci párových

vyšetření v testovacím souboru na konečných 86 v případě hodnocení neutrofilů a 83 v případě leukocytů. Blížší charakteristiku těchto souborů obsahuje tabulka č. 3.

Počet analyzovaných párových vyšetření krevního obrazu		349			
z toho v testovacím souboru		261			
z toho v kontrolním souboru		88			
Krevní element	Podmínky experimentu Látka - dávka/dny	Počet párových analýz*	Den 1 (medián x10 ⁹ /l)	Den 7 (medián x10 ⁹ /l)	Srovnání D1 a D7 p=
Leukocyty	Lithium (Li) - 1g/D1-7	83	2,49	4,45	1,3x10 ⁻¹⁹
Neutrofilů	Lithium (Li) - 1g/D1-7	86	0,95	2,45	3,8x10 ⁻¹⁷
Leukocyty	Li 1g+Prednison 20-40mg (Li+P)/D1-7	20	2,36	5,51	2,2x10 ⁻⁷
Neutrofilů	Li 1g+Prednison 20-40mg (Li+P)/D1-7	20	0,89	2,83	2,7x10 ⁻⁶
Leukocyty	G-CSF (CSF) / D1-3	14	1,87	7,27	0,0029
Neutrofilů	G-CSF (CSF) / D1-3	14	0,54	4,95	0,0028
Leukocyty	kontrolní skupina (K)	30	2,5	4,22	6,7x10 ⁻⁸
Neutrofilů	kontrolní skupina (K)	36	0,95	2,03	2,2x10 ⁻⁸
Ačkoliv bylo dosaženo vyšší hodnoty mediánu počtu neutrofilů ve skupině s aplikací lithia v porovnání s kontrolní skupinou, výsledek nebyl statisticky signifikantní (p = 0,14)					
*Poznámka: párové analýzy, které splnily kritéria užšího výběru, viz. text					

Sběr a statistické zpracování dat

Klinická část práce byla založena na retrospektivní analýze údajů dostupných ze zdravotnické dokumentace vedené na základě informovaného souhlasu pacienta. Finálnímu zpracování datových výstupů předcházela anonymizace dat. Testování primárních tumorů bylo provedeno po podepsání informovaného souhlasu s uvedeným výkonem. Při statistickém zpracování byly první stanoveny základní charakteristiky datových souborů (počet, průměr, medián, modus, rozptyl a směrodatná odchylka) a následně provedeny porovnávací analýzy vybraných skupin (F-test, párový a nepárový t-test, Manův-Whitneyův test, případně ANOVA).

Relativní intenzita dávky chemoterapie (RDI) je uváděna v procentech a je dána poměrem skutečné intenzity dávky chemoterapie a plánované intenzity dávky chemoterapie. Intenzita dávky chemoterapie (mg / m² / týden) je dávka cytostatika v mg na m² tělesného povrchu pacienta aplikovaná za celkovou dobu podávání cytostatika přepočítanou na týdny (období mezi první a poslední aplikací cytostatika).

Ke zpracování dat, grafické úpravě a za účelem biostatistických analýz byly použity legálně vlastněné programy: Microsoft Excel, Microsoft Word, KyPlot, Prisma a Statgraphics Plus.

Poznámka:

Pacientům je lithium nejčastěji aplikováno perorálně v podobě Li₂CO₃ - uhličitan lithný (lat. lithii carbonas, angl. lithium carbonate), který je na českém trhu léčiv komerčně dostupný pod názvem Contemol. Za účelem intravenózního podání nebo pro in-vitro experimenty na buněčných liniích se používá roztok chloridu lithného LiCl (lat. lithii chloridum, angl. lithium chloride). Biologický účinek je v obou případech stejný.

