

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

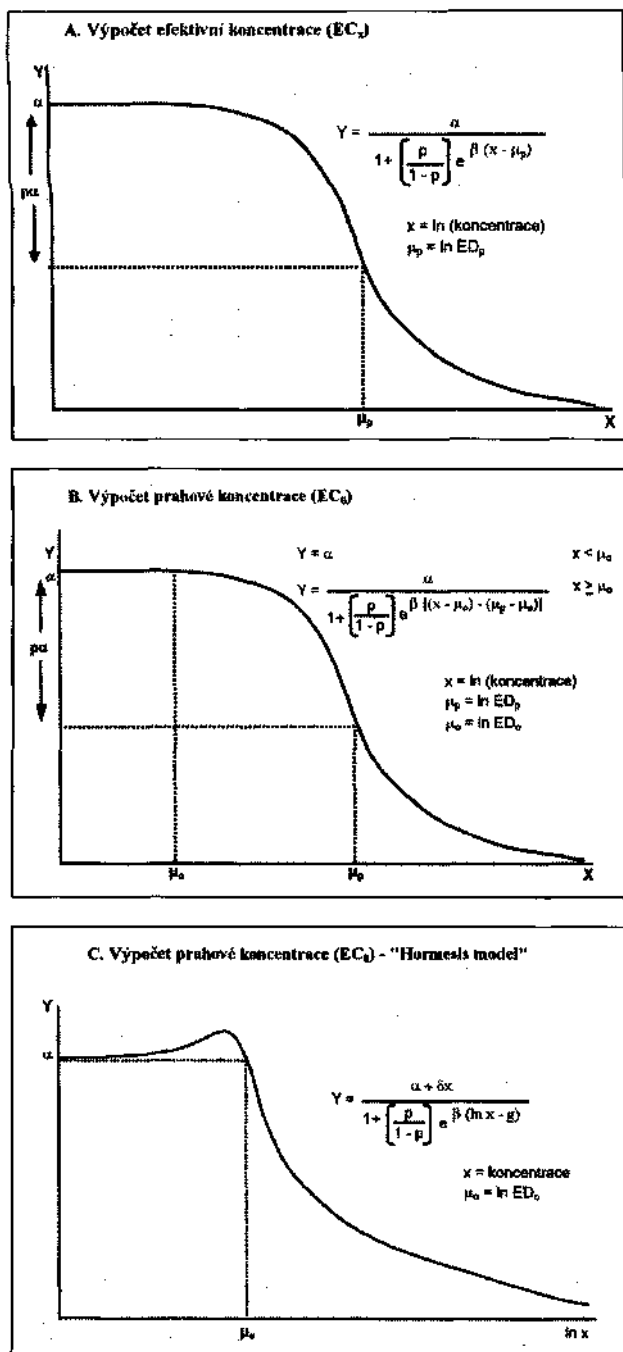
výzkumem lze kromě testů chemorezistence nádorů *in vitro* vymezit především testy karcinogeneze a mutagenese různých chemických látek, jejichž hodnocení kvalitativně zcela koresponduje s analýzami růstových testů a testů toxicity (19). V oblasti testů chemorezistence byly základy typologie křivek dávka - 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 EC₅₀. Hlavní výhody tohoto standardu - tedy podchycení typů křivek a validovatelný odhad jasně interpreovatelných parametrů - jsou zobecnitelné pro jakoukoli vědní disciplínu. Hodnoty EC₅₀ 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 EC₅₀:

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

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 EC₅₀ (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 EC₅₀ jako

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

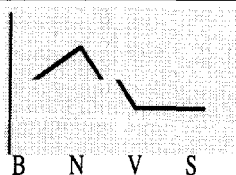
Jelikož je definičně dáno F_z + F_N = 1, pak lze rovnici 1 převést do následujících tvarů,

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

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

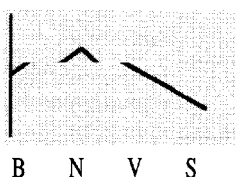
kteří mohou být užitečné pro dílčí modelové odhady z křivky dávka - odpověď. Především rovnice [5] je účinným nástrojem pro odhad jakýchkoli hodnot EC_x na základě znalosti EC₅₀ a exponentu m.

