

# ANALÝZA CHEMOSENZITIVITY BUNĚČNÝCH LINIÍ MALIGNÍHO PŮVODU A PRIMOKULTUR LIDSKÉHO MALIGNÍHO MELANOMU NA PANEL PROTINÁDOROVÝCH CHEMOTERAPEUTIK

## CHEMOSENSITIVITY OF MALIGNANT CELL LINES AND PRIMARY HUMAN MALIGNANT MELANOMA CULTURES TO ANTICANCER DRUGS

CHUMCHALOVÁ J.<sup>1</sup>, DUŠEK L.<sup>2</sup>, KOVAŘÍK J.<sup>3</sup>

BIOLOGICKÝ ÚSTAV LÉKAŘSKÉ FAKULTY MU, BRNO<sup>1</sup>, KATEDRA CHEMIE ŽIVOTNÍHO PROSTŘEDÍ A EKOTOXIKOLOGIE PŘÍRODOVĚDECKÉ FAKULTY MU, BRNO<sup>2</sup>, ODDĚLENÍ BUNĚČNÉ A MOLEKULÁRNÍ ONKOLOGIE MASARYKOVA ONKOLOGICKÉHO ÚSTAVU, BRNO<sup>3</sup>

Korespondující autor: Jitka Chumchalová, Oddělení buněčné a molekulární onkologie Masarykova onkologického ústavu, Žlutý kopec 7, Brno 656 53, telefon: 05-43133302, e-mail: [jchumch@med.muni.cz](mailto:jchumch@med.muni.cz)

**Souhrn:** Ve studii byla hodnocena léková rezistence 12 buněčných linií maligního i normálního původu na panel 7 cytostatik a primokultur maligního melanomu na panel 8 cytostatik v podmínkách *in vitro* pomocí MTT testu. Vnímavost jednotlivých buněčných linií na poškození cytostatiky jsme analyzovali z hlediska histogenetického původu buněk a statusu genu p53. Výsledky ukázaly, že účinek DOX a v menší míře DDP, BLEO a VBL je závislý na histogenetickém původu modelových linií s vyšší rezistencí karcinomů než sarkomů. Pro 5-FU, MTX a TAX tato závislost prokázána nebyla. Souvislost mezi alteracemi v genu p53 a vnímavostí na cytostatika byla zjištěna pouze u 5-FU a VBL. Léková rezistence v primokulturách maligního melanomu byla hodnocena odděleně na buňkách, které po 24 hodinové kultivaci rostly v suspenzní či adherentní formě. Obě tyto formy dávaly pozitivní reakci s monoklonálními protilátkami (S100, HMB, NKI). S výjimkou jedné primokultury s vysokou rezistencí na všechna farmaka byly ostatní explantované buňky citlivé na VBL, DDP a DOX. Statistické hodnocení MTT testu prokázalo vyšší rezistenci buněk suspenzních než buněk adherentních. Klíčová slova: Chemosenzitivita *in vitro*, nádorové linie, maligní melanom

**Summary:** The study was designed to examine chemosensitivity of 12 established cell lines of malignant and normal origin on a panel of 7 cytostatics, and to explore the efficacy of 8 cytostatics on the primary cultures of malignant melanoma in *in vitro* conditions using the MTT assay. The rate of susceptibility of various cell lines to a damage induced by anticancer drugs was related to a histogenetic origin of cells and to the status of p53 gene. Our results showed that the effectiveness of DOX, and to a lesser extent of DDP, BLEO and VBL, was related to the histogenetic origin of cells with higher resistance of carcinoma than sarcoma cells. However, this association was not proved for 5-FU, MTX and TAX. The relationship between p53 gene alterations and the cell sensitivity to cytostatics was found only for 5-FU and VBL. Primary cultures of human malignant melanoma exerted an interesting feature. The cells partly grew in adherent phase and partly in suspension. Both of these forms gave positive reaction with three specific monoclonal antibodies (S100, HMB, NKI). The MTT assay was performed separately with each cellular fraction. With the exception of one primary culture showing high resistance to all drugs used the other tumour samples were markedly sensitive to VBL, DDP and DOX. Statistic analyses of MTT test results revealed higher resistance of melanoma cells growing in suspension comparing to adherent ones. **Key words:** Chemosensitivity *in vitro*, malignant cell lines, malignant melanoma

### Úvod

V souvislosti s možným zlepšením léčby zhoubných nádorů je v poslední době středem pozornosti testování citlivosti nádorových explantátů *in vitro* a určení optimální léčby pro daného nemocného. Cílem je vyřadit málo nebo neúčinná farmaka, která mohou pacienta poškodit a dokonce mohou svými mutagenními účinky vést k diverzifikaci nádorové populace, a tak negativně ovlivňovat biologické chování nádoru např. selekcí rezistentních klonů nádorových buněk.

