

# VYUŽITÍ IN VITRO ANALÝZY LÉKOVÉ REZISTENCE V LÉČBĚ LEUKÉMIÍ DĚTSKÉHO VĚKU

## APPLICATION OF IN VITRO OF DRUG RESISTANCE ASSAYS IN TREATMENT OF CHILDHOOD LEUKEMIA

† MIHÁL V., HAJDÚCH H., JANOŠŤAKOVÁ A., ŠAFÁŘOVÁ M., NOSKOVÁ V., POSPÍŠILOVÁ D., NOVÁK Z.  
LABORATOŘ EXPERIMENTÁLNÍ MEDICINY A DĚTSKÁ KLINIKA LFUP A FN OLOMOUC

† korespondující autor: Dětská klinika LF UP a FN Olomouc, Puškinova 6, 775 20 Olomouc

Souhrn: Autoři se snaží shrnout profil *in vitro* rezistence, který byl stanovován pomocí kolorimetrického methyl-thiazol-tetrazoliového (MTT) testu u různých podskupin akutních dětských leukémií a jeho význam pro klinickou praxi.

Klíčová slova: *in vitro* léková rezistence, MTT test, akutní lymfoblastická leukémie, akutní myeloidní leukémie

Summary: The authors try to summarize the *in vitro* resistance profile, measured with the colorimetric methyl-thiazol-tetrazolium (MTT) assay in different subgroups of acute childhood leukemias and its significance for clinical practice.

Keywords: *in vitro* drug resistance, MTT assay, acute lymphoblastic leukemia, acute myeloid leukemia

Díky vývoji účinné kombinace cytostatik se prognóza dětí s leukémií dramaticky zlepšila. Nicméně asi 30% dětí s ALL a 50% dětí s AML umírá na rezistentní nemoc (1). Na druhé straně, pacienti, jejichž nemoc je léčitelná relativně mírnou chemoterapií, podstupují dnes zbytečně intenzivní cytostatickou léčbu, která je obvykle příčinou závažných nežádoucích vedlejších účinků. Je pravdou, že s postupně se zvyšující intenzitou chemoterapie došlo u dětí s akutní leukémií k významnému zlepšení celkových léčebných výsledků. Vzhledem k těmto skutečnostem je identifikace stupně vnímavosti na léčbu považována za jeden z nejdůležitějších faktorů účinné stratifikace. Z těchto důvodů je úsilí řady pracovišť zabývajících se problematikou dětské leukémie směřováno k optimalizaci léčebných protokolů s cílem zabránit vzniku mnohočetné lékové rezistence, k hledání nových diagnostických a prognostických markerů onemocnění, které umožní individualizaci léčby pro jednotlivé pacienty. Pacienti s chemosenzitivním typem leukémie budou výhledově léčeni s minimálně toxickou terapií na rozdíl od pacientů s rezistencí na cytostatika, kteří podstoupí velmi agresivní léčbu.

Po zavedení rychlého kolorimetrického MTT testu (2) na stanovení životnosti a růstových charakteristik buněk *in vitro*, bylo na našem pracovišti vyšetřeno velké množství vzorků kostní dřeně nebo periferní krve od dětí v iniciální fázi nebo v relapsu onemocnění. Byla zorganizována celorepubliková síť dětských onkohematologických pracovišť, odesílajících vzorky od pacientů s akutní leukémií na vyšetření chemorezistence. Vyšetření bylo úspěšně provedeno ve > 75% případů. Procento úspěšnosti provedení MTT testu je srovnatelné s výsledky spolupracujících laboratoří ve Free University Hospital v Amsterdamu. V první fázi experimentální práce jsme otestovali koncentrační rozpětí pro jednotlivá cytostatika a zavedli vyhodnocování MTT testu pomocí originálně vytvořeného počítačového programu. Ve druhé etapě jsme společně s kolegy z jiných evropských pracovišť publikovali výsledky testování chemorezistence dětských pacientů s ALL v iniciální fázi onemocnění a v relapsu. Demonstrovali jsme mnohonásobné zvýšení rezistence leukemických buněk v relapsu onemocnění ve srovnání s iniciální hodnotou (4), u pacientů s různým typem nádorů se špatnou léčitelností jsme prokázali vysokou rezistenci na širokou škálu běžně užívaných cytostatik (16) a u dětských pacientů s ALL, léčených protokolem ALL-BFM 90, jsme analyzovali korelaci některých klinických a laboratorních znaků s lékovou rezistencí (15). Na případu vzácné leukémie z kmenových buněk jsme potvrdili „fenotypickou specifitu profilu rezistence“ v různých fázích (myeloidní/lymfoidní) onemocnění (14). I když bylo prokázáno, že *in vitro* rezistence nádorové populace na cytostatika zjištěna MTT testem vykazuje vysokou korelaci s klinickou odpovědí nemocných, v klinické praxi se tento postup začíná uplatňovat až v posledních letech (3, 5). Nedávno byly prokázány některé významné asociace mezi lékovou rezistencí a klinickými/laboratorními znaky leukémie, které se již postupně začínají klinicky využívat. Některé významné asociace mezi fenotypem nemoci a stupněm chemorezistence nádorové buňky jsou postupně inkorporovány do nových léčebných protokolů, které zřejmě povedou k vyššímu léčebnému úspěchu. Na nejvýznamnější objevy z oblasti lékové rezistence dětských hemoblastóz s praktickým využitím chceme upozornit v následujícím krátkém přehledu.