Typ I



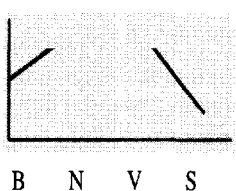
První typ křivky dávka – odpověď. Hormesis model. Nízké dávky způsobují pozitivní účinek (stimulaci), vyšší dávky pak účinek negativní, vysoké dávky, stejně jako saturovaná dávka způsobují inhibici určitého rozsahu. V ekotoxikologii a toxikologii lze křivku organismu, vysoké dávky naopak inhibují. Systém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

Typ II



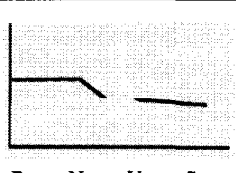
Druhý typ křivky je podobný typu I. Je však zřejmé, že inhibice ve vyšších dávkách není tak silná jako u typu I. Toxikologická interpretace uvažuje o mírném přizpůsobení orga-

Typ III



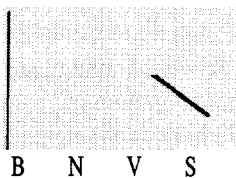
Třetí typ křivky. Pozitivní ovlivnění v nízkých i vysokých dávkách. Pokud posuzujeme zaznamenává toxický účinek až při saturované (nejvyšší) dávce. Rovněž ovšem může jít o špatně zvolený design testu – tedy volbu příliš nízkých koncentrací toxické látky.

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



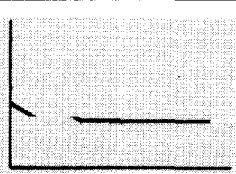
Pátý typ křivky dávka – odpověď. Tato křivka charakterizuje reakci velmi málo citlivého biologického systému.

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 příliš vysoké dávky. 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	Imortalizované 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). Rovnice a odvozené diagnostické grafy (přímkové závislosti rovnice [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

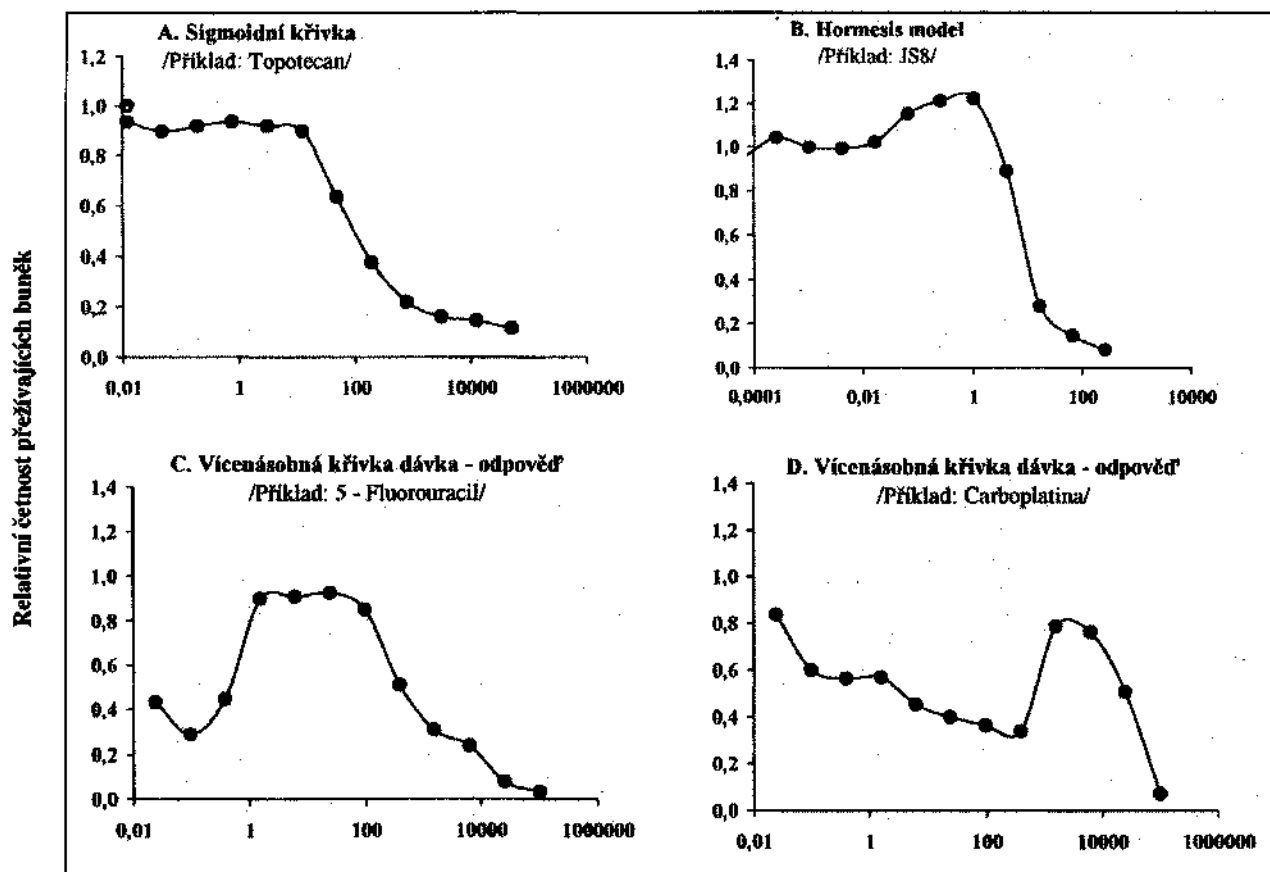
Přehled nádorových linií, u kterých byla aplikovatelnost rovnice

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 spojovat 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

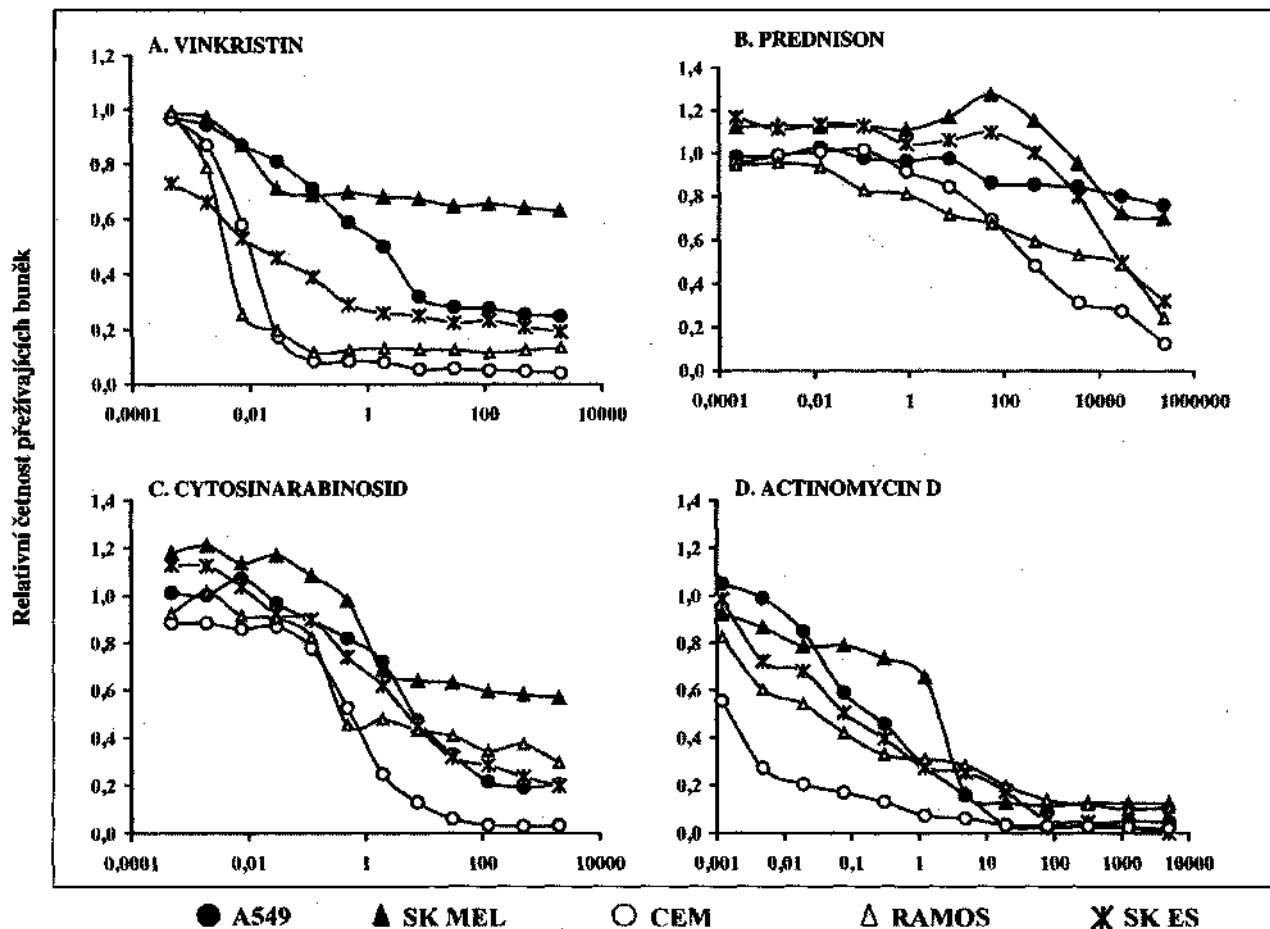
Tabulka 3. Minimální doporučená sada parametrů a jejich příspěvek k rozlišení modelových typů křivek dávka-odpověď

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 modelovou regresí (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

Modelová analýza křivek MTT pomocí rovnice mediánového účinku

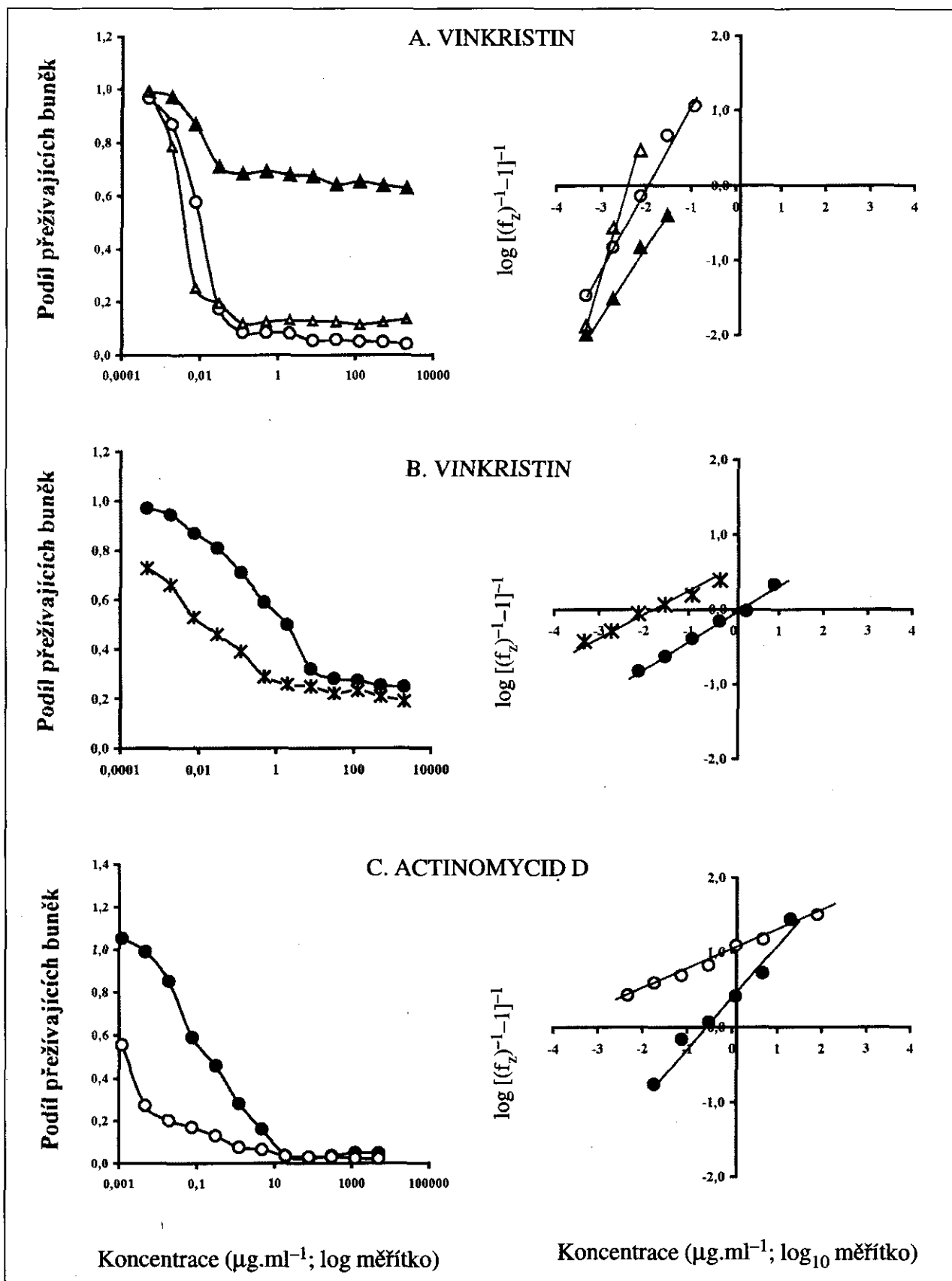
Rovnice mediánového účinku představuje velmi efektivní metodu jednotné analýzy všech pozorovaných typů křivek. Obrázek 4

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

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, Antálek 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.