

VYUŽITÍ BUNĚK ZÍSKANÝCH Z MALIGNÍCH VÝPOTKŮ K VEDENÍ LÉČBY PACIENTŮ S POKROČILÝM NÁDREM

USE OF MALIGNANT EFFUSIONS FOR GUIDANCE IN THE TREATMENT OF ADVANCED CANCER

KRÁSNÁ L.^{1,2}, MATOUŠKOVÁ E.², JANOUŠEK M.³, DUDORKINOVÁ D.⁴, PETRUŽELKA L.¹

¹ ONKOLOGICKÁ KLINIKA VFNA I. LF UK, PRAHA

² ÚSTAV MOLEKULÁRNÍ GENETIKY AV ČR, PRAHA

³ GYNEKOLOGICKO-PORODNICKÁ KLINIKA VFNA I. LF UK, PRAHA

⁴ PATOLOGICKO-ANATOMICKÝ ÚSTAV VFNA I. LF UK, PRAHA

Souhrn: Bylo zpracováno 34 břišních a 24 hrudních výpotků pacientů s nádorovým onemocněním. U jedné čtvrtiny z těchto výpotků byla cytologicky potvrzena přítomnost maligních buněk. Byla vypracována metoda k jejich izolaci od příměsí benigních elementů. U 11 břišních a 6 hrudních výpotků umožnilo izolované množství nádorových buněk provedení MTT testu chemorezistence vůči cytostatikům. Většina provedených testů sloužila k vývoji metodiky a k upřesnění *in vitro* kritické koncentrace cytostatik, při které dochází k manifestaci cytotoxických účinků. Předběžné výsledky ukazují, že citlivost nádorových buněk vůči cytostatikům *in vitro* je jejich další biologickou charakteristikou závislou pravděpodobně na stádiu nemoci a předchozí léčbě. Vyvinutá metodika nyní slouží k získávání dalších dat, která umožní ověřit, zda existuje korelace mezi odpovědí izolovaných buněk v *in vitro* testu a léčebnou odpovědí *in vivo*.

Klíčové slova: maligní výpotek, MTT test chemorezistence *in vitro*

Summary: Thirty-four abdominal and twenty-four pleural effusions were tested for the presence of malignant cells to examine the possibility of using isolated malignant cells to guide the treatment of oncology patients. Malignant cells were cytologically confirmed in 25% of the examined effusions. A method to isolate these cells devoid of benign cells was developed. The *in vitro* MTT chemoresistance test of cells to cytostatic agents was performed with cells from 11 abdominal and 6 pleural effusions where sufficient number of cells was obtained to conduct the test. The tests helped improve the method and find the concentrations of cytostatics that were efficient *in vitro*. Preliminary results show that the *in vitro* sensitivity/resistance of malignant cells to cytostatic agents is case-dependent and depends on the stage of the disease and previous treatment of the patient. The method will be used to study the correlation between the *in vitro* response of isolated malignant cells to cytostatics and the response of a patient to the same drugs.

Key words: malignant effusions, MTT test of chemoresistance *in vitro*

tvod

Nádorová onemocnění jsou charakterizována širokou variabilitou klinického vývoje. Průběh neléčeného onemocnění lze předpovědět pomocí prognostických faktorů. Volba účinné systémové léčby je založená na využití prediktivních faktorů, které umožní identifikovat nemocné jež budou mít ze stanoveného postupu největší prospěch. Snahy onkologů o úspěšnou léčbu nádorových onemocnění proto vedou k trendu individualizace léčby pacientů s využitím biologických vlastností nádorů, detekovatelných díky rychlému vývoji molekulárně-biologických metod. Jednou z nepříznivých vlastností nádorových buněk, která může limitovat terapeutickou odpověď pacienta, je původně geneticky podmíněná či v průběhu léčby získaná rezistence buněk vůči chemoterapeutickému agens. Jenom na úrovni buňky je mnoho mechanismů, které mohou tuto rezistenci navodit. Je to snížený vstup či zvýšené vylučování cytostatika buňkou, snížená schopnost aktivace či zvýšená schopnost inaktivace léku buněčným enzymatickým mechanismem, snížená či zvýšená hladina cílového enzymu v buňce, či jeho změněná struktura, zvýšená schopnost opravy lékem navozené DNA poruchy, změna v apoptotické signální dráze a další (pro přehled viz Tannock et al. 1998). Pomocí molekulárně biologických metod lze dneska tyto jednotlivé poruchy detekovat. Nabízí se však možnost detekovat rezistenci, podmíněnou na buněčné úrovni, jediným testem a to přímým testem chemorezistence maligních buněk *in vitro*. Existuje několik způsobů testu chemorezistence *in vitro* o jejichž přednostech i nedostacích bylo napsáno již mnoho článků (Bellamy 1992, Fruehauf 1993, Von Hoff 1990a, Wrisenthal 1991, Cree IA et al. 1997 a řada dalších). Z praktického hlediska je nejvýhodnější MTT test chemorezistence (Black et al. 1954, Carmichael et al. 1987). Je založený na testování viability buněk, které byly vystavené působení cytostatik. Mitochondriální enzym sukcinyl dehydrogenáza viabilních buněk redukuje žlutou tetrazoliovou sůl na tmavě modré, ve vodě nerozpustné krystalky. Po rozpuštění těchto krystalků lyzačním roztokem je spektrofotometricky měřena optická densita roztoku ukazovatelem množství přeživajících, resp. metabolicky aktivních buněk. Nedostatkem MTT testu je, že nedokáže odlišit metabolickou aktivitu příměsí benigních buněk v kultuře a že nedokáže rozeznat buňku dočasně metabolicky inaktivní (cytostatický účinek léku) od trvale inaktivní, definitivně poškozené buňky (cytotoxický účinek). Obecně může testování chemoterapeutik *in vitro* selhávat zejména na těchto klíčových krocích: izolace a identifikace nádorové buněčné popu-

lace pro *in vitro* test, uchování aktivity chemoterapeutik *in vitro* a použití takové koncentrace a délky expozice cytostatik *in vitro*, které by simulovali podání léku *in vivo*.