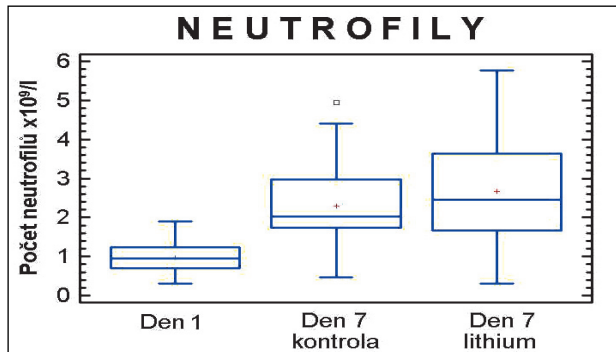
Výsledek

Vliv lithia na krevní elementy

Na souboru 178 aplikací lithia (100%) u 106 pacientů, jsme zjistili, že nejčastějším způsobem podávání lithia (57%) byla 7 denní aplikace 1000mg rozdělených do dvou dílčích dávek. Souběžné podávání lithia a kortikoidů (prednison v dávce 20-40mg po dobu 7 dnů) bylo zaznamenáno u 16% aplikací. Zbývajících 27% tvořily různé režimy podávání lithia. V testovacím i v kontrolním souboru došlo po 7 dnech k signifikantnímu vzestupu leukocytů a neutrofilů. Statistické zpracování, ve kterém byly dosažené výsledky krevních obrazů srovnávány s kontrolním souborem, neprokázalo stimulační účinek lithia na žádnou z buněčných krevních řad. V případech celkového počtu leukocytů (leu) a neutrofilů (neu) bylo dosaženo vyšší hodnoty mediánu ve skupině po aplikaci lithia (leu 4,45x10⁹/l a neu 2,45x10⁹/l) ve srovnání s kontrolní skupinou (leu 2,5x10⁹/l a neu 0,95x10⁹/l).

nání s kontrolní skupinou (leu $4,22 \times 10^9/l$ a neu $2,03 \times 10^9/l$), což po praktické stránce jistě častěji umožnilo pokračovat v aplikaci chemoterapie bez jejího přerušení nebo redukce dávky, výsledek však nebyl statisticky signifikantní pro leukocyty ($p=0,21$) ani pro neutrofilie ($p=0,14$) (graf č. 1). Stejně tak nebyl prokazatelný ani aditivní účinek kortikoidů. Oproti tomu aplikace RFM vykazovala jednoznačný stimulační efekt. Bližší charakteristiku výsledků obsahuje tabulka č. 3.

Graf č. 1. Vývoj počtu neutrofilů u pacientů po 7 dnech léčby lithiem a srovnání s kontrolní skupinou bez léčby.



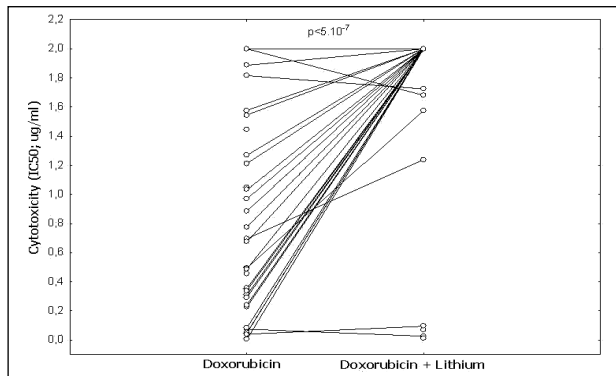
Vliv lithia na chemorezistenci primárních tumorů, in-vitro model

Na 53 vzorcích primárních tumorů bylo in-vitro provedeno 151 MTT testů chemorezistence. Z počátku byla rezistence testována k cytostatikům: cisplatina, doxorubicin a paklitaxel. Nádorové buňky byly kultivovány s příslušným cytostatikem s nebo bez přítomnosti lithia o koncentraci 10mM (souhrm výsledků MTT testu obsahuje tabulka č. 4). Za těchto okolností jsme prokázali enormní nárůst chemorezistence primárních tumorů vůči doxorubicinu (graf č. 2) a paklitaxelu. Medián hodnoty IC50 byl pro doxorubicin bez lithia 0,93 $\mu g/ml$ a 2,00 $\mu g/ml$ pro doxorubicin s lithiem ($p<0,0001$, párový t-test). Medián hodnoty IC50 byl pro paklitaxel bez lithia 33,82 $\mu g/ml$ a 50,00 $\mu g/ml$ pro paklitaxel s lithiem ($p<0,0003$). V případě cisplatiny nebyl zaznamenán žádný vliv lithia na chemorezistenci. Proto bylo provedeno několik MTT testů s jiným cytostatikem působícím alkylačním mechanismem, a to s melfalanem. Ani v tomto případě nebyl prokázán žádný vliv lithia na chemorezistenci. Vzhledem k výsledkům dosažených s 10mM koncentrací lithia, byl experiment rozšířen i o MTT testy s 2mM lithiem. Při této koncentraci byla chemorezistence indukována pouze u doxorubicinu, výsledek však nebyl hraničně statisticky signifikantní ($p=0,09$).