V naší studii jsme se orientovali na hodnocení lékové rezistence stabilizovaných lidských buněčných linií maligního a normálního původu na panel vybraných protinádorových chemoterapeutik. Analyzovali jsme souvislost mezi buněčným poškozením cytostatiky, histogenetickým původem buněk a statusem genu p53. Tento supresorický gen se významně podílí na regulaci buněčné odpovědi na poškození DNA, která zahrnuje zastavení buněčného cyklu v G1 fázi, aktivaci reparačních a apoptotických mechanismů. Je známo, že u většiny lidských nádorů jsou tyto fyziologické procesy defektní a že kromě řady jiných faktorů se na těchto patologických dysregulacích podílejí mutace v genu p53. Tyto genetické změny jsou převážně „missence mutace“ v jedné alele, které mohou mít za následek tvorbu nefunkčního proteinu, jeho overexpresi, která je detekovatelná u více jak 50% lidských neoplasií. Vzácné jsou delece nebo terminální mutace v obou alelách genu p53, charakterizované jako „null phenotype“.

V klinické části práce jsme hodnotili citlivost respektive rezistenci primokultur lidského metastatického maligního melanomu. Důvodem volby tohoto modelu byla skutečnost, že právě tento nádor vykazuje největší rezistenci a v diseminovaném stádiu nereaguje prakticky na žádné ze standardních chemoterapeutik. Druhým, neméně podstatným důvodem byla možnost získat relativně homogenní vzorek nádorových buněk s minimální kontaminací buňkami pojivové tkáně a definovat imunocytochemicky jejich původ.

### Metody

#### Buněčné kultury

Celkem jsme testovali 12 lidských buněčných linií různého histogenetického původu a známým statusem v genu p53. Charakteristika buněčných linií je v tabulce 1.

Všechny buněčné linie byly kultivovány v DMEM médiu (Gibco, USA) s přidávkem 10% fetálního telecího séra a inkubovány při 37°C v atmosféře s 5% CO<sub>2</sub>.

Explantovali jsme 20 maligních melanomů, ale pouze 8 mohlo být testováno. Primární kultura maligního melanomu v metastatickém stádiu byla získána z metastatické lymfatické uzliny s masivní infiltrací nádorem. Z této uzliny se velmi snadno, pouze mechanickým rozvolněním, izolují nádorové buňky bez nutnosti použít proteolytické enzymy, o nichž se domníváme, že mohou vedle řady dalších faktorů, být příčinou změněného biorytmu buněčné populace, zejména v časném stádiu kultivace *in vitro*. Buňky byly po explantaci několik dnů kultivovány, aby se adaptovaly na podmínky *in vitro* a vstoupily do buněčného cyklu. Před MTT testem jsme imunocytochemicky pomocí 3 monoklonálních protilátek S-100, NKI a HMB specifických převážně pro melanocyty a melanoblasty ověřili, že primokultura je více než 80-90% zastoupena nádorovými buňkami.

#### Cytostatika

V práci jsme hodnotili účinnost 8 vybraných cytostatik s různým mechanismem účinku. Použité koncentrace jsme volili na základě

**Tabulka 1:** Charakteristika buněčných Unii.

Název linie	Histogenetický původ	Status genu p53
MRC5	diploidní fibroblasty	wt
MCF7	karcinom prsu	wt
ZR75	karcinom prsu	wt
MDA-MB-231	karcinom prsu	280 Arg>Lys
BT474	karcinom prsu	285 Gly>Lys
BT549	karcinom prsu	249 Arg>His
T47D	karcinom prsu	194Leu>Phe
SKBR3	karcinom prsu	175 Arg>His
HT29	karcinom tlustého střeva	273 Arg>His
SKUTI	leiomyosarkom	175 Arg>His 248 Arg>3In
HOS	osteosarkom	156 Arg>Pro
HS913T	fibrosarkom	deletovaný p53

**Tabulka 2:** Přehled použitých cytostatik a jejich koncentrací.

Koncentrace cytostatik (µg/ml)	Přežívající buňky (%) <sup>1</sup>				Statistická významnost <sup>2</sup>
	Adherentní buňky		Suspenze		
VBL	20	85.7 (± 20.2)	82.9 (± 12.5)		p = 0.790
	80	30.6 (± 14.1)	63.9 (± 14.5)		p = 0.039
DDP	20	27.6 (± 12.3)	56.7 (± 10.1)		p = 0.018
	80	36.8 (± 26.1)	42.1 (± 18.6)		p = 0.696
MTX	20	97.3 (± 9.6)	105.9 (± 15.7)		p = 0.374
	80	104.6 (± 13.3)	103.9 (± 19.1)		p = 0.979
BLEO	0.4	90.3 (± 7.1)	101.8 (± 11.6)		p = 0.188
	2	93.5 (± 13.1)	104.2 (± 17.1)		p = 0.071
TAX	1	94.9 (± 11.7)	98.8 (± 18.4)		p = 0.998
	5	94.2 (± 18.1)	90.9 (± 15.7)		p = 0.418
DOX	2	22.7 (± 10.3)	53.5 (± 12.4)		p = 0.019
	10	25.9 (± 12.4)	63.8 (± 16.2)		p = 0.015
5-FU	10	81.9 (± 8.6)	96.3 (± 10.1)		p = 0.009
	50	86.1 (± 8.6)	96.3 (± 5.3)		p = 0.023
DTIC	80	91.4 (± 11.1)	93.2 (± 13.8)		p = 0.576
	400	87.8 (± 11.0)	82.3 (± 20.1)		p = 0.365