**Akutní lymfoblastická leukémie kojenců** je charakterizována špatnou prognózou a vysokou incidencí nezralé CD 10 negativní ALL (proB ALL). Pieters a spol. (6) analyzovali použitím MTT testu profil *in vitro* lékové rezistence u 395 kojenců s ALL v iniciální fázi nemoci. Testovali celkem 13 cytostatik: prednizon, dexametazon, daunorubicin, doxorubicin, mitoxantron, idarubicin, vinkristin, L-asparaginázu, 6-MP, 6-TG, cytarabin, VM-26 a 4-HOO-ifosfamid. Děti < 1,5 roku byly významně rezistentnější na prednizon (>500x), L-asparaginázu (11x), VM-26 (2,7x), ale signifikantně citlivější na cytarabin (2,3x). U kojenců ve věku < 1 rok autoři prokázali stejný profil lékové rezistence a na základě svých výsledků potvrdili, že nepříznivá prognóza kojenecké ALL je asociována s rezistencí na glukokortikoidy a L-asparaginázu. Vysoká *in vitro* senzitivita na cytarabin byla nedávno potvrzena a léčebně využita zařazením vysoce dávkovaného cytarabinu a methotrexátu do nových protokolů pro dospělé pacienty s ALL s MLL přestavbou (MLL-AF4 fúzního genu, který vzniká jako důsledek t(4;11)). Jelikož přestavba MLL genu (11q23) je značně frekventní u kojenecké leukémie, velmi vysoká senzitivita leukemických buněk k cytarabinu, která byla potvrzena se statistickou významností v *in vitro* testech s jediným cytostatikem, se již začíná využívat při konstrukci nových léčebných protokolů pro tuto věkovou skupinu (např. Interfant 99 pro léčbu kojenecké leukémie, R. Pieters).

**Akutní lymfoblastická leukémie dětí s hyperdiploidním počtem chromozomů >50** (DNA index >1,16) je dobře rozpoznanou genetickou variantou, která je asociována s typickým fenotypem (B prekurzorová ALL), nízkým počtem leukocytů, věkem mezi 1. až 9. rokem a velmi dobrou prognózou. Velmi dobrá prognóza hyperdiploidní ALL zůstala dlouho bez vysvětlení. Na vzorcích kostní dřeně od 16 dětí s ALL (CD 10+) s hyperdiploidním počtem chromozomů prokázali Kaspers a spol. (7) jejich vysokou citlivost k merkaptopurinu ( $p=0.000003$ ), 6-TG ( $p=0.023$ ) a L-asparagináze ( $p=0.022$ ) v porovnání s nádorovými buňkami získanými od dětských pacientů bez hyperdiploidie. Autoři nepozorovali statisticky významný rozdíl v *in vitro* senzitivitě k prednizonu, dexametazonu, vinkristinu, daunorubicinu, doxorubicinu, mitoxantronu a vepesidu. Procento buněk v S-fázi bylo vyšší ( $p=0.05$ ) v hyperdiploidních ALL vzorcích (medián, 8,5%) než v nonhyperdiploidních (medián, 5,7%). Signifikantně vyšší senzitivita leukemických buněk s hyperdiploidii k antimetabolitům a L-asparagináze je kromě recentně popsaného membránového proteinu (reduced folate carrier, RFC), kterým methotrexát aktivně vstupuje do buňky (schopnost akumulovat aktivní polyglutamovaný metabolit MTX) a RFC gen, jenž je lokalizován na 21. chromozomu, možným vysvětlením velmi dobré prognózy pro tuto skupinu dětských pacientů (17). U dětí s hyperdiploidní ALL jsou často amplifikovány chromozomy 4, 6, 10 a 21 (21. chromozom až u >75% případů hyperdiploidie). Geny, které kódují enzymy zahrnuté do vnitrobuněčného metabolismu antimetabolitů jsou lokalizovány právě na těchto chromozomech. Tato zjištění dovolují dnes objasnit zvýšenou toxicitu některých cytostatik (MTX, cytarabin a daunorubicin), jejichž metabolismus je přímo závislý na amplifikaci řídicích genů u pacientů s Downovým syndromem (trisomie 21. chromozomu). Kromě již uvedeného RFC proteinu, který je loka-