Tabulka 4.

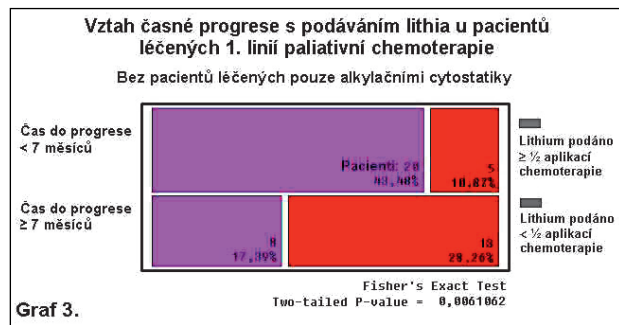
IC50	Lithium 10mM					
	Cisplatin	Cisplatin+Li	Doxorubicin	Doxorubicin+Li	Paclitaxel	Paclitaxel+Li
Average	25,47	19,50	1,02	1,76	32,35	46,22
Median	15,99	15,66	0,93	2,00	33,82	50,00
Std.deviation	22,89	20,09	0,76	0,60	16,48	11,92
n	36		36		37	
p-value (paired t-test)	0,07		4,53835E-07		0,00027692	

Graf č. 2. Vývoj chemorezistence (hodnot IC50) k doxorubicinu bez a s přítomností lithia (10mM) u testovaných primárních tumorů.



Vliv lithia na chemorezistenci primárních tumorů, in-vivo model

Paralelně s testováním chemorezistence in-vitro probíhala i retrospektivní klinická studie, která hodnotila výsledky první linie protinádorové léčby u pacientů, kterým bylo v průběhu chemoterapie aplikováno lithium. Ze 106 pacientů zařazených do studie bylo vybráno 55 pacientů, kteří měli vzdálenostně metastazované onemocnění a byli léčeni 1. linií paliativní chemoterapie. Vzhledem k tomu, že výsledky MTT testu prokázaly neúčinnost lithia na cytostatika působící alkylačním mechanismem, bylo ze skupiny 55 pacientů vyřazeno dalších 9 pacientů, kteří měli protinádorovou léčbu založenou na podávání alkylačně působícího cytostatika v monoterapii. Bližší charakteristiku souboru a přehled výsledků přináší tabulka č. 2. Medián času dogrese v případě celého souboru činil 6,37 měsíce. Zajímalo nás, zda u pacientů, jejichž choroba od zahájení protinádorové léčby časně zprogredovala (do 7 měsíců), bylo vyšší zastoupení aplikací chemoterapie doprovázených podáváním lithia, ve srovnání se skupinou, u které choroba zprogredovala později. Zjistili jsme, že pokud byla polovina nebo více než polovina aplikací chemoterapie doprovázena podáváním lithia (7 dnů, 1000mg/D), bylo u dané skupiny pacientů dosaženo horšího léčebného výsledku v podobě kratšího času dogrese choroby, a to i přesto, že tato skupina pacientů obdržela vyšší RDI chemoterapie. Tento výsledek byl statisticky významný ($p=0,0061$), přičemž k analýze početného malého souboru jsme použili Fisherův exaktní test. Výsledek zobrazuje graf č. 3.



Graf 3.

Diskuze

Zjistili jsme, že v období let 2003 - 2004 bylo v MOU v souvislosti s CIN nejméně jednou aplikováno lithium u 648 pacientů. Tento relativně vysoký počet svědčí o stále popularitě podávání lithia za účelem stimulace hematopoézy. Na základě empirických zkušeností s použitím lithia v podpůrné péči u onkologických pacientů a na základě literárních údajů dokazujících inhibiční účinek lithia na apoptózu a stimulační vliv na buněčnou proliferaci, jsme provedli klinicko-experimentální studii, která měla odpovědět na dvě základní otázky. Stimuluje lithium hematopoézu? Ovlivňuje lithium chemorezistenci nádorových buněk?

Abychom zodpověděli první otázku, analyzovali jsme výsledky krevních obrazů u 106 pacientů, kterým bylo podáváno lithium jednotným způsobem, a tyto výsledky jsme porovnali s kontrolní skupinou, kterou tvořili buď pacienti bez podpůrné léčby, nebo s aplikací RFM (G-CSF). Odpovědět na druhou otázku bylo složitější. Za tímto účelem jsme in-vitro testovali chemorezistenci 53 primárních tumorů a retrospektivně analyzovali klinická data o vývoji choroby u pacientů, kterým bylo lithium podáváno.