**Tabulka 3:** Rozdíly v *in vitro* chemosenzitivě adherentních a suspenzních buněk maligního melanomu.

Cytostatikum		Použitá koncentrace
Cisplatina	DDP	20 - 80 µg/ml
Vinblastin	VBL	20 - 80 µg/ml
Methotrexát	MTX	80 - 20 µg/ml
Bleomycin	BLEO	2 - 0.4 µg/ml
Taxol	TAX	5 - 1 µg/ml
Doxorubicin	DOX	10 - 2 µg/ml
5-fluorouracil	5-FU	50 - 10 µg/ml
Dakarbazin	DTIC	400 - 80 µg/ml

dě literárních údajů o koncentracích používaných v těchto *in vitro* testech. Koncentrace cytostatik pro testy na explantovaných maligních melanomech byly stejné jako u testů na buněčných liniích. Navíc byl testován dakarbazin (DTIC), jako standardně používaný lék pro léčbu maligního melanomu. Přehled cytostatik včetně jejich zkratk a použitých koncentrací uvádí tabulka 2.

### Test chemosenzitivity MTT

MTT test je založený na redukcí rozpustných tertazoliových solí na nerozpustný formazan mitochondriálními enzymy a vlastně hodnotí ireverzibilní poškození buněk. Pro stabilizované linie jsme připravili buněčnou suspenzi trypsinací, zatímco v případě primárních kultur maligního melanomu byla buněčná suspenze připravena bez použití trypsinu, pouze mechanickým uvolněním ze dna misek. Do 96 jamkových destiček jsme nasadili 10<sup>4</sup> buněk na jamku v celkovém objemu 200 µl včetně cytostatik. Každá koncentrace byla testována ve 4 paralelních jamkách. Pro každou linii jsme jako kontrolu nasazovali identickou buněčnou kulturu bez cytostatik. Buněčné suspenze byly kultivovány v C0, termostatu 48 hodin. Po této době byly buňky inkubovány 4h s 20 µl 3-4,5 dimethylthiazol-2,5 diphenyl tetrazolium bromid (5mg MTT/ml v PBS, pH 7). Následovala centrifugace destiček 5 minut při 4000 rpm a odstranění supernatantu. Do každé jamky se přidalo 200 µl dimethyl sulfoxidu (DMSO) a absorbance výsledného produktu se měřila při 580 nm.

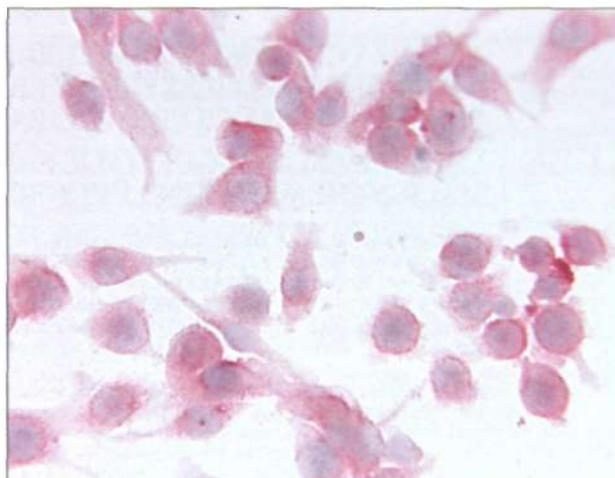
### Statistické hodnocení

Základní analýza primárních dat je založena na běžných metodách explorační analýzy. K srovnání dvou nebo více pokusných variant byl použit standardní t-test a analýza rozptylu jednocestného třídění při splnění všech nezbytných předpokladů (homogenita rozptylu, normalita rozložení). Korelační vztahy proměnných byly testovány neparametrickou metodou Spearmanovy pořadové korelace.