lizován na 21. chromozómu (21q22.1-22.3) jsou zde umístěny i další geny, které ovlivňují metabolismus tvorby toxických kyslíkových radikálů (gen pro karbonyl-reduktázu (CBR), která katalyzuje redukci daunorubicinu na daunorubicinol a gen pro superoxid-dismutázu (SOD).

Nicméně, asi 20% pacientů s hyperdiploidíí >50 je postiženo relapsem onemocnění i navzdory efektivnosti současné léčby. Faktory, které zodpovídají za nedobrou prognózu mezi pacienty s hyperdiploidíí >50 jsou přítomnost isochromozómu 17q, ztráta trisomie obou chromozomů 4 a 10, zvýšené přežívání leukemických buněk v kulturním médiu obohaceném o stromální faktory (buňky) a menší modální počet chromozomů (51-55 chromozomů). Všechny uvedené asociace ale ještě musí být potvrzeny v dalších studiích.

**Akutní myeloidní leukémie (AML) u dětí** má neporovnatelně horší prognózu než ALL. Léková rezistence je významným limitujícím faktorem úspěšnosti chemoterapie AML u dětí. Současná kombinace chemoterapie je schopna navodit dlouhodobou remisi pouze u 30 až 50% dětí. Asi 20% dětí s AML ji po indukční léčbě nedosáhne; ze zbylých dětí postihne 40-60% relaps. Schopnost nádorových buněk odolávat účinkům cytotoxických látek je jednou z nejdůležitějších příčin selhání chemoterapie u AML. Klumper a spol. (8) použitím kolorimetrického MTT testu u 62 dětí s AML stanovili *in vitro* chemosenzitivitu k daunorubicinu, doxorubicinu, mitoxantronu, 6-TG, etoposidu a cytarabinu. *In vitro* chemosenzitivita nekorelovala se žádným klinickým znakem (věk, pohlaví, počet blastů, FAB klasifikace). Ve skupině dětí se špatnou odpovědí na indukční chemoterapii byl medián *in vitro* rezistence na cytarabin třikrát vyšší než ve skupině s dobrou odpovědí na léčbu. I když tyto výsledky svědčí o významné roli lékové rezistence v léčebném selhání dětské AML, prokázání prediktivní hodnoty zvýšené vnímavosti na cytarabin bude nutné ještě potvrdit.

***In vitro* léková rezistence jako prediktivní faktor odpovědi na chemoterapii.** Ačkoliv byla *in vitro* analýza lékové rezistence použita pro screening nových cytostatik, přetrvává neochota využít výsledků MTT testu při selekci pacientů pro zkoušky fáze II nebo pro adjuvantní chemoterapii, racionální zlepšení současných, ve většině případů empiricky odvozených léčebných režimů, pro stratifikaci do rizikových skupin a pro individualizovanou chemoterapii. Vysvětlením může být malý počet srovnávacích studií, které mohly odpovědět na nezodpovězené otázky. Kaspers a spol. (9) studovali vztah mezi *in vitro* rezistencí k 12 léčivům, stanovenou použitím MTT testu a dlouhodobou klinickou odpovědí u 152 dětí s nově diagnostikovanou ALL. Pacienti byli rozděleni do tří rizikových skupin na základě *in vitro* rezistence k prednizonu, L-asparagináze a vinkristinu. Každá skupina pacientů statisticky významně ( $p < 0.01$ ) souvisela s pravděpodobností přežití bez známek nemoci (pDFS). Kombinace (suma) dat pro prednizon, L-asparaginázu a vinkristin umožnila sestavit tzv. profil lékové rezistence (pro každý druh cytostatika byla stanovena arbitrážní hodnota 1 pro „senzitivní hodnotu  $LC_{50}$ “, 2 pro „intermediární  $LC_{50}$ “ a 3 pro „rezistentní  $LC_{50}$ “). Pacienti s vysokou chemosenzitivitou na všechna tři cytostatika dosáhli skóre 3, na rozdíl od pacientů s vysokou rezistencí se skóre 9. Pravděpodobnost DFS ve 3 letech byla 100% pro skupinu s vysokou senzitivitou (20% pacientů), 84% pro skupinu s intermediální senzitivitou (40% pacientů) a 43% pro skupinu s rezistentní senzitivitou ( $p < 0.001$ ). Počet událostí (relapsů) v závislosti na skupině pacientů podle hodnoty  $LC_{50}$  (koncentrace cytostatika, která usmrtí 50% leukemických buněk) lékové rezistence je uvedena v Tab 1.

