

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., ¹⁸JANOŠTÁKOVÁ 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 mediciny 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, chemosensitivita, 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

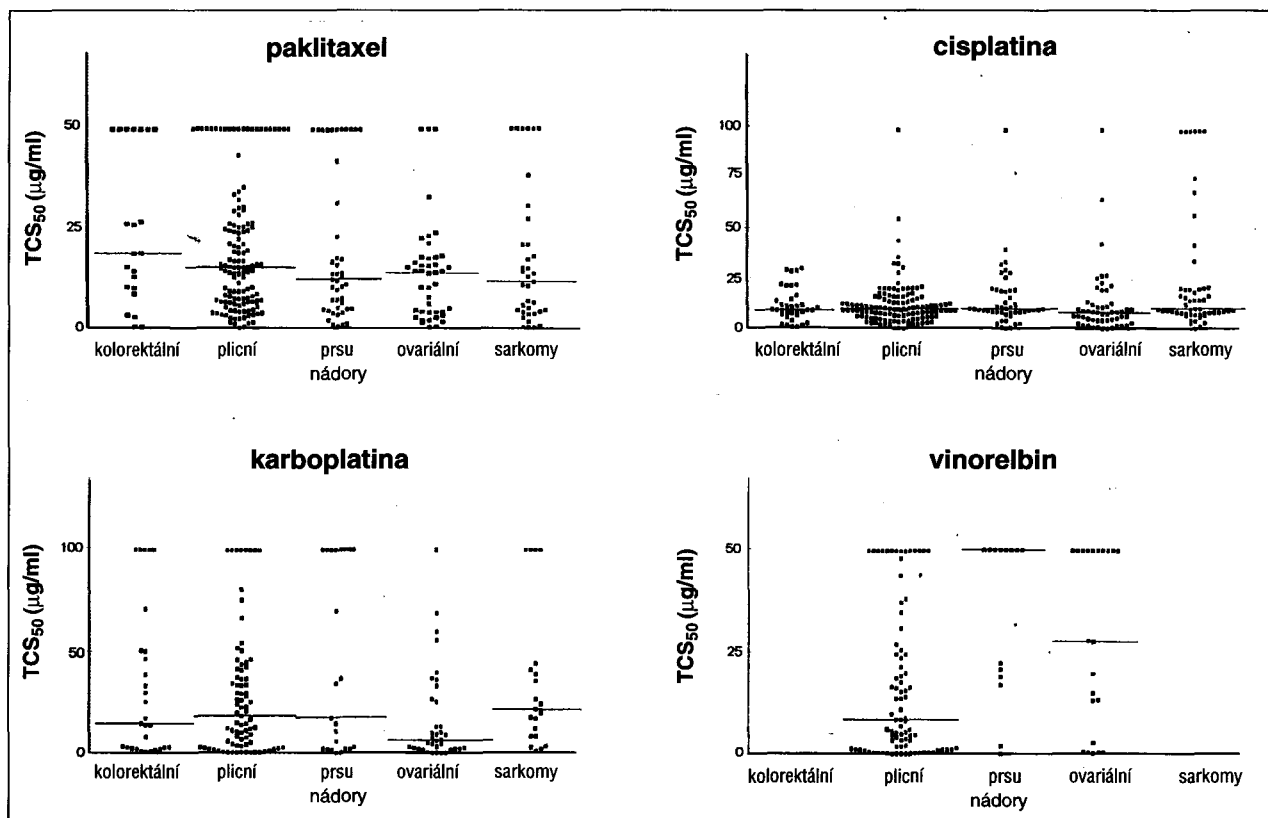
Tisíc sedm set patientských vzorků z různých částí České republiky bylo dovezeno a testováno v naší laboratoři. Kostní dřeň, periferní krev nebo nádorové tkáně byly přivezeny v transportním médiu během osmi hodin po biopsii. Všechny vzorky byly testovány jako čerstvé nádory. Histopatologické diagnózy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