Statistické zpracování výsledků krevních obrazů neprokázalo stimulační účinek lithia na žádnou z buněčných krevních řad. V případech celkového počtu leukocytů a neutrofilů bylo dosaženo vyšší hodnoty mediánu ve skupině po aplikaci lithia ve srovnání s kontrolní skupinou, což po praktické stránce častěji umožnilo pokračovat v aplikaci chemoterapie bez jejího přerušení nebo redukce dávky, výsledky však nebyly statisticky

signifikantní. V literatuře jsme bohužel nenašli žádnou studii, která by se počtem analyzovaných párových vyšetření krevních obrazů a především svým metodickým řešením mohla srovnávat s naší prací. Počtem pacientů byla blízká práce tajvanských autorů z roku 1989, která srovnávala 69 pacientů, jimž bylo aplikováno lithium ke kompenzaci CIN vzniklé v průběhu chemoterapie nebo chemoradioterapie, s kontrolní skupinou 42 pacientů. Autoři v publikaci pouze konstatovali, že 79% pacientů ve skupině s lithiem dosáhlo hladiny leukocytů $\geq 3,0 \times 10^9/l$ za 5 dnů, mezi tím co pro 100% pacientů v kontrolní skupině bylo zapotřebí 11,8 dne k dosažení této hranice (5). Ostatní práce nedosahovaly srovnatelného počtu pacientů a analyzovaných vyšetření krevního obrazu, nebo byly realizovány u psychiatrických pacientů. Jako příklad uvádíme práci publikovanou v NEJM v roce 1980. Na souboru pacientů s malobuněčným plicním karcinomem autoři sice dosáhli statisticky významných výsledků, ale do studie bylo zařazeno pouze 25 pacientů užívajících lithium a 20 pacientů v kontrolní skupině (3). Podobné počty uváděly i práce analyzující vliv lithia na celkový počet leukocytů u psychiatrických pacientů (15).

Pokud bychom i přesto chtěli hledat možné příčiny, jenž mohly oslabit náš výsledek, nalézáme je zejména v rozdílném stupni myelotoxicity u podávaných chemoterapeutických režimů, v nejednotnosti časového intervalu mezi zahájením aplikace chemoterapie a prvním odběrem krevního obrazu a v odlišných sérových hladinách lithia v jednotlivých případech. Rozdílný myelotoxický potenciál aplikovaných chemoterapeutických režimů jsme částečně ošetřili normalizací testovacího souboru na základě distribuce vstupních hodnot kontrolního souboru. Ve druhém případě jsme předpokládali, že různý interval k provedení kontroly krevního obrazu byl lékárem zvolen právě na základě znalosti rizika myelotoxicity, a tedy i doby pravděpodobného vzniku neutropenie u jednotlivých chemoterapeutických režimů. V případě sérových hladin lithia musíme poznamenat, že většina námi nalezených publikací neprokázala žádný kvantitativní vztah mezi sérovou hladinou lithia a počtem leukocytů nebo lymfocytů. Dvě práce konstatovaly, že leukocytóza nebo granulocytóza byla pozorována pouze u pacientů se sérovou koncentrací lithia vyšší než 0,55 respektive 0,59 mmol/l, přičemž regresní vztah mezi koncentrací lithia a počtem leukocytů nebo neutrofilů ani v jedné z těchto prací nebyl prokázán (5,16).

Naproti tomu experimentální část naší studie přinesla naprosto jednoznačné výsledky, které potvrdily hypotézu, že lithium je schopno inhibovat apoptózu i u primárních nádorových buněk, a tak zvyšovat jejich odolnost vůči cytostatikům. Prokázali jsme enormní nárůst chemorezistence vůči doxorubicinu a paklitaxelu u primárních tumorů vystavených působení lithia. Zjistili jsme rovněž, že protektivní účinek lithia se neuplatnil v případě alkylačních cytostatik a byl slabší při použití lithia o menší koncentraci. Vysvětlení prvního jevu spočívá zřejmě v odlišném mechanismu působení a chemorezistence alkylačních cytostatik. Rezistence k alkylačním látkám je ovlivněna zejména funkčním stavem reparačních procesů buňky, kde důležitou roli hrají endonukleázy a ligázy. Z dalších faktorů se uplatňuje intracelulární koncentrace proteinů schopných vázat alkylační látky a transportní mechanismy a vlastnosti jednotlivých alkylačních látek (17). Právě poslední dva faktory nás vedly k tomu, abychom testovali dvě odlišná cytostatika působící alkylačním mechanismem, cisplatinu a melfalan. Nejsilnější protektivní účinek lithia se naopak uplatnil vůči doxorubicinu, což opět odpovídá mechanismu jeho působení a vzniku chemorezistence. Doxorubicin způsobuje interkalaci DNA, inhibuje topoizomerasu I a II, dává vznik volným radikálům a aktivuje kaspázy (18). Stejně tak i paklitaxel kromě inhibice depolymerizace indukuje