V systémové chemoterapii nádorových onemocnění se standardně využívají v klinických studiích ověřené režimy. Při selhání léčby první, druhé, nebo vyšší řady je výběr chemoterapie omezen a volba léčby není standardně určena.

U části nemocných se recidiva manifestuje maligním výpotkem. Cílem této práce bylo prozkoumat možnost použití buněk izolovaných z maligních výpotků těchto pacientů k vedení jejich další léčby.

V tomto článku přinášíme metodiku naší práce, kterou vyvíjíme, konzultujeme a upravujeme již delší dobu a naše experimentální výsledky a zkušenosti za první rok. Diskutujeme jejich výpovědní hodnotu.

Metody

Izolace maligních buněk z výpotků

Výpotky byly získané standardně provedenou hrudní či břišní punkcí nemocných onkologické kliniky či gynekologické kliniky VFNA I. LF UK. Prvních 500 ml punktováné tekutiny bylo zachyceno sterilně do infusní láhve. Vzorek punktátu byl zaslán ke standardnímu cytologickému vyšetření. Výpotek byl do zpracování skladován v pokojové teplotě, v případě že šlo o hemoragický, nebo vysoce viskózní výpotek, bylo do něj přidáno 5-10 ml Heparinu 25-500 tis. m. j. Po centrifugaci výpotků při 150 g byl sediment promytý v proplachovacím médiu a opět centrifugován. Sediment byl resuspendován v malém objemu kultivačního média, opatrně nanesen na vrstvu Percollu (Pharmacia Fine Chemicals) o hustotě 1,05 g/ml. Poté proběhla gradientová centrifugace 10 min při otáčkách 2000 g. Po skončení centrifugace byl viditelný na dně kónické zkumavky sediment erytrocytů a bílých krvinek. Na rozhraní Percollu a média byl v případě přítomnosti maligních buněk ve výpotku vytvořen bílý prstenec. Ten byl izolován hrubou sterilní jehlou (0,9x70 mm, Braun) a zbaven zbytků Percollu promytím v proplachovacím médiu a centrifugací. V případě masivní hemorágie byla procedura s Percollem opakována 2-3krát. Po proplachu byly izolované buňky resuspendovány v kultivačním médiu, počítány v Bürkerově komůrce (Meopta) a vzorek byl opět odeslán na cytologické vyšetření.

Jako kultivační médium bylo používáno RPMI 1640 médium doplněné glutaminem (150 mg/500 ml média, Sevac), antibiotiky (penicilin a streptomycin, Biotika), 10% telecího séra (ZVOS

Tab.1: Zdroje výpotků vzhledem k původní diagnóze nemoci, jejich malignita a využitelnost pro test

Břišní výpotky			
lokalizace nádoru	počet pacientů	počet maligních výpotků	počet úspěšně provedených testů
ovarium	14	3	3 (Asc 54, Asc 58, Asc 65)
pankreas	6	2	0 (nedostatek buněk)
kolorektální karcinom	3	0	0
mléčná žláza	2	1	0 (nedostatek buněk)
ledvina	2	0	0
plice		0	0
pleura		0	0
žaludek		1	1 (Asc 17)
žlučník		2	2 (Asc 28, Asc 29)
játra		0	0
ovarium + mléčná žláza		1	0 (nedostatek buněk)
neznámy primární nádor		?	2 (Asc 18 Asc 22)
spolu	34	12	8

Hrudní výpotky			
lokalizace nádoru	počet pacientů	počet maligních výpotků	počet úspěšně provedených testů
mléčná žláza	12	7	3 (PL 6, PE 7, PE 8)
ovarium	2	1	0 (málo buněk)
neznámy primární nádor	2	2	0 (kontaminace; nedostatek buněk)
mléčná žláza + ovarium	1	1	0 (málo buněk, sferoidy)
mléčná žláza + endometrium	1	1	0 (málo buněk, sferoidy)
endometrium	1	1	0 (sferoidy)
pilce	1	1	1 (PE 22)
pleura	1	1	1 (PE 9)
brzlík	1	1	0
NH lymfom	1	1	1 (PE 38)
liposarkom plicní metastázy	1	0	0
spolu	24	17	6

Hustopeče), 2% embryonálního telecího séra (Sigma), 0,195% NaHCO₃, 0,02 M TES, N-Tris(hydroxymethyl)methyl-2-aminoethane sulfonic acid, Serva). Pomocí NaOH bylo pH média upraveno na 7,4.

Jako oplachovací médium bylo používáno H - M E M d médium s 2-násobně koncentrovanými antibiotiky (penicilin a streptomycin). Percoll (Pharmacia), původní koncentrace 1,13 g/ml, byl na konečnou koncentraci upraven naředěním standardním solním roztokem (PBS).

K centrifugaci výpotků byly použity 50 ml sterilní centrifugační polypropylenové zkumavky (NUNC) a k vysokootáčkové gradientové centrifugaci byly použity 15 ml sterilní centrifugační polypropylenové zkumavky (NUNC). Percoll tvořil 2,5 ml objemu, na to bylo opatrně naneseno 10 ml buněčné suspenze.

Příprava buněk na test

Získaná buněčná suspenze byla ředěna v kultivačním médiu na koncentraci 5x 10⁵ buněk/ml. Osmdesát ml této suspenze bylo pipetováno sterilní špičkou a mikropipetou (Gilson, 100-200 ml) do vnitřních jamek (všechny kromě A1-12, H1-12, B-G 1 a B-G 12) 96 jamkové sterilní destičky (NUNC, dále jenom destička) s kultivační úpravou povrchu jamek. Zevní, prázdné jamky, byly zaplněné 100 ml kultivačního média a při měření výsledku byly použity jako pozadí.