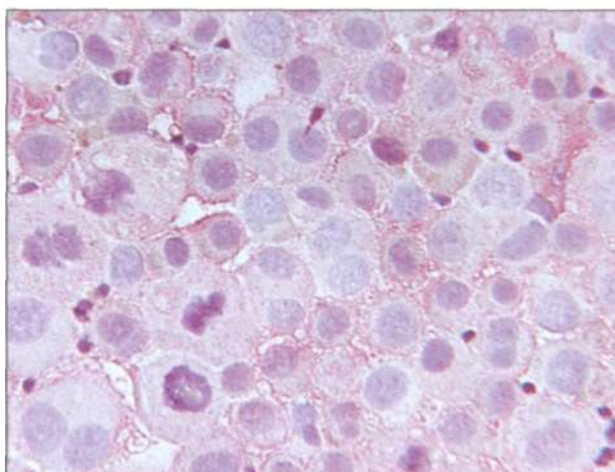
### Výsledky

#### Studie na buněčných liniích

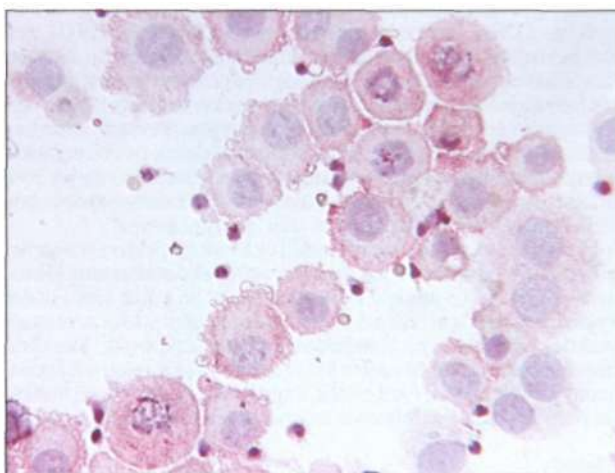
Výsledky MTT testu umožnily rozdělit cytostatika podle účinnosti do následujících tří skupin: a) farmaka s velmi malým cytotoxickým účinkem - MTX a BLEO se 70-100 % přežívajících buněk, b) farmaka se středním účinkem - TAX, DOX a 5-FU s 30 - 70 % přežívajících buněk, c) farmaka s vysokou cytotoxicitou - DDP a VBL s 10-30 % přežívajících buněk. Jsme si vědomi, že toto třídění nelze zobecnit a platí pouze pro tento konkrétní soubor linií.



Obrázek 1. Primokultura maligního melanomu v adherentní fázi - četné pseudopodie. Melanoblasty charakterizované pozitivní imunocytochemickou reakcí s MAb S100, vizualizace alkalickou fosfatázou. (x500)

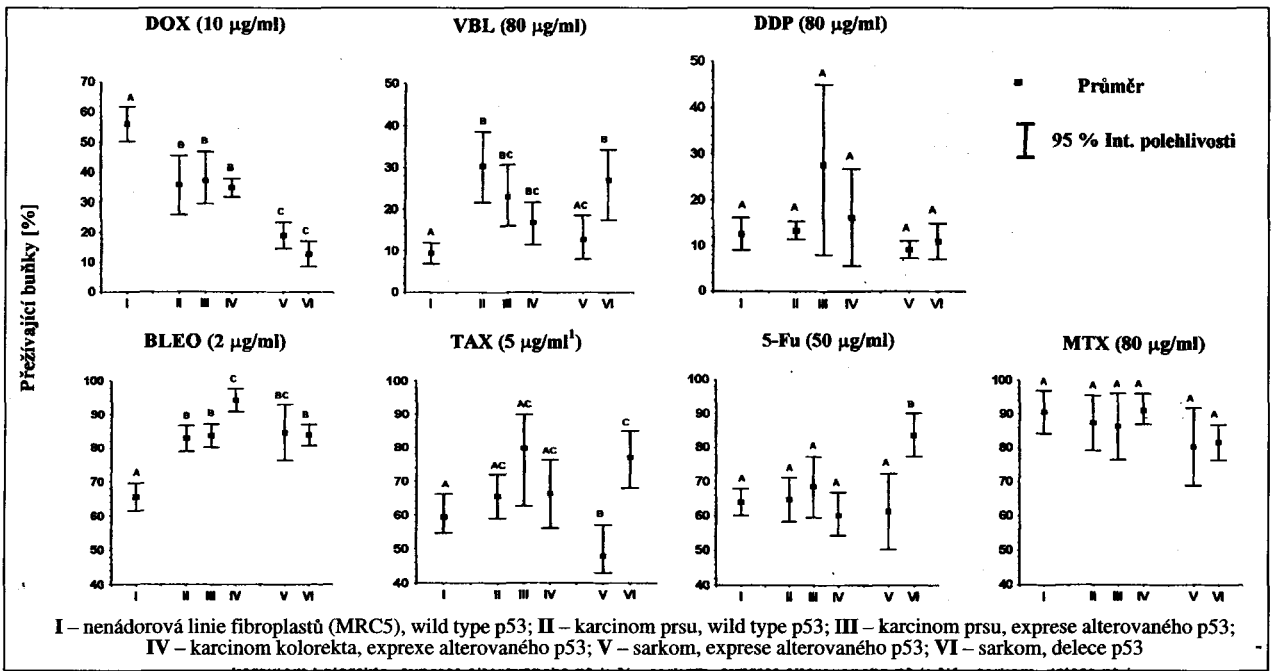


Obrázek 2. Suspenzivní primokultura maligního melanomu s charakteristickým kulovitým tvarem, vícejadernými buňkami a povrchově adhezujícími krevními mononukleáry. Imunocytochemie s MAb S100, vizualizace alkalickou fosfatázou. (x500)

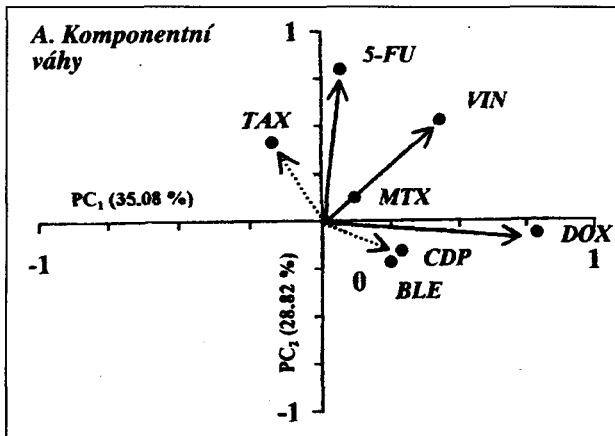


Obrázek 3. Suspenzivní primokultura maligního melanomu. Buňky kulovité morfologie s četnými mitózami, prominentními jádery a s výraznou povrchovou adhezencí krevních mononukleárů. Imunocytochemie s MAb S100, vizualizace alkalickou fosfatázou. (x500)