| Senzitivita | Vysoká |    | Intermediální |    | Nízká |    |    |
|-------------|--------|----|---------------|----|-------|----|----|
| Skóre       | 3      | 4  | 5             | 6  | 7     | 8  | 9  |
| Počet       | 5      | 18 | 20            | 27 | 23    | 13 | 12 |
| Událost     | 0      | 0  | 4             | 6  | 14    | 6  | 6  |
| Poměr (%)   | 0      | 0  | 20            | 22 | 61    | 46 | 50 |

Uvedený profil lékové rezistence, který byl sestaven jako suma rezistencí tří cytostatik, které mají dominantní postavení v indukční části léčebných protokolů pro ALL se ukázal (statisticky významně) jako vhodný faktor pro předpověď klinického (léčeb-

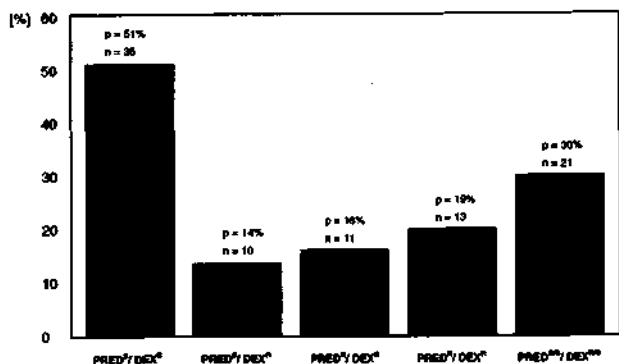
ného) výsledku. MTT test se tak jeví jako vhodný faktor pro stratifikaci pacientů do rizikových skupin. Výsledek MTT testu je k dispozici již za týden od získání leukemických buněk od pacienta a dovoluje případnou včasnou změnu léčby. Uvedené výsledky by mohly vyprovokovat další racionální studie, které snad povedou ke zvýšení účinnosti současných léčebných režimů.

**Akutní lymfoblastická leukémie s TEL-AMU (ETV6-CBFA2 fúze)** reprezentuje další prognosticky dobrou podskupinu ALL z prekurzorových B lymfocytů, tvořící 25% případů s tímto fenotypem a téměř 60% dětí s chromozomálními abnormalitami zahrnujícími oblast 12p (10). I když genetická leze vzniká důsledkem t(12;21), tuto translokaci použitím standardních cytogenetických metod nelze kvůli zřetelné podobnosti segmentů chromozomů zahrnutých do této přestavby detekovat. Jejich detekce vyžaduje použití fluorescenční *in situ* hybridizace (FISH), Southern blot analýzy nebo RT-PCR metody (11). Pacienti s touto přestavbou jsou charakterizováni příznivým věkem (1-9 let), nonhyperdiploidním karyotypem a zvýšenou frekvencí exprese asociovaných myeloidních antigenů (CD13 a CD33). Ramakers-van Woerden, N. L. a spol. (12) analyzovali *in vitro* rezistenci 180 dětských pacientů s ALL, ze kterých 51(28%) bylo pozitivních pro t(12;21). Medián *in vitro* hodnot  $LC_{50}$  pro jednotlivá cytostatika (prednizon, dexametazon, daunorubicin, thiopuriny, epipodofylotoxiny a 4-HOX-ifosfamid) se významně nelišil v obou skupinách dětských pacientů s TEL-AML1 pozitivitou a negativitou. Nicméně TEL-AML1 pozitivní pacienti byli relativně citlivější k L-asparagináze (5,9x;  $p = 0.029$ ) a nepatrně rezistentnější k vinkristinu (1,5x;  $p = 0.011$ ) a cytarabinu (1,5x;  $p = 0.014$ ). Po vytvoření skupiny dětí s TEL-AML1 negativitou, do které nebyli zařazeni pacienti s věkem <12 měsíců, CD10 negativní BCP-ALL (prekurzory z B lymfocytární linie), pozitivitou Ph chromozomu a s hyperdiploidíí >50 - jedinou zbylou významnou diferencí zůstala relativní senzitivita k L-asparagináze (10,8x;  $p = 0.012$ ). Autoři tím ve své práci prokázali, že přítomnost TEL-AML1 přestavby u dětské BCP-ALL není, s výjimkou L-asparaginázy, asociována s vyšší *in vitro* lékovou senzitivitou. Tyto závěry objasňují, proč u pacientů, kteří byli léčeni relativně intenzivnějšími léčebnými režimy (vyšší celková dávka L-asparaginázy) byly dosaženy významně lepší léčebné výsledky (např. DCSL GALL-VII protokol a protokoly St. Jude Childrens Research Hospital pro TEL-AML1 pozitivní ALL).