apoptózu i dalšími mechanismy, jako například inhibicí exprese onkogenu bcl-2 (19). A právě v těchto procesech je řada styčných míst pro antiapoptotické působení AKT kinázy, kterou lithium stimuluje.

K vysvětlení druhého jevu musíme poznamenat, že vzniklý výsledek mohl být ovlivněn počtem MTT testů provedených s lithiem o koncentraci 2mM, kterých bylo o dvě třetiny méně, než s koncentrací 10mM. Navíc stimulační vliv lithia na chemorezistenci nádorů potvrdila i naše retrospektivní klinická studie, která hodnotila výsledky první linie protinádorové léčby u pacientů, kterým bylo v průběhu chemoterapie aplikováno lithium.

V běžné klinické praxi sice nepředpokládáme, že bychom překročili terapeutickou sérovou koncentraci lithia, která dosahuje maximálně hodnoty 1,5 mmol/l. K jejímu vzestupu až o 50% může ale dojít snadno, například při poklesu renálních funkcí. To potvrzuje i klinická praxe, kdy narušení pitného režimu a následující dehydratace pacienta jsou spojeny se vznikem nežádoucích účinků lithia. Rovněž není jasné, jaká je intratumorózní hladina lithia. Do retrospektivní klinické studie byli záměrně vybráni pacienti se vzdálenostně metastazovaným onemocněním, aby bylo možné vyhodnotit čas do progresu. Tento základní parametr efektivity léčby podle našeho názoru nejvíce odráží účinky lithia na nádor. Požadavek první linie paliativní chemoterapie jsme vznesli proto, že vyšší předléčebnost obecně souvisí s indukcí chemorezistence a s horší odpovědí nádoru na další léčbu. Logicky jsme vyřadili pacienty, kteří byli léčeni pouze alkylačním cytostatikem. Zjistili jsme, že pokud byla polovina nebo více než polovina aplikací chemoterapie doprovázena podáváním lithia, bylo u dané skupiny pacientů dosaženo horšího léčebného výsledku v podobě kratšího času do progresu choroby. I přesto, že uvedený výsledek byl statisticky významný, opět musíme podotknout, že analýza probíhala na relativně nízkém počtu pacientů. Jednoznačnou odpověď o vlivu lithia na vývoj nádorového onemocnění by mohla přinést prospektivní klinická studie. Její provedení by ale na základě všech dosud uvedených poznatků bylo neetické.

Závěr

Užívání lithia k profylaxi a k léčbě chemoterapií navozené myelotoxicity není opodstatněné a je spjata s rizikem indukce chemorezistence nádoru.

Zkratky

AKT/PKB – AKT kináza nebo RAC serin/threonin protein kináza nebo protein kináza B (OMIM 164730), **G-CSF** - granulocyte colony stimulating factor (růstový faktor pro kolonie granulocytů), **GM-CSF** - granulocyte-macrophage colony stimulating factor (růstový faktor pro kolonie granulocytů a makrofágů), **GSK3 β** - glykogen syntázy kináza – 3 beta (OMIM 605004), **MOU** – Masarykův onkologický ústav v Brně, **MTT** - 3-4,5-dimethylazol-2-yl-2,5-diphenyl tetrazolium, **PI3K** – fosfatidylinositol-3-kináza (OMIM 171834).

Autoři děkují za pomoc při řešení projektu administrativním pracovníkům Masarykova onkologického ústavu: E. Čechmanová, I. Kazepkové a S. Keclíkové. Rovněž děkujeme lékařům Kliniky komplexní onkologické péče a Gynekologického oddělení Masarykova onkologického ústavu, jejichž činnost v letech 2002 a 2003 přispěla ke vzniku našeho projektu.