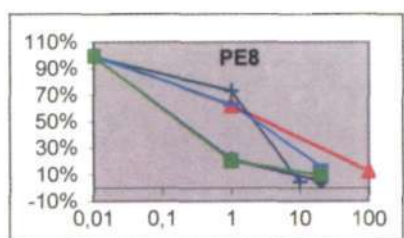
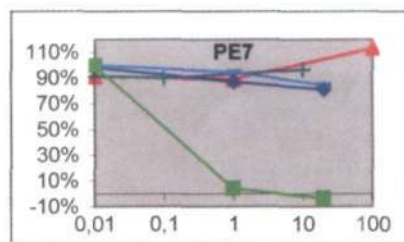
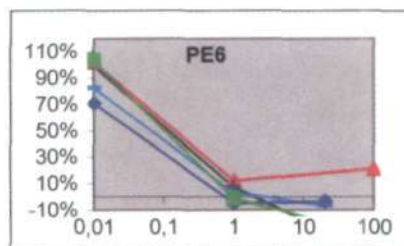
Aplikace cytostatik

Cytostatika byla aplikovaná bezprostředně k pipetované buněčné suspenzi. Celkový objem cytostatik byl 20 ml. Pro odvození *in vitro* testované koncentrace byla použita hodnota maximální dosažené plasmatické koncentrace cytostatika v krevní plasmě pacientů (peak plasma concentration = *ppc*), pro přehled jsou uvedeny v tabulce č.2. Zásobní roztok v koncentraci 100-násobku *ppc* se ukázal pro většinu cytostatik jako vhodná koncentrace k dlouhodobému uskladnění (6 měsíců) při -70 ° C bez poškození aktivity látky (Bosanquet 1986, Bosanquet 1996, Hunter et al. 1994, Von Hoff DD et al. 1983, Weisenthal et al. 1983). Ředění cytostatik probíhalo bezprostředně před jejich aplikací do testovací destičky.

V každém řádku (vyjma prvního A1-12 a posledního H1-12) byla testována účinnost jednoho cytostatika v různých koncentracích. Maximální testovaná koncentrace chemoterapeutika byla rovněž přidána k první jamce svého řádku, bez buněk, aby při vyhodnocování testu bylo možno odečíst změnu optické denzity, kterou způsobuje cytostatikum samotné. Výběr cytostatik se řídil množstvím získaných maligních buněk, histologií původního nádoru a předchozí léčbou pacienta. Celkově bylo možno v *in vitro* systému testovat tyto cytostatika, které nepotřebují ke své aktivaci jaterní enzymatický systém organismu: doxorubicin, epirubicin, 5-fluorouracil, gemcitabin, cisplatina, karboplatina, paklitaxel, bleomycin, topotekan, vinblastin, vinkristin, vinorelbin, dakarbazin (po jednodinové aktivaci na přímém slunečním světle, Von Hoff et al. 1990b), etoposid, teniposid, mafosfamid (*in vitro* aktivní analog cyklofosfamidů). Výrobci používaných substancí jsou uvedeni v tabulce č.2. Po pipetování cytostatik byla destička jemným zatřesením promíchána a uchovávána za standardních kultivačních podmínek (37 °C, 3,5% CO₂) po dobu 72 až 96 hodin.

Tab.2: Používané cytostatika a předpokládaná *ppc*.

chemická látka	obchodní přípravek a výrobce	předpokládaná <i>ppc</i>
bleomycin	Bleocin, Nippon Kayaku Co Ltd	2 µg/ml
cisplatina	Platidiam, Lachema	5 µg/ml
karboplatina	Cycloplatin, Lachema	20 µg/ml
doxorubicin	Doxolem, Medicom International s.r.o.	0,5 µg/ml
epirubicin	Farmorubicin, Farmitalia Carlo Erba	0,5 µg/ml
5-fluorouracil	Fluoro-uracil, Roche	30 µg/ml
gemcitabin	Gemzar, Lilly France S.A.	30 µg/ml
vinblastin	Vinblastin, Gedeon Richter Ltd.	1 µg/ml
vinkristin	Vincristin, Gedeon Richter Ltd.	0,5 µg/ml
vinorelbin	Navelbine, Pierre Fabre Oncologie	2 µg/ml
dakarbazin	Dacarbazin, Lachema	15 µg/ml
topotekan	Hycamin, Smith Kline Beecham	1 µg/ml
paklitaxel	Taxol, Bristol Myers-Squibb	10 µg/ml
mafosfamid	Mafosfamide-L-Lysine, ASTA Medica AG	1 µg/ml
etoposid	Vepesid, Bristol Myers-Squibb	40 µg/ml
teniposid	Vumon, Bristol Myers-Squibb	20 µg/ml



Příloha č.3:

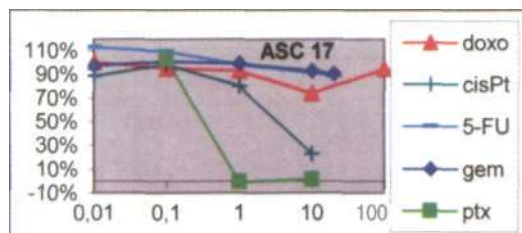
PE 6 - 82letá pacientka, karcinom prsu diagnostikován v prosinci 1997 ve stádiu T4N2M1 (postižení nadklíčkových uzlin). Do srpna 1998 nemoc stabilizovaná podáváním Tamoxifenu. Při lokoregionální progresi pak hormonoterapie změněna na Arimidex. V březnu 1999 se objevil hydrothorax (z tohoto výpotku izolován vzorek PE 6), pacientka za několik dní umřela po embolizaci do plic.

PE 7 - 66letá pacientka s ductálním, invazivně rostoucím karcinomem prsu po ablaci a exenteraci uzlin v roce 1987. Absolvovala adjuvantní chemoterapii CMF (6 cyklů) a lokoregionální aktinoterapii. V roce 1996 pro suspektní recidivu (plicní nález) pokračovala chemoterapií FAC a hormonoterapií Tamoxifenem. V březnu 1999 nález na plicích progredoval, objevil se fluidothorax, došlo k celkovému zhoršení stavu. Brzo po evakuaci výpotku (PE 7) došlo k úmrtí pacientky.

PE 8 - 47letá pacientka po ablaci prsu pro karcinom v únoru 1995 (pT2 NO M0). Adjuvantně podaná chemoterapie CMF. V únoru 1999 relaps nemoci s postižením měkkých tkání v oblasti nadklíčku, hydrothorax. Jeho evakuaci byl získán vzorek PE 8, malignita výpotku cytologicky potvrzena. Pacientka zahájila chemoterapii FAC, na které došlo ke kompletní regresi nemoci. Od jejího skončení sledována, bez známek nemoci.