**Rozdílná *in vitro* antileukemická aktivita prednizonu a dexametazonu u dětí s akutní lymfoblastickou leukémií.**

Glukokortikoidy (GCs), které byly zavedeny do onkohematologické praxe již počátkem 50. let, jsou vysoce účinné látky v léčbě akutní lymfoblastické leukémie ačkoliv v monoterapii nevedou k dlouhodobému vyléčení. Mechanismus účinků spočívá v difúzi GCs přes cytoplazmatickou membránu a navázání se na cytoplazmatické receptory (GCRs). GCs-GCR komplex je přemístěn do jádra, kde se váže na DNA a aktivuje řadu GCs responsivních genů. U GCs senzitivních leukémií je hlavní buněčnou odpovědí indukce apoptózy, ačkoliv GCs ne vždy indukují buněčnou smrt a mohou uplatnit svoji biologickou aktivitu cestou indukce/represe exprese jiných genů a proteinů. Například dexametazon může snížit expresi *mdr* genů u rezistentních buněk a tak zvýšit jejich senzitivitu k chemoterapii. Bohužel významná část pacientů vykazuje primární či sekundární rezistenci na kortikoidy. Například 80% pacientů odpovídá na iniciální monoterapii kortikoidy, zatímco pouhých 35% odpovědí bylo zaznamenáno u dětí s relapsem ALL. Rozsah mechanismů rezistence na GCs byl popsán a zahrnuje *mdr1*zprostředkovaný eflux GCs s oběma 11- a 17-hydroxyl skupinami, aberantní GCRs, pozměněnou expresi heat shock proteinů: hsp90, hsp70 a jiné.

Z klinického hlediska je zásadně důležité předpovědět pacientovu odpověď na GCs. Existují dvě základní otázky, na které je nutné hledat odpověď: 1) zda každý jednotlivý pacient odpovídá na léčbu kortikoidem; 2) zda je u jednotlivého pacienta rozdílná odpověď na různé deriváty kortikoidů, např. prednizon (PRED) versus dexametazon (DEX). Za účelem predikce a následné stratifikace pacientů na respondery a nonrespondery na PRED v *in vivo* podmínkách vytvořila skupina Berlin-Frankfurt-Munster (BFM) pro dětskou leukémii „PRED okno... V podstatě jde o jednotodenní monoterapii PRED, kde hodnotou určující klinickou odpověď je redukce absolutního počtu blastů (ANB) v pacientově krvi pod



(PRED<sup>5</sup>/DEX<sup>5</sup>), senzitivních na PRED ale rezistentních na DEX (PRED<sup>5</sup>/DEX<sup>8</sup>), rezistentních na PRED ale senzitivních na DEX (PRED<sup>8</sup>/DEX<sup>5</sup>), pacientů rezistentních na PRED i DEX (PRED<sup>8</sup>/DEX<sup>8</sup>) a celkové procento dětí zahrnutých do studie s opačnou *in vitro* odpovědí na oba testované glukokortikoidy (PRED<sup>8</sup>/DEX<sup>5</sup>).

1000/mm<sup>3</sup> 8. den léčby. Celkový podíl odpovídajících pacientů byl 92%, většina nonresponderů byli chlapci, děti s vysokým počtem leukocytů a pacienti s T-ALL. Nonresponderi jsou léčeni agresivními protokoly. Nicméně někteří z pacientů nebyli vhodní pro určení PRED responderství, protože jejich iniciální ANB je pod 1000/mm<sup>3</sup>. Další úsilí bylo zaměřeno k vyloučení komplikací při stanovení GC odpovědi *in vivo* a byly vyvíjeny nové metody stanovení *in vitro* podmínkách. Ty zahrnovaly kvantifikaci OCRs v cytoplasmě nádorových buněk, aktivaci a translokaci G-CGR komplexů a indukci DNA fragmentace, která následuje po léčbě steroidy. Avšak predikce pacientovi odpovědi založené na vyšetřeních *in vitro* podmínkách měla variabilní úspěšnost a/nebo *in vitro* analýzy nebyly vhodné pro rutinní klinické použití pro jejich vysokou cenu a pracovní náročnost. Nicméně před několika málo lety byla představena poloautomatická *in vitro* MT assay analyzující lékovou rezistenci v nádorových buňkách. Jde o finančně únosný cytotoxický test, který určuje koncentraci léku smrtící 50% leukemických buněk v *in vitro* podmínkách. I přes fakt, že tato analýza postihuje jen buněčný mechanismus rezistence na GCs, zkouška ukázala signifikantní asociaci mezi *in vitro* senzitivitou na PRED a dlouhodobým přežíváním pacientů s ALL. Tato analýza také demonstruje silnou korelaci mezi anti-leukemickou aktivitou PRED a DEX a poskytuje tak nepřímý důkaz, že nahrazení PRED dexametazonem by nemělo zvýšit procento GCs odpovědi *in vivo*. Ačkoliv pozitivní korelace mezi PRED a DEX LCS<sub>50</sub> byla nalezena i v naší studii, hladina významnosti byla mnohem nižší než v pracích Kasperse a spol. (12) a Ita a spol. (13). Mimoto jsme našli podstatnou část pacientů s rozdílnou *in vitro* odpovědí na PRED a DEX (Obr. 1).