**Obrazek 4.** Chemosenzitivita buněčných linií v relaci k histogenetickému původu a statusu p53.



**Obrazek 5.** Modelová analýza účinku jednotlivých cytostatik k histogenetickému původu linie a statusu p53.

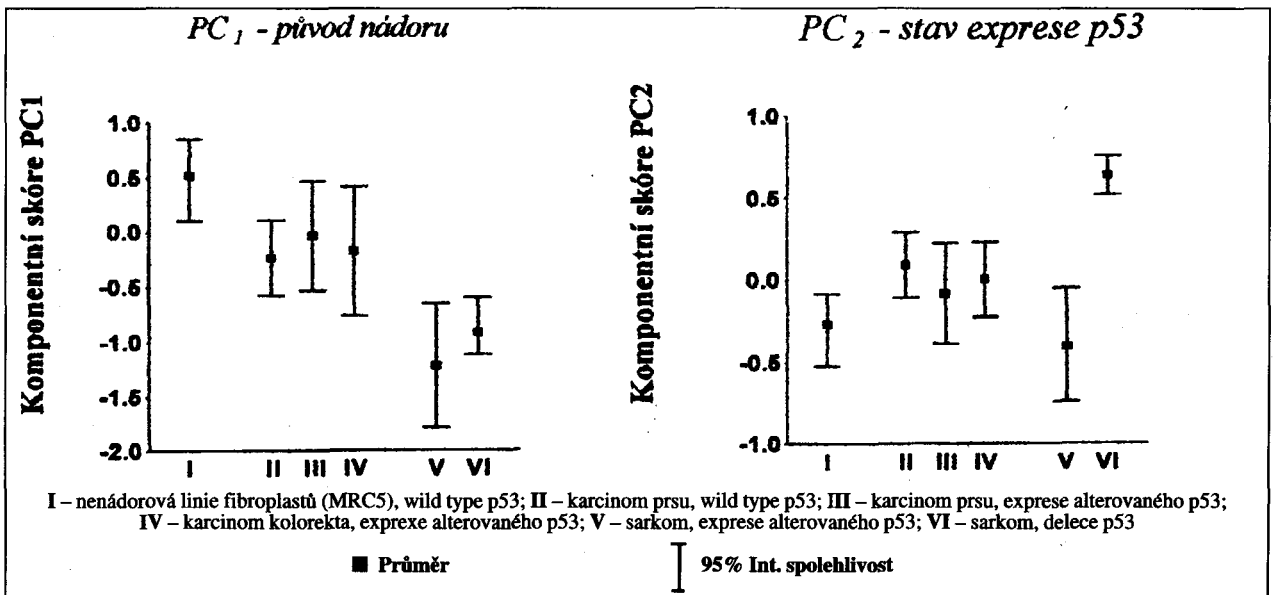


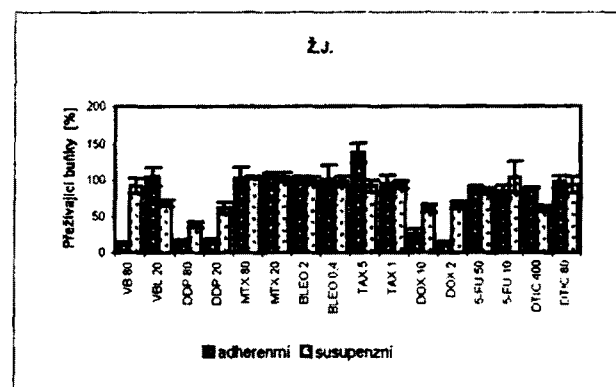
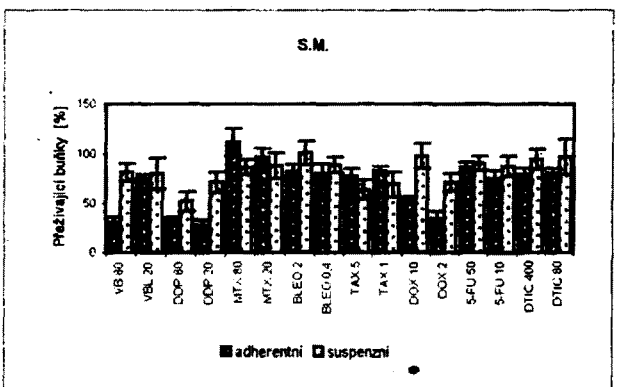
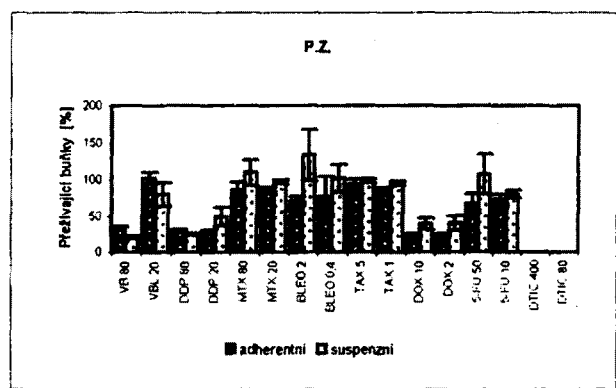
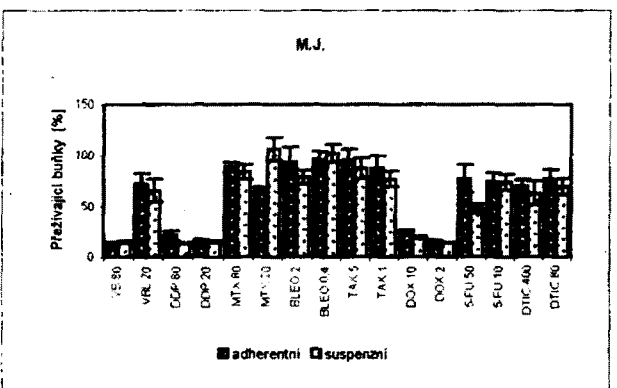
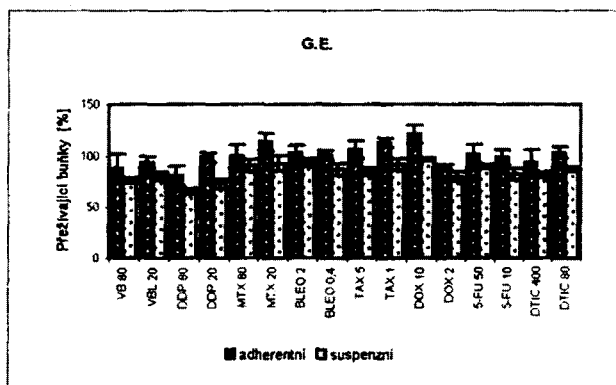
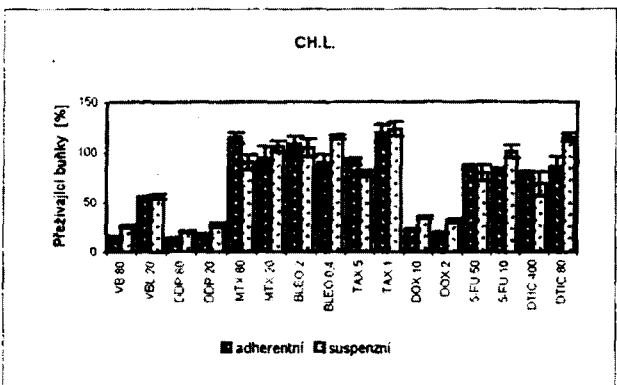
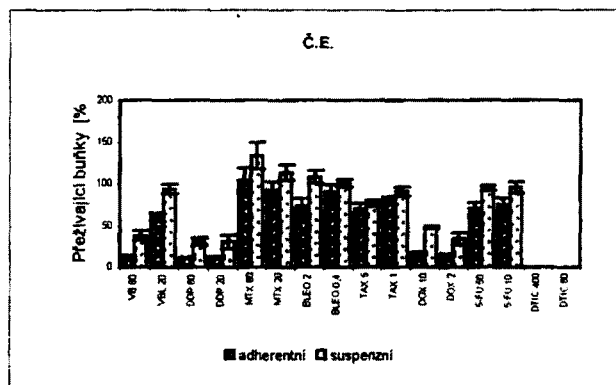