Asc 17 - 56letý pacient s karcinomem žaludku po gastrektomii v březnu 1998, s infiltrovanými perigastrickými uzlinami, místy s extrakapsulárním šířením. Absolvoval pooperačně chemoterapii ELF 6-krát. Od listopadu 1998 pokračoval chemoterapií FU FA do února 1999. V březnu 1999 přichází na naši kliniku s recidivou procesu v břiše, sahající až do malé pánve a s břišním výpotkem. Jeho evakuaci byl získán vzorek Asc 17. Tumorózní masa způsobila oboustrannou hydronefrozou, pro kterou nebylo možné pokračovat v chemoterapii.

Na uvedených grafech je výsledek testu rezistence nádorových buněk vůči doxorubicinu (doxo), 5-fluorouracilu (5-FU), gemcitabinu (gem), cisplatině (cisPt) a paklitaxelu (ptx). Na ose x jsou v logaritmickém měřítku vyneseny koncentrace, ve kterých byly látky testovány (jako násobek ppc). Na ose y je vyneseno procento viabilních buněk.



Legenda u grafu Asc 17 je společná pro všechny čtyři grafy. Rezistence buněk vzorku PE 7 a Asc 17, které patřily více předléčeným pacientům, je znatelně vyšší. Buňky PE 8 jsou in vitro citlivé vůči doxorubicinu i 5-fluorouracilu, viabilita buněk v těchto substancích klesá již při nízkých koncentracích. Analogicky tomu pacientka reagovala na chemoterapii FAC kompletní regresi nemoci.

MTT test

Po skončení inkubace buněk s cytostatiky (72-96 hod) bylo do každé jamky přidáno 10 ml MTT roztoku (3-[4,5-dimefthylthiazol-2-yl]-2,5-diphenyltetrazolium bromide, Sigma), čerstvě připraveného v koncentraci 5 mg/ml PBS a filtrovaného přes 0,2 mm filtr (Millipore). Po 6 hodinách inkubace v 37 °C a 3,5% CO₂, byla pod invertovaným mikroskopem s fázovým kontrastem (Olympus CK2) hodnocena v každé jamce přítomnost buněk, jejich viabilita a důsledně zkontrolováno, jestli nedošlo ke kontaminaci jamek (bakteriální či kvasinková kontaminace, mikroskopicky dobře detekovatelná, má zásadní vliv na výslednou optickou densitu jamek, ve které se nachází). Všechny odchylky byly pečlivě zaprotokolovány a brány v úvahu při hodnocení testu. Poté bylo do každé jamky přidáno 100 ml 10% lyzačního roztoku SDS (Lauryl sulfate, Sigma) s pH upraveným pomocí NaOH na 5,3. Destička byla dále kultivována přes noc při 37 °C. Po skončení inkubace byla změřena optická densita všech jamek v ELISA readeru (MR 700, Dynatech) při vlnové délce 550 nm a pozadí 630 nm.

Vyhodnocení testu

Získané hodnoty optické denzity jednotlivých jamek byly graficky zpracovány v programu Microsoft Excel. Na ose x byly zaznamenány koncentrace testovaných cytostatik v jejich relativní hodnotě (násobek ppc), na ose y procento viabilních buněk. Procento viabilních buněk bylo vypočteno jako podíl optické denzity v testovací jamce a optické denzity v jamce bez přítomných cytostatik. Od obou hodnot bylo odečteno pozadí - optická densita jamek, ve kterých bylo jenom médium, MTT a SDS. Od testovací jamky s maximální koncentrací cytostatika bylo odečteno i pozadí cytostatika, tj. optická densita jamek, ve které bylo k médiu přidáno jenom cytostatikum v této maximální testované koncentraci. V případě doxorubicinu bylo nutné takto korigovat optickou densitu všech jamek s výslednou koncentrací cytostatika vyšší než je 1 x ppc. U ostatních cytostatik byl jejich vliv na výslednou optickou densitu jamek zanedbatelný.

Výsledky

V průběhu zhruba jednoho roku bylo pro další zpracování získáno 34 břišních a 24 hrudních výpotku. Přítomnost maligních elementů byla cytologicky potvrzena u 10 břišních a 17 hrudních výpotku. Dostatečné množství maligních buněk, potřebné k provedení testu (500 000 viabilních buněk na jedno cytostatikum), bylo však po centrifugaci 500 ml těchto výpotku získáno pouze

z 11 břišních a 6 hrudních výpotku. Zejména u hrudních výpotků bylo častým problémem po izolaci nádorových buněk jejich shlukování do velkých, dutých, mnohobuněčných koulí, které bránily vytvoření homogenní suspenze těchto buněk a tím provedení testu. V případě malého množství nádorových buněk byla z nich založena kultura s úmyslem namnožit tyto buňky a provést test chemorezistence po jejich pasáži *in vitro*. V jediném případě (Asc 29) byl pokus o založení kultury úspěšný. V ostatních případech došlo většinou k adhezi maligních buněk na povrch kultivační misky či lahvičky a poté již pouze k jejich degeneraci a buněčné smrti. Po několika dnech (7-10) došlo ve většině založených kultur k proliferaci příměsí fibroblastů a mezotelií a posléze, po asi 20 dnech, k jejich přemnožení. V tabulce č. 1 je přehled zdrojů výpotku a jejich využitelnosti vzhledem k primární lokalizaci nádoru.

Na několika prvních vzorcích byly testovány jenom tři koncentrace cytostatik velmi širokého rozptylu. Výsledná koncentrace byla rovná setině, jednonásobku a stonásobku ppc. V případě některých substancí, maximální koncentrace, která byla *in vitro* testována, musela být nižší, což bylo dáno koncentrací látky, v jaké byla dodávána. Tak 5-fluorouracil byl testován při maximální koncentraci 20 x ppc, gemcitabin 20 x ppc a cisplatin 10 x ppc. Paklitaxel byl pro svoje vysoce viskózní vlastnosti testován maximálně v koncentraci 20 x ppc. Každá koncentrace byla testována minimálně ve třech jamkách.