Vyšetřili jsme celkem 53 dětí s nově diagnostikovanou ALL. Ze souboru jsme později vyloučili pacienty s iniciální ANB = 0 (4; 8,7%) a děti, jejichž úmrtí nebylo v přímé souvislosti s ALL (3; 5,7%). Ve zbylé skupině 46 pacientů jsme analyzovali rezistenci na kortikoidy *in vitro* a základní hematologické parametry (ANB v den 0, ANB v den 8, procento blastů v kostní dřeni den 15 a 33 a celkový počet leukocytů při diagnóze). Abychom mohli lépe charakterizovat redukci nádorové masy byl zaveden nový parametr nazvaný clearance blastů 8.den (BCC8). BCC8 je spočítán z ANB0 a ANB8 s použitím následující rovnice: BCC8(%) = ANB8:ANB0 x 100.

## VÝSLEDKY

### 1) Korelace hodnot PRED a DEX *in vitro* lékové rezistence s charakteristikou pacienta.

Multivariační korelační analýza (Pearson product-moment correlation) byla použita k nalezení pozitivních nebo negativních korelací mezi PRED a/nebo DEX LCS<sub>50</sub>, ANB0, ANB8 a BCC8. Potvrdili jsme pozitivní korelaci mezi hodnotami DEX a PRED LCS<sub>50</sub> (r=0,4497; p<0.002), přesto hladina významnosti je mnohem nižší než ve výše uvedených publikacích (12, 13). Ačkoliv nebyla nalezena signifikantní vazba mezi PRED/DEX *in vitro* odpovědí a ANB8, PRED LCS<sub>50</sub> signifikantně koreloval s clearance blastů (r=0,3340; p<0.02). Nicméně korelace BCC8 s DEX LCS<sub>50</sub> nebyla signifikantní.

### 2) *In vitro* rezistence na glukokortikoidy.

Stanovené hodnoty pro *in vitro* rezistenci/citlivost na PRED/DEX byly určeny zařazením pacientů do dvou skupin jako senzitivní (66%; hodnota LCS<sub>50</sub> <12,0/0,15 g/ml) a rezistentní (33%; hodnota LCS<sub>50</sub> > 12,0/0,15 g/ml). Nicméně významná část dětí vykazovala rozdílnou *in vitro* citlivost na PRED/DEX (21 dětí; 30%). Deset pacientů (14%) bylo senzitivních na PRED a rezistentních na DEX a 11 (16%) bylo rezistentních na PRED a rezistentních na DEX (Obr. 1).

### 3) Účinek kryoprezervace CCRF-CEM buněk na protinádorovou chemoterapii *in vitro*

I když jsme potvrdili signifikantní korelaci PRED a DEX LCS<sub>50</sub> na leukemických buňkách od našich pacientů, byla zde část pacientů s rozdílnou senzitivitou na PRED versus DEX. To odpovídalo dříve publikovaným údajům (12,13). Pokud budeme analyzovat obě tyto práce, zjistíme, že experimenty byly provedeny s kryoprezervovanými a dlouho transponovanými buňkami pacientů, zatímco v naší studii byly použity pouze čerstvě izolované buňky. Na modelu T-lymfoblastické buněčné linie CCRF-CEM jsme dokázali, že kryoprezervace snižuje (p<0.01) PRED rezistenci v porovnání s lékovou rezistencí analyzovanou na čerstvě získaných buňkách. K našemu překvapení rozdílná hodnota LCS<sub>50</sub> na čerstvých a kryoprezervovaných buňkách nebyla pozorována mezi dalšími protinádorovými léky (DEX, vepesid, daunorubicin, vincristin, L-asparagináz, cytarabin, 6-TG, mitoxantron, flutabin, cisplatin, cladribin). Předpokládáme, že vysvětlením tohoto jevu by mohlo být odlišné zpracování leukemických buněk v našich (čerstvé buňky) a jiných studiích (kryoprezervace nebo dlouhotrvající transport), čehož následkem je zvýšená senzitivita kryoprezervovaných nádorových buněk na PRED. Předpokládáme, že možným vysvětlením této skutečnosti by mohl být defekt energetického metabolismu kryoprezervovaných nebo dlouho transponovaných buněk, který vede ke snížení intracelulárního ATP - zdroje energie pro buněčné lékové transportéry (Pgp, MRP aj.). Opakovaná manipulace s buňkou může být rovněž příčinou snížené vnímavosti na PRED indukovanou apoptózou.

