

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

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

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

UNIVERZITNÍ ONKOLOGICKÉ ČENTRUM BRNO - MASARYKŮV ONKOLOGICKÝ ÚSTAV, ODDĚLENÍ KLINICKÉ ONKOLOGIE FN, CHIRURGICKÁ KLINIKA FN, I. ORTOPEDIČKÁ KLINIKA FN U SVATÉ ANNY, LABORATOŘ EXPERIMENTÁLNÍ MEDICÍNY FN OLOMOUC

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

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

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

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

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

Úvod

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

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

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

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

Chemorazistence bronchogenních karcinomů

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

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

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

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

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

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

Chemorezistence kolorektálního karcinomu

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

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

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

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

Chemorezistence sarkomů měkkých tkání

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

Závěr

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

(Práce byla podpořena grantem MŠMTNo. J07/98141100003)

Literatura:

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