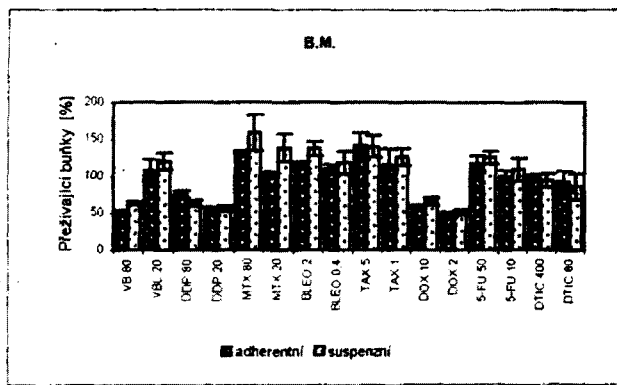
Pro statistické hodnocení jsme linie rozdělili do kategorií podle statusu genu p53 a histogenetického původu. Další testy byly prováděny v rámci těchto kategorií.

- I - nenádorová linie fibroblastů s wild type p53, (MRC5)
- II - karcinom prsu s wild type p53, (MCF7 a ZR75)
- III - karcinom prsu s mutací v genu p53, (BT474, BT549, MDA-MB-231, SKBR3, T47D)
- IV - karcinom kolorekta s mutací v genu p53 (HT29)
- V - sarkom s mutací v genu p53 (SKUT-1 a HOS)
- VI - sarkom s delecí p53, (HS913T)