Projekt byl podpořen Českou onkologickou společností ČLS JEP, finančními prostředky z Běhu Terryho Foxe uspořádaného v České republice v roce 2004 a částečně i z grantového projektu IGA MZ ČR – NR/8335-3 a vědeckého záměru MSM6198959216.

Literatura

1. Kuderer NM, Crawford J, Dale DC, et al. Adult cancer patients hospitalized with febrile neutropenia: risk stratification based on an analysis of the university health system consortium discharge database [abstract]. Support Care Cancer. 2004b;12(6):383 Abstract A-57.
2. Bonadonna G, Valagussa P, Moliterni A, et al. Adjuvant cyclophosphamide, methotrexate, and fluorouracil in node-positive breast cancer: the results of 20 years of follow-up. N Engl J Med. 1995;332(14):901-906.
3. Lyman GH, Williams CC, Preston D. The use of lithium carbonate to reduce infection and leukopenia during systemic chemotherapy. N Engl J Med. 1980;302(5):257-60.
4. Ballin A, Lehman D, Sirota P, et al. Increased number of peripheral blood CD34+ cells in lithium-treated patients. Br J Haematol. 1998;100(1):219-21.
5. Chang KH, Tan R, Chung CH. The use of lithium carbonate to correct leukopenia during cancer treatment. Zhonghua Yi Xue Za Zhi (Taipei). 1989;43(3):165-70.
6. Quiroz JA, Gould TD, Manji HK. Molecular effects of lithium. Mol Interv. 2004 Oct;4(5):259-72.
7. De Sarno P, Li X, Jope RS. Regulation of Akt and glycogen synthase kinase-3beta phosphorylation by sodium valproate and lithium. Neuropharmacology 2002;43(7):1158-64
8. Chalecka-Franaszek E, Chuang DM. Lithium activates the serine/threonine kinase Akt-1 and suppresses glutamate-induced inhibition of Akt-1 activity in neurons PNAS 1999;96: 8745-8750.
9. Strunecká A, Patočka J. Lithium a Alzheimerova choroba. Psychiatrie. 2004; Roč. 8, č.1, str. 13-16.
10. Lawlor MA, Alessi DR. PKB/Akt: a key mediator of cell proliferation, survival and insulin responses? J Cell Sci. 2001;114(Pt 16):2903-10.
11. Tsurutani J, West KA, Sanyal J, Gills JJ, Dennis PA. Inhibition of the phosphatidylinositol 3-kinase/Akt/mammalian target of rapamycin pathway but not the MEK/ERK pathway attenuates laminin-mediated small cell lung cancer cellular survival and resistance to imatinib mesylate or chemotherapy. Cancer Res. 2005;65(18):8423-32.
12. Dancey JE. Inhibitors of the mammalian target of rapamycin. Expert Opin Investig Drugs. 2005;14(3):313-28.
13. Svoboda M. Lithium a jeho účinek na hematopoézu a nádorové buňky. Klinická onkologie (v tisku).
14. Kolektiv autorů. Diagnostika a léčba vybraných maligních nádorových onemocnění. Vydal: Masarykův onkologický ústav, 2005, ISBN: 80-86793-04-4.
15. Lapiere G, Stewart RB. Lithium carbonate and leukocytosis. Am J Hosp Pharm. 1980;37(11):1525-8.
16. Stein RS, Howard CA, Brennan M, Czorniak M. Lithium carbonate and granulocyte production: dose optimization. Cancer. 1981;48(12):2697-701.
17. Colvin DM, Alkylating Agents and Platinum Antitumor Compounds. In: Cancer Medicine, Fifth Edition, B.C.Decker, Hamilton, Canada, 2000, pp 648-670.
18. Rubin EH, Hait WN, Anthracyclines and DNA Intercalators / Epipodophyllotoxins / DNA Topoisomerases In: Cancer Medicine, Fifth Edition, B.C.Decker, Hamilton, Canada, 2000, pp 670-680.
19. Beck WT, Cass CE, Houghton PJ, Microtubule-Targeting Anticancer Drugs Derived from Plants and Microbes: *Vinca* Alkaloids, Taxanes, and Etoposides In: Cancer Medicine, Fifth Edition, B.C.Decker, Hamilton, Canada, 2000, pp 680-699.

Došlo:28.3.2006

Přijato:20.4.2006