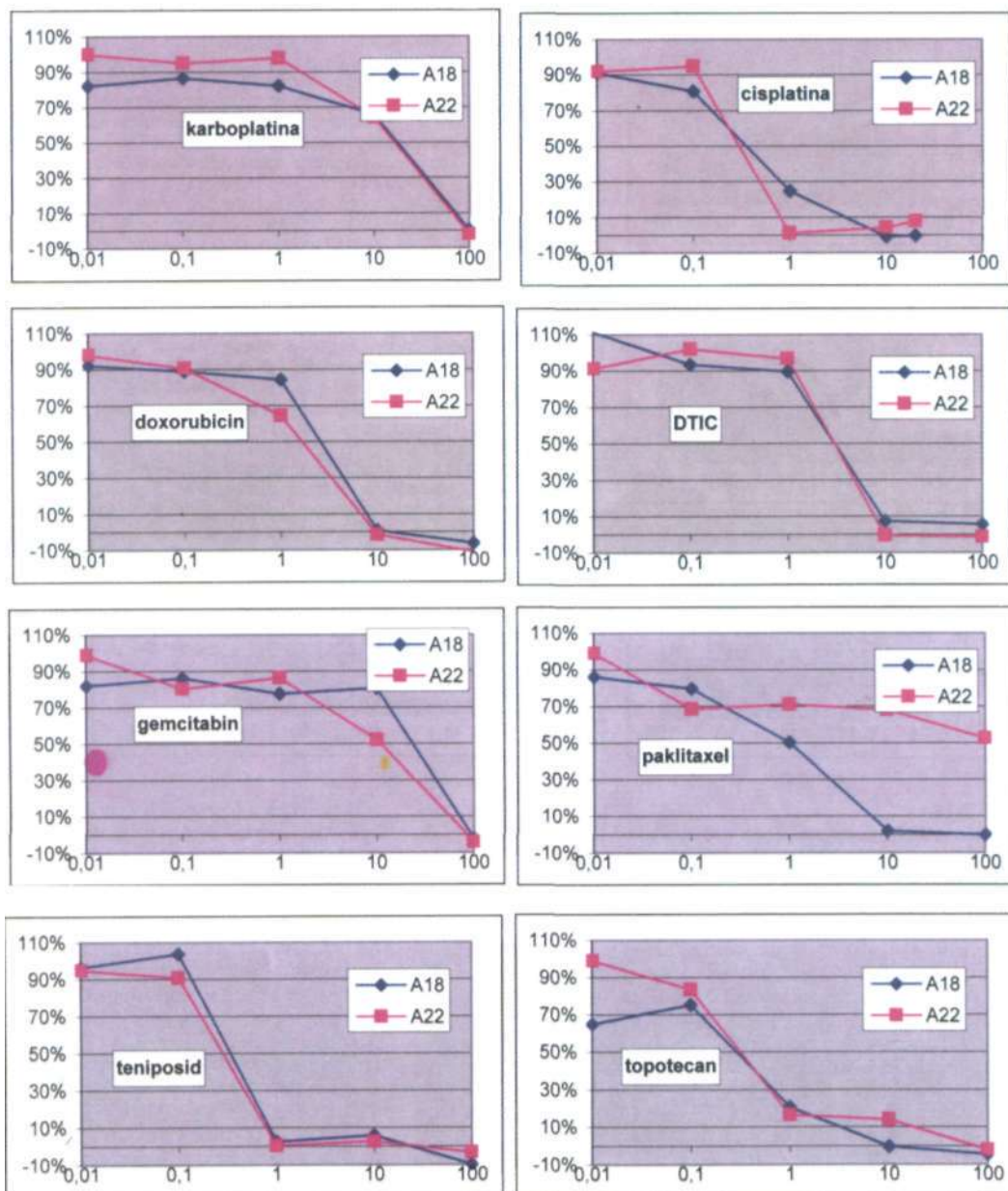
Výsledky testů potvrdily, že při důsledné homogenizaci buněčné suspenze je variabilita hodnot optické denzity naměřených v jamkách se stejnou koncentrací testovaného agens nízká. V grafech v příloze číslo 3 je uveden výsledek testování chemorezistence izolovaných buněk u čtyř pacientů (PE 6, PE 7, PE 8 a Asc 17). Nádorové buňky byly kultivovány v doxorubicinu, 5-fluorouracilu, cisplatině, gemcitabinu a paklitaxelu ve výše popsaných koncentracích. Výsledek testu ukázal, že buňky izolované z výpotku více předléčených pacientů (PE 7 a Asc 17) vykazují větší rezistenci vůči testovaným cytostatikům. Maligní buňky ze vzorku PE 8 nejevily *in vitro* rezistenci vůči doxorubicinu ani 5-FU. V korelaci s tím pacientka, která byla dále léčená chemoterapií FAC dosáhla kompletní regrese nemoci.

Následovalo několik testů, ve kterých byl zvětšen počet testovaných koncentrací nejdříve na pět, s každou koncentrací opakovanou 2krát. Protože se opět potvrdil malý rozptyl hodnot výsledné optické denzity při stejné koncentraci testovaného cytostatika, byl počet koncentrací jedné testované látky zvýšen na devět. V tom-

Příloha č.4:

Asc 18 a Asc 22 (A18, A22) - 27letá pacientka, přeložena na naši kliniku s primárním zachytem nádorového onemocnění, které se manifestovalo přítomností maligních výpotků - břišního, oboustranně hrudního, perikardiálního a zvětšených subklavikulárních uzlin vlevo. Dne 13.4.99 byla provedena evakuace břišního výpotku, z něhož byl získán vzorek Asc 18. Po jeho evakuaci bylo rozhodnuto, pro rychlou progresi nemoci a zhoršování stavu, o aplikaci chemoterapie paklitaxel + cisplatina. Několik dní po aplikaci, 26.4.99, byla nutná opakovaná evakuace břišního výpotku, z kterého byl získán vzorek Asc 22. V krátké době došlo u pacientky k celkovému metabolickému rozvratu a k exitu.