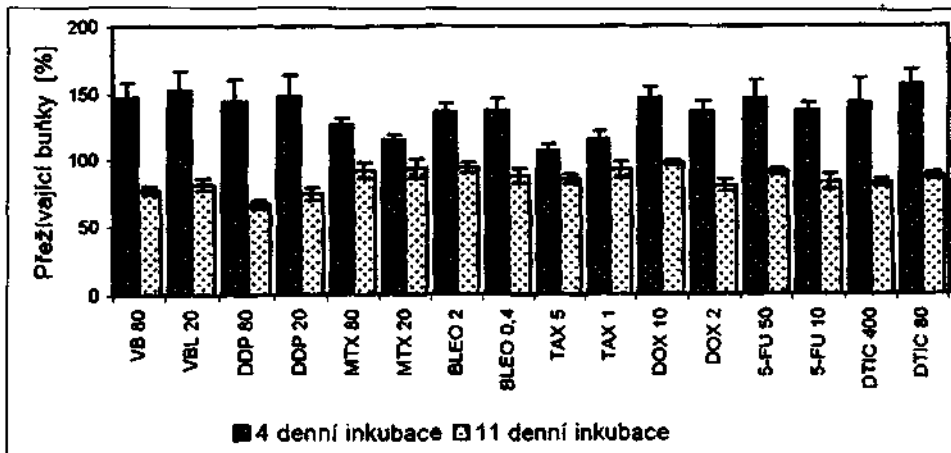
Diskriminační potenciál provedených testů ve vztahu k charakteru linií, byl počítán po vyloučení kontrolní nenádorové linie MRC5, která se chovala zcela náhodně. Statistická analýza výsledků umožnila zařadit testovaná cytostatika do čtyř kategorií vzhledem k histogenetickému původu linie a statusu genu p53. První skupina jsou cytostatika jejichž účinek je závislý na původu nádorové linie a je dominantně reprezentována DOX a v menší míře je

**B. Rozlišení testovaných linií na základě komponentních skóre**





Obrázek 6. Chemorezistence primokultur lidského maligního melanomu.



Obrázek 7. Ovlivnění výsledku MTT testu délkou preinkubace před jeho provedením.

tato závislost patrná i u BLEO a DDP. Do druhé skupiny je možno zařadit pouze 5-FU, jehož cytotoxická aktivita koreluje s mutacemi v genu p53. Třetí skupina je zastoupena VBL, jehož účinek je závislý jak na původu linie, tak částečně na statusu genu p53, což je v protikladu s MTX a TAX reprezentující čtvrtou skupinu. U těchto látek jsme neprokázali souvislost účinku se statusem p53 ani s původem nádorové linie.

Jak ukazuje obr. 4. a obr. 5., můžeme účinek jednotlivých cytostatik v našem testovaném souboru charakterizovat takto: MTX má v dané koncentraci velmi malý účinek na většinu linií, který není závislý na původu buněčné linie ani na statusu genu p53. BLEO vykazuje také velmi malou účinnost na většinu linií, ale statistické hodnocení prokázalo vysoce významně zvýšenou účinnost tohoto cytostatika na kontrolní nenádorovou linii MRC 5. DDP je v aplikovaných koncentracích vysoce cytotoxická s pouhými 10 - 20 % přežívajících buněk. Test s DDP je zatížen značnou variabilitou v rámci skupiny karcinomů prsu a kolorekta, kde se vyskytují linie jak citlivé, tak rezistentní. Účinek TAX a 5-FU není závislý na původu nádorových linií. Sarkomová linie s deletovaným genem p53 (HS913T) však vykazovala na obě tato cytostatika významně zvýšenou rezistenci se statistickou významností pouze u 5-FU. U DOX jsme prokázali nejzřetelnější závislost mezi původem linie a účinkem cytostatika, kde rezistence klesá statisticky významně v následující řadě: normální fibroblasty > karcinomy > sarkomy. Status p53 nemá na účinnost DOX konsistentní vliv. Cytotoxicita VBL je závislá jak na původu linie, s výrazně vyšší rezistencí karcinomů mléčné žlázy, tak i na statusu p53, kde je zřejmá snížená citlivost sarkomů s deletovaným p53.

V daném experimentálním modelu jsme prokázali, že původ linie má větší vliv na účinek cytostatik než status genu p53.

#### Studie na primárních kulturách maligního melanomu

Při mikroskopickém sledování kultur jsme si povšimli, že již po 24 hodinovém transferu do kultivačního média asi polovina buněk adhezuje a další část roste v suspenzi. Imunocytochemickou analýzou jsme prokázali, že většina jak adheřujících, tak suspenzních buněk pozitivně reaguje s kteroukoliv ze 3 monoklonálních protilátek, a že tedy v kultuře je více jak 90% buněk maligního melanomu. Buňky obou fází však vykazovaly určité odlišnosti. Adheřované elementy měly intenzivní metabolickou aktivitu, ale jen sporadické mitózy, naproti tomu buňky suspenzní byly vesměs kulovitěho tvaru s vysokou mitotickou aktivitou Obr. 1,2. Lze se domnívat, že suspenzní frakce obsahuje buňky v pre- a časně postmitotické fázi růstu, kdy se buňky zakulacují a mají nízkou adheřenci k substrátu. Nelze však vyloučit ani přítomnost různých, fenotypově a možná i biologicky odlišných buněčných populací, čemuž by odpovídaly rozdíly v citlivosti na chemoterapeutika mezi adheřivními a suspenzními buňkami.

Zajímavým nálezem bylo ulpívání reziduálních mononukleárů na povrchu suspenzních buněk Obr. 3. Často jsme nacházeli buňky v mitóze s částečnými rozetami lymfoidních elementů. Spekulace o tomto fenoménu je nad rámec tohoto sdělení a závěry budou vyžadovat fenotypovou analýzu mononukleárů. To, že explantovaná populace roste ve dvou fázích, může mít význam pro praco-

viště, která před testováním odstraňují supernatant a tedy i část maligní populace a provádějí vlastně mechanickou selekci.