Námi identifikovaná podskupina pacientů (30%) s odlišnou *in vitro* vnímavostí na PRED v porovnání s DEX nebyla jinými autory potvrzena. Naše původní doporučení - respektovat individuální *in vitro* vnímavost na GCs při konstrukci nových léčebných režimů nezůstalo dlouho bez odezvy. V novém protokolu pro léčbu kojenecké ALL (INTERFANT 99 - R. Pieters) je PRED v týdenní cytoredukční fázi nahrazen DEX, který je podáván až do konce redukce (8. - 34. den). Identickou úpravu indukční části nového protokolu ALL - BFM 99 použil i H. Gadner. Následná aplikace obou forem GCs již v průběhu indukce by měla podstatně eliminovat obě podskupiny blastů. Ve většině stávajících protokolů je glukokortikoidem první volby prednison adexametazon je zařazen do léčebného plánu až ve fázi redukce (zkrácená forma indukce kde PRED je nahrazen DEX). Hlavním významem nové léčebné strategie je **časné zařazení (střídání) obou forem GCs** v době (indukce), kdy leukemické buňky jsou stále ještě přítomny ve větším objemu.

## ZÁVĚR

Na prvním místě by se *in vitro* analýza buněčné lékové rezistence měla stát prognostickým faktorem, který může být využit pro stratifikaci pacientů s leukémií do rizikových podskupin a k následné adaptaci chemoterapie ve vztahu k riziku selhání. Dobré prognostické faktory jsou vzácné u ALL. Některé chromozomální abnormality [inv16, t(15;17) a t(8;21)] mají prognostickou významnost, ale vyskytují se jen u minorit pacientů s ALL. Nicméně před prohlášením lékové rezistence za nezávislý prognostický faktor u dětské ALL, by měla být provedena multivariační analýza i dalších potenciálních prognostických faktorů. Využití analýzy lékové rezistence se nabízí při individualizaci („ušíť na míru“) chemoterapie nebo konstrukci léčebných režimů pro různé podskupiny pacientů. Tato koncepce je založená na skutečnosti, že léková rezistence je odlišná mezi jednotlivými podskupinami ALL (např. určené podle FAB klasifikace). Na uvedeném přehledu u dětí s ALL je dostatečně dokumentováno, že prognosticky signifikantní vazby mezi lékovou rezistencí a některými klinickými/laboratorními znaky (věk, imunofenotyp nebo DNA ploidie), dnes umožňují určit pro jednotlivé podskupiny pacientů tzv. profil rezistence. Na základě tohoto *in vitro* profilu

rezistence může být chemoterapie přizpůsobená pro jednotlivé podskupiny nebo i pro individuálního pacienta. Henze a spol.(3) tento princip stratifikace sice potvrdili ve skupině dětí s ALL s vysokým rizikem relapsu, ale léčebné výsledky dětí léčených standardním protokolem nebyly významně horší. Za racionální léčebný postup u těchto pacientů, u kterých špatná prognóza není způsobená pouze špatnou vnímavostí na chemoterapii se dnes považuje využití *in vitro* analýzy lékové rezistence při výběru kombinace cytostatik pro paliativní léčbu. MTT test lze rovněž s úspěchem aplikovat pro výběr vhodných pacientů pro fázi II klinických testů s novými protinádorovými léky, ale i pro jejich samotný screening. Rozhodujícím cílem výzkumu *in vitro* lékové rezistence je další zlepšení léčebného úspěchu dětských nádorových onemocnění nejenom z pohledu účinnosti, ale i s ohledem na možné nežádoucí účinky.

## PODĚKOVÁNÍ

Práce na projektu lékové rezistence je podpořena granty IGAMZ 4132-5, MSMTVZJ14/98151100001 a Nadací pro výzkum rakoviny v Olomouci.