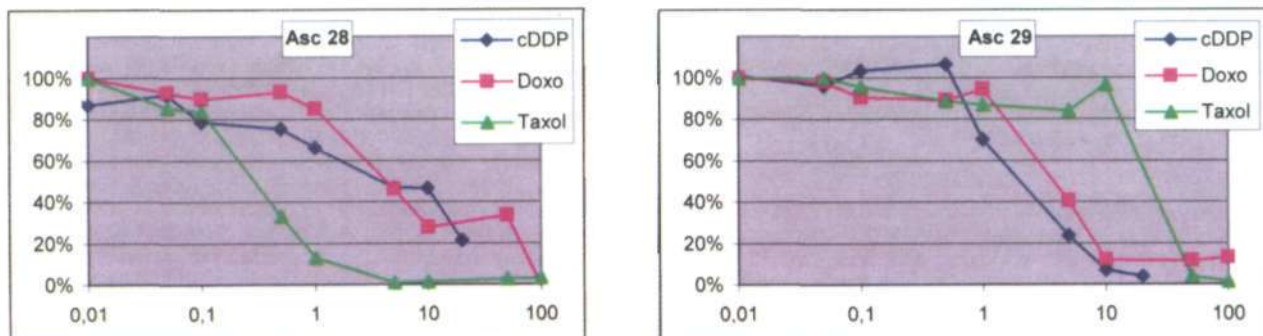
V každém grafu je vyneseno výsledky testování rezistence buněk izolovaných z Asc 18 a Asc 22 k jednomu chemoterapeutickému agens. Na ose x jsou v logaritmickém měřítku vyneseny koncentrace, ve kterých byly látky testovány (jako násobek ppc). Na ose y je vyneseno procento viabilních buněk. Zajímavý je fakt, že zatím co odpověď buněk izolovaných z dvou za sebou v krátké době (13 dní) následujících výpotků na většinu testovaných látek zůstává přibližně stejná, prudce stoupá rezistence vůči paklitaxelu.

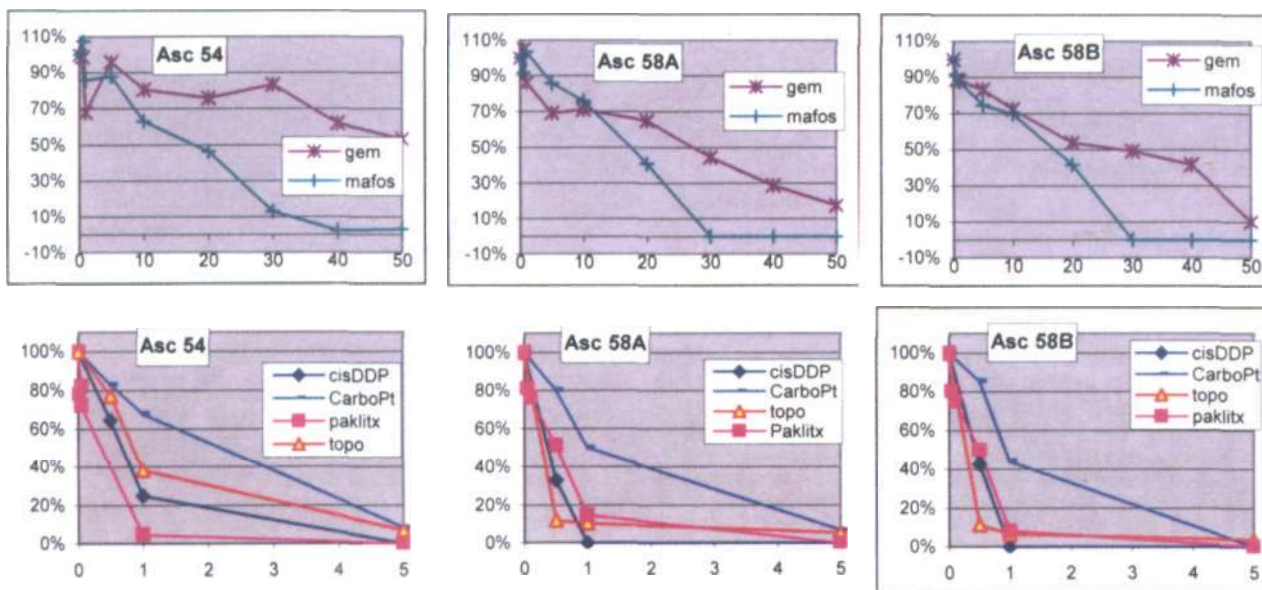


Příloha č. 5:

Asc 28 a Asc 29 - 50letý pacient od května 1999 s nádorem neznámé primární lokalizace, metastazujícím do krčních uzlin vpravo a do jater. V červnu a červenci 1999 absolvoval dva cykly chemoterapie cisplatina + vepesid, při kterých progresi stavu. Dne 16.8.99 byla provedena evakuace břišního výpotku, bohatá na nádorové buňky. Z této punkce byl získán vzorek Asc 28. Den po punkci byl aplikován intravenózně doxorubicin v monoterapii. 20.8. provedena další punkce břišního výpotku, získán vzorek Asc 29. Exitus nastal druhý den.

Grafy v příloze číslo 5 ukazují výsledky testování rezistence buněk izolovaných z obou výpotků vůči vybraným cytostatikům (cDDP - cisplatina, Doxo - doxorubicin, Taxol - paklitaxel). Na ose x jsou v logaritmickém měřítku vyneseny koncentrace, ve kterých byly látky testovány (jako násobek ppc). Na ose y je vyneseno procento viabilních buněk. Rovněž jako v předešlém případě došlo k indukci rezistence buněk vůči, jinak in vitro velmi účinnému, paklitaxelu. V tomto případě již bylo testováno 9 koncentrací v rozmezí 0,01 až 100 xppc, každá koncentrace pouze jedenkrát.





Příloha č. 6: Grafy ukazují výsledek testování rezistence buněk izolovaných z břišních výpotků dvou pacientek s ovariálním nádorem. V prvním případě byly izolovány buňky označené Asc 54. Ve druhém případě, Asc 58, izolované množství buněk umožnilo provedení testu se stejnými látkami opakovaně. Na ose x grafů je zaznamenána koncentrace testovaných látek v relativní hodnotě, jako násobek jejich *ppc*. Na ose y je zaznamenáno procento viabilních buněk po kokultivaci s testovanou chemickou látkou (gem - gemcitabin, mafos - mafosfamid, cisDDP - cisplatina, CarboPt - karboplatina, paklitx - paklitaxel, topo - topotekan). Je možné pozorovat, že odpověď buněk Asc 58 je v obou případech (Asc 58A a Asc 58B) stejná a liší se od odpovědi buněk Asc 54.

to provedení již pak nebylo možno testovat více jamek stejné koncentrace.

