

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, proliferční 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 ke 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 iniciační 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 v časných stádiích 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 problémy

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, Pačový 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.