U explantovaných nádorů jsme, na základě výše uvedených charakteristik, prováděli testy citlivosti zvláště na adheřivních a zvláště na suspenzních buněk. Hodnotili jsme pouze nádory s dostatečnou výtežností buněk a s jejich *in vitro* proliferacím potenciálem. Explantovali jsme 20 nádorů z nich pouze 8 splňovalo výše uvedená kritéria. Výsledky MTT testů na primokulturách těchto osmi pacientů jsou graficky dokumentovány na obr. 6. Vzhledem k tomu, co je známo z kliniky

překvapuje v *in vitro* podmínkách vysoká citlivost na DDP s výjimkou pacientky G.E., ale i na DOX. U citlivých kultur je však možno pozorovat individuální rozdíly v rozsahu buněčného poškození. Na jedné straně vysoký stupeň destrukce cytostatiky DDP a DOX u nemocných M.J., C.E. a P.Z., a na straně druhé částečnou rezistenci na obě farmaka u nemocných B.M. a S.M. Překvapující je citlivost na VBL, patrná u pacientky C.H.L. v obou koncentracích a u pacientů M.J. a B.M. v nejvyšší koncentraci. Výsledky s ostatními farmaky potvrzují očekávaný vysoký stupeň rezistence maligního melanomu.

Srovnání profilů citlivosti suspenzních a adheřivních buněk naznačuje, že až na jedinou výjimku tj. primokulturu pacientky G.E., jsou rezistentnější suspenzní buňky. Z tabulky 3 je patrný trend vyšší rezistence suspenzních buněk se signifikantními rozdíly ve vyšších koncentracích u VBL, BLEO a 5-FU a ve nižších koncentracích u DDP, DOX a 5-FU. Přijmeme-li, že suspenzní populace je zastoupena převážně buňkami v pre- a časně postmitotické fázi, potom naše výsledky jsou v protikladu ke znalostem o obecně vyšší *in vitro* vnímavosti k buněčnému poškození buněk v pozdní G2 a M fázi. Zcela atypický případ je kultura nemocné G.E. s obecně vysokou rezistencí na všechna farmaka i když jak je z grafu zřejmé, jsou buňky adheřující rezistentnější než buňky v suspenzi.

Zaměřili jsme se rovněž na posouzení, do jaké míry doba inkubace buněk *in vitro* do provedení testu ovlivní jeho výsledek. Jak ukazuje obr. 7. délka inkubace u pacientky G.E. výrazně ovlivnila citlivost na cytostatika. Srovnáním 4 a 11 denní kultivace vidíme výrazný vzestup citlivých buněk po 11 denní kultivaci ve srovnání s 4 denní kultivací. To pravděpodobně souvisí s počtem buněk, které jsou schopny cyklovat a s adaptací na podmínky *in vitro*. Nejde jen o zvýšení citlivosti, ale mění se i stupeň účinnosti jednotlivých cytostatik.

#### Diskuse

Jednu z největších studií vztahu chemorezistence ke genu p53 provedli O'Connor a spol. Studovali tumor supresorovou dráhu p53 v 60 liniích NCI (National Cancer Institute) a vztah mezi integritou této dráhy a inhibičním účinkem 123 protinádorových látek. 39 linií z 58 analyzovaných mělo mutace v genu p53. Tato studie ukázala, že linie s imitovaným genem p53 měly tendenci k nižší citlivosti na chemoterapeutika v jejichž účinku dominuje interkalace, inhibice topoizomerázy I a II a interference s prekurzory nukleových kyselin. Linie s imitovaným p53 genem byly méně citlivé k účinku bleomycinu, 5-fluorouracilu a cisplatině. Autoři neprokázali závislost chemorezistence na statusu genu p53.

Naše studie ukázala významně zvýšenou rezistenci fibrosarkomové linie s deletovaným p53 (HS913T) na 5-FU a VBL ve srovnání s liniemi téže histogeneze nesoucími mutace v p53 (HOS, SKUT1). V podmínkách *in vivo* autoři Goto a spol. sledovali v souboru osteosarkomů vztah LOH genu p53 k preoperační chemoterapii a k přežití pacientů. Jejich práce ukázala, že pouze 15% nádorů s LOH v p53 je citlivá na preoperační chemoterapii, na rozdíl od 64% citlivých nádorů bez LOH v p53. Autoři neprokázali souvislost mezi LOH v p53 a délkou přežití nemocných.

V experimentálním modelu buněčných linií Fan a spol. prokázali souvislost účinku Cisplatinu na statusu p53 zatímco pro taxol a vinkristin tato souvislost prokázána nebyla. Zdá se tedy, že status p53 není dominantní pro stupeň buněčného poškození cytostatiky ze skupiny inhibitorů mitózy. Souhlasně s výše zmíněnou prací jsme nepozorovali souvislost mezi účinností TAX a statusem genu p53, avšak v rozporu s výsledky skupiny Fan jsme tento vztah neprokázali ani pro DDP.

I když se zdá, že v *in vitro* modelovém systému hrají alterace v genu p53 významnou úlohu v citlivosti na některá Protinádorová chemoterapeutika, je málo pravděpodobné, že analogické závislosti platí i