V grafech v příloze číslo 4 a 5 je výsledek testu s pěti (č.4) a devíti (č.5) koncentracemi testovaných látek provedeného na buňkách získaných z opakované břišní punkce dvou pacientů. V obou případech šlo o vysoce pokročilé nádorové onemocnění, málo předléčené, nereagující na podanou chemoterapii. V obou případech mezi evakuací prvního a druhého výpotku došlo k aplikaci 1 cyklu chemoterapie. Zajímavý je proto fakt, že v obou případech došlo u nádorových buněk z druhého výpotku k "indukci" rezistence vůči paklitaxelu, látce, vůči které většina testovaných buněk *in vitro* byla vysoce citlivá.

V další sérii testů bylo na základě výsledků předchozích testů vybráno užší rozmezí testovaných koncentrací. Provětšinu cytostatik je testována 0,5 až 50-násobná koncentrace *ppc*, v tomto rozmezí je testováno 8 koncentrací. Pro cisplatinu je testováno 6 koncentrací v rozmezí 0,5 až 20-ti násobku *ppc* a pro paklitaxel 8 koncentrací v rozmezí 0,05 až 20-ti násobku námi uvažované *ppc* koncentrace. V tomto uspořádání byli zatím provedené čtyři poslední testy (Asc 54, Asc 58, Asc 65 a PE 38). V případě výpotku ovariálního nádoru Asc 58 nám dostatek izolovaných buněk umožnil provést dva na sebe nezávisle testy se stejnými koncentracemi stejných chemoterapeutických látek. V příloze číslo 6 lze opět vidět, že dvě odlišné buněčné kultury Asc 54 a Asc 58 se liší svou odpovědí na testované koncentrace cytostatik, zatím co pro opakované provedení testu se stejnou buněčnou kulturou zůstává odpověď stejná.

Diskuse

Testování chemoterapeutik *in vitro* zahrnuje mnoho kroků, jejichž nesprávné provedení či interpretace může vést k selhání celého testu. Při testování nádorové buněčné populace získané rozvolněním solidních nádorů je prvním problémem již získání dostatečně velké vzorku, který lze použít pro *in vitro* test. Maligní výpotky jsou z tohoto pohledu lehce dostupným zdrojem nádorové buněčné populace. V našem souboru jen asi čtvrtina výpotků obsahovala dostatečné zastoupení nádorové populace. Izolace těchto buněk z příměsí benigních elementů (erytrocyty, granulocyty, malé i velké monocyty, mesotelie, často i degenerované, fibroblasty) je do určité míry možná pomocí gradientové centrifugace v Percollu. Přesto je nesporné, že část benigní populace zůstává i po opakovaném pročištění suspenze přítomná. Z každé izolované a pročištěné buněčné suspenze jsme zakládali souběžně buněčnou kulturu. K proliferaci benigních elementů docházelo

lo až po 7-10 denní pokojové fázi. K ovlivnění výsledků testu provedeného v prvních 3-5 dnech po izolaci buněk teda může dojít jedině v případě, že je zastoupení benigních buněk i po izolaci významné. Zůstává proto nezbytným ověření procentuálního zastoupení viabilních nádorových buněk v izolované buněčné suspenzi a v ideálním případě rovněž v negativní kontrole (nevystavené žádnému cytostatiku) po skončení testu. Suspenze s méně než 50% zastoupením viabilních nádorových buněk zcela určitě nelze považovat za použitelnou. Tento fakt je o to důležitější, že i benigní buněčná suspenze, s kterou byl *in vitro* proveden test s několika cytostatiky měla určitou charakteristickou citlivost či rezistenci vůči těmto látkám. Z výsledku testu nelze již pak zpětně odečíst jaká populace buněk byla testována.

Přesto, že MTT test patří k těm testům, jejichž provedení je relativně jednoduché, zjistili jsme, že pro získání validních dat je nutné při jeho provedení přesně dodržovat určitý postup v některých krocích. Buněčná suspenze, která bude v testu použita, musí být maximálně homogenní. Proto i v průběhu její aplikace do 96-jamkové destičky musí probíhat její neustálá resuspendace. Zároveň ale tento proces nesmí trvat dlouho, protože proudění vzduchu v laminárním boxu (sterilní prostředí je zcela nezbytné) dokáže v průběhu zdlouhavé manipulace s otevřenou destičkou zmenšit objem suspenze v jamkách až o 10%, což již není zanedbatelné. Totéž platí pro následnou práci s cytostatiky, které, pro uchování aktivity, je vhodné uchovávat koncentrované v -70 °C a fedit až před použitím. Manipulace s nimi po rozmrazení nesmí být příliš zdlouhavá pro jejich vysokou citlivost na světlo a pro možnou změnu jejich aktivity. Vynechání krajních jamek pouze pro médium je rovněž nevyhnutné, vypařování média z těchto krajních jamek po dobu inkubace bylo pozorováno i jinými autory (Pieters et al. 1990). Doba, po kterou je doporučeno inkubovat buňky v přítomnosti cytostatik se podle různých autorů liší od 1 hodiny (Von Hoff et al. 1990b), 4 hodin (Smith et al. 1990) až po 96 hodin (Bosquet et al. 1996). Nejvíce používanou dobou, zejména v MTT provedení zůstává 72 hodin. Při hodnocení viability buněk považujeme za zcela nezbytné, před zlyzováním MTT krystalků a s tím i úplným zlyzováním buněk, aby byl zhodnocen opticky obsah všech jamek. Lze tak předejít zanesení nespecifických hodnot do výsledku testů.