## Literatura:

1. Pui C-H, Evans WE: Acute lymphoblastic leukemia. N Engl J Med 1998; 339(9), 605-15.
2. Mosmann T: Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: Application to proliferation and cytotoxicity assay. J Immunol Methods 1983;65, 55-63.
3. Henze G, Agthe AG, Neuendank A, Hartmann R, Dorffle W, Bruhmüller S, Klumper E, Pieters R, Veerman AJP: Tailored therapy for relapsed or refractory childhood acute lymphoblastic leukemia. Leukemia 1995;9:538.
4. Mihál V, Hajdúch M, Weigl E, Videmanová L, Šafářová M: Naše první zkušenosti s testováním citlivosti leukemických buněk na cytostatika *in vitro*. CsPediatri 1995;50(7), 387-392.
5. Mihál V, Hajdúch M, Starý J, Sedláček P, Blažek B, Michálek T, Kotala V, Jabali J, Pospíšilová D, Klásková E, Šafářová M, Janošťáková A: Může *in vitro* citlivost leukemických buněk na cytostatika ovlivnit klinickou odpověď dětí s akutní lymfoblastickou leukémií? CsPediatri 1996;51(8), 515-519.
6. Pieters R, den Boer M L, Durian M, Jánka G, Schmiegelow K, Kaspers GJL, van Wering ER, Veerman AJP: Relation between age, immunophenotype and *in vitro* drug resistance in 395 children with acute lymphoblastic leukemia - implication for treatment of infants. Leukemia 1998;12,1344-1348.
7. Kaspers GJL, Smets LA, Pieters R, van Zantwijk CH, van Wering ER, Veerman AJP: Favorable prognosis of hyperdiploid common acute lymphoblastic leukemia may be explained by sensitivity to antimetabolites and other drugs: results of an *in vitro* study. Blood 1995; 85(3), 751-756.
8. Klumper E, Pieters R, Kaspers GJL, Huismans DR, Loonen AH, Rottier M M A, van Wering ER, van der Does-van der Berg A, Hahlen K, Creutzig U, Veerman AJP: In vitro chemosensitivity assessed with the MTT assay in childhood acute non-lymphoblastic leukemia. Leukemia 1995;9,1864-1969.
9. Kaspers GJL, Veerman AJP, Pieters R, van Zantwijk CH, Smets LA, van Wering ER, van der Does-van der Berg A: In vitro cellular drug resistance and prognosis in newly diagnosed childhood acute lymphoblastic leukemia. Blood 1997; 90(7), 2723-2729.
10. Raimondi SC, Shurtleff SA, Downing JR, Rubnitz J, Mathew S, Hancock M: 12p abnormalities and the TEL gene (ETV6) in childhood acute lymphoblastic leukemia. Blood 1997; 90,4459-4566.
11. Pui C-H, Evans W: Genetic abnormalities and drug resistance in acute lymphoblastic leukemia. Adv Exp Med Biol 1999;457,383-389.
12. Kaspers GJL, Veerman AJP, Pop-Snijders C, Lomecky M, van Zantwijk CH, Swinkels LMJW, van Wering ER, Pieters R: Comparison of the antileukemic activity in vitro of dexamethasone and prednisolone in childhood acute lymphoblastic leukemia. Med Ped Oncol 1999;27,114-121.
13. Ito C, Evans WE, McNinch L, Coustat-Smith E, Mahmoud H, Pui C-H, Campana D: Comparative cytotoxicity of dexamethasone and prednisolone in childhood acute lymphoblastic leukemia. J Clin Oncol 1996;14,2370-2376.
14. Mihál V, Hajdúch M, Janošťáková A, Šafářová M, Nosková V, Starý J, Blažek B, Pospíšilová D: The analysis of correlation between drug resistance and clinical/laboratory measures found in a group of children with ALL treated by ALL-BFM 90 protocol. Elec J Oncol, 1999; 1, 80-89.
15. Mihál V, Hajdúch M, Janošťáková A, Šafářová M, Nosková V, Starý J, Blažek B, Pospíšilová D, Pikalová Z, Šafářová M: Differential chemosensitivity of leukaemic cells in myeloid and lymphoid phase of stem cell leukaemia. Neoplasma 1997;44(2), 133-136.
16. Hajdúch M, Mihál V, Minařík J, Faber E, Šafářová M, Weigl E, Antálek P: Decreased in vitro chemosensitivity of tumour cells in patients suffering from malignant disease with poor curability. Cytotechnology 1996;18,1-3.
17. Belkov V M, Krynetski EY, schuetz JD, Yanishevski Y, Masson E, Mathew S, Raimondi S, Pui C-H, Relling MV, Evans WE: Reduced folate carrier expression in acute lymphoblastic leukemia: A mechanism for ploidy but not lineage differences in methotrexate accumulation. Blood 1999; 93(5), 1643-1650.