MTT test

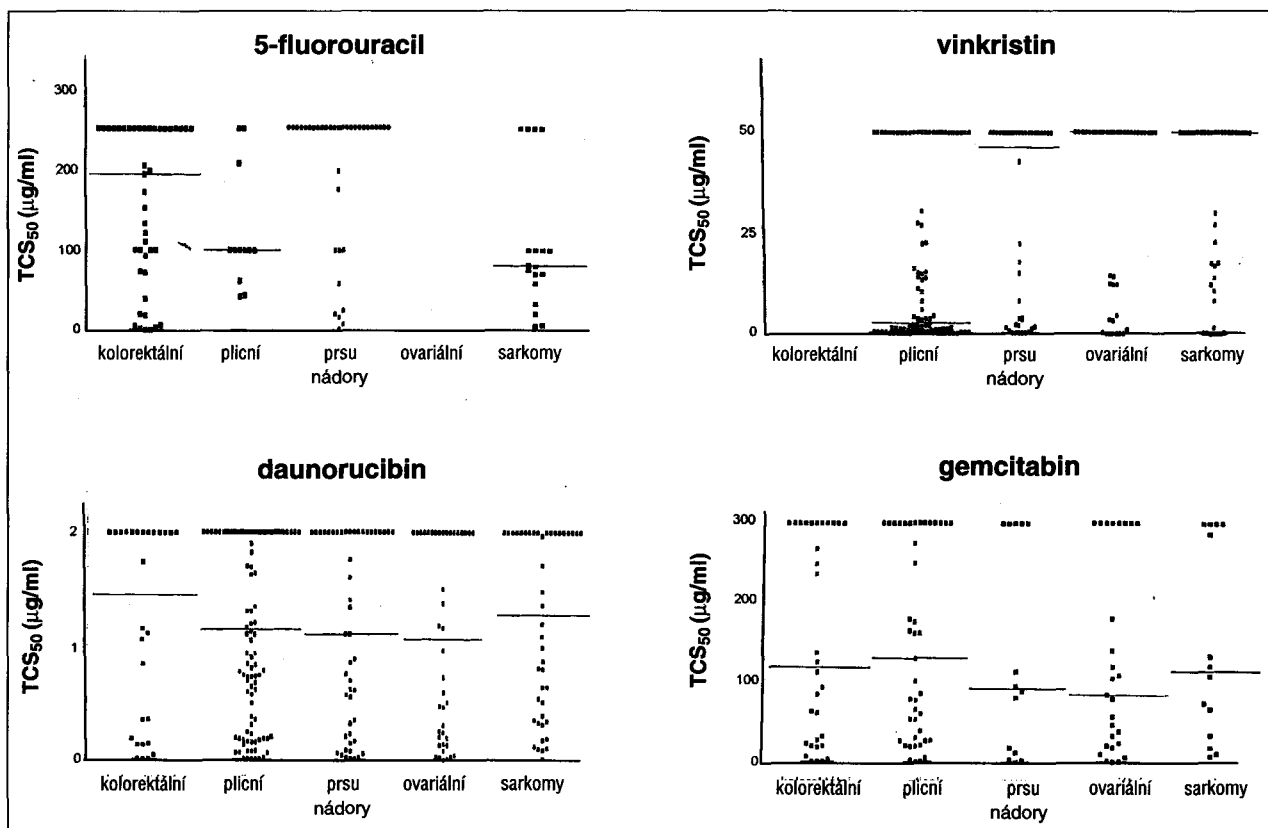
K analýze *in vitro* senzitivity nádorových buněk na cytostatika byl použit řídící MTT test. Suspenze vitálních nádorových buněk byla získána z dodaných vzorků použitím enzymatického trávení a gradientovou centrifugací na hustotním gradientu Ficoll-Meta-trizoát (1,077 g/ml; Pharmacia, Švédsko). Buňky 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 hodnota je 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) TCS_{50} pro paklitaxel, cisplatinu, karboplatinu a vinorelbin u pacientů s uvedenými nádorovými diagnózami.



Obrázek 2: Individuální hodnoty (čtverečky) a jejich mediány (plná čára) TCS_{50} 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 nestanoveno 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 protinádorové 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