Výběr koncentrací, které budou v *in vitro* testu použité, je dalším klíčovým bodem úspěšnosti testu. Kultivace nádorových buněk v cytostatikách *in vitro* je v mnohém odlišná od *in vivo* situace. Proto není možné jednoduše odvodit koncentraci pro *in vitro* testování od léčebné dávky. Pomocí dosavadních výsledků jsme se

snažili zjistit kritickou koncentraci testovaných cytostatik *in vitro*, tj. koncentraci, při které dochází u většiny buněk k manifestaci cytotoxického účinku. Až po získání výsledků testů mnoha rozličných buněčných kultur testovaných v těchto kritických koncentracích budeme moci srovnat odpovědi různých kultur navzájem a zjistit, zda je možné z výsledku testu předpokládat odpověď pacienta na léčbu.

Závěr

Cílem práce, která nadále pokračuje, je zjistit, zda je možno buňky izolované z maligních výpotků pacientů s pokročilým nádorovým onemocněním použít k vedení jejich další léčby. Z předběžných výsledků experimentů lze tvrdit následující: (1.) Maligní výpotky (s cytologicky potvrzenou přítomností nádorových buněk) jsou cenným zdrojem nádorových buněk, které lze dále použít. (2.) Tyto maligní buňky lze izolovat od příměsných benigních buněk a tuto izolaci opět cytologicky potvrdit. (3.) Jedna z možností použití izolovaných nádorových buněk je testování účinku cytostatik *in vitro*. (4.) Většina cytostatik je aktivní i v *in vitro* kultivačním systému. (5.) Citlivost izolovaných maligních buněk na jednotlivá cytostatika *in vitro* je měřitelná pomocí testování viability buněk po jejich expozici testované látky. (6.) Odpověď buněčných kultur na testovaná cytostatika je pro ně charakteristická (opakování testu vede ke stejným výsledkům) a odlišuje je od jiných buněčných kultur. Je třeba získat ještě další srovnatelné data k ověření těchto hypotéz: (1.) Odpověď maligních buněk na cytostatika *in vitro* je ovlivněna stádiem nemoci a lze proto jejich citlivost či rezistenci považovat za další použitelný diagnostický či prognostický faktor. (2.) Z odpovědi maligních buněk *in vitro* lze analogicky odvodit pravděpodobnost odpovědi nádorových buněk *in vivo* na stejné agens.

Dodatek

Tato práce vznikla a pokračuje díky finančnímu příspěvku Interní grantové agentury Ministerstva zdravotnictví České republiky (číslo grantu NC-5614-3), díky finanční podpoře z výtěžku Běhu Terryho Foxe, a díky spolehlivé práci Martiny Vobořilové, Ing. Ivy Kudláčkové a Evy Taišlové.

Literatura:

1. Bellamy WT: Prediction of response to drug therapy of cancer. A review of *in vitro* assays. *Drugs* 44(5): 690-708,1992
2. Black MM, Speer FD: Further observation on the effects of cancer chemotherapeutic agents on the *in vitro* dehydrogenase activity of cancer tissue. *J Natl Cancer Inst* 14: 1147-1158,1954
3. Bosanquet AG: Stability of solutions of antineoplastic agents during preparation and storage for *in vitro* assays. *Cancer Chemother Pharmacol* 17:1-10,1986.
4. Bosanquet AG, Bell PB: Enhanced *in vivo* drug sensitivity testing of C L L using refined DiSC assay methodology. *Leukemia Res* 20:143-153,1996.
5. Carmichael J, De Graff W, Gazdar A, Minna J, Mitchell J: Evaluation of a tetrazolium-based semi-automatic colorimetric assay: Assessment of chemosensitivity testing. *Cancer Research* 47:936-942,1987.
6. Cree IA, Kurbacher CM: Individualizing chemotherapy for solid tumors - is there any alternative? *Anticancer Drugs* 8:541-548,1997
7. Fruehauf JP, Bosanquet AG: *In vitro* determination of drug response: a discussion of clinical applications. In: DeVita VT, Hellman S, Rosenberg SA, eds. *Cancer. Principles & practice of oncology - 4th edition*. Philadelphia, Lippincott Company; 1993.
8. Hunter EM, Sutherland LA, Cree IA, Subedi AM C, Hartmann D, Linder D, Andreotti PE: The influence of storage on cytotoxic drug activity in an ATP based chemosensitivity assay. *Anti Cancer Drugs* 5:171-176,1994.
9. Pieters R, Loonen AH, Huismans DR, Broekema GJ, Dirven MWJ, Heyenbrok MW, Hanlen K, Veerman AJP: *In vitro* drug sensitivity of cells from children with leukemia using the MTT assay with improved culture conditions. *Blood* 76(11): 2327-2336,1990.
10. Smith HS, Zoli W, Volpi A, Hiller A, Lippman M, Swain S, Mayall B, Dollbaum Ch, Hackett AJ, Amadori D: Preliminary correlations of clinical outcome with *in vitro* Chemosensitivity of second passage human breast cancer cells. *Cancer Res* 50:2943-2948,1990.
11. Tannock IF, Goldenberg GG: Drug resistance and experimental chemotherapy. In Tannock IF, Hill RP, eds. *The basic science of oncology - 3rd ed*. McGraw-Hill, Health Professions Division; 1998.
12. Von Hoff DD, Clark GM, Stogdill BJ, Sarosdy MF, O'Brien MT, Casper JT, Mattox DE, Page CP, Cruz AB, Sandbach JF: Prospective clinical trial of a human tumor cloning system. *Cancer Res* 43:1926-1931,1983.
13. Von Hoff DD: He's not going to talk about *in vitro* predictive assay again, is he? *J Natl Cancer Inst* 82(2): 96-101,1990 a.
14. Von Hoff DD, Sandbach JF, Clark GM, Turner JN, Forseth BF, Piccart MJ, Colombo A, Muggia FM: Selection of cancer chemotherapy for a patient by an *in vitro* assay versus a clinician. *J Natl Cancer Inst* 82:110-116,1990 b.
15. Weisenthal LM: Predictive assays for drug and radiation resistance. In: Master JRW, ed. *Human cancer in primary culture, a handbook*. Kluwer Academic Publisher; 1991.
16. Weisenthal LM, Dill PL, Kumick NB, Lippman ME: Comparison of dye exclusion assay with a clonogenic assay in the determination of drug-induced cytotoxicity. *Cancer Res* 43:258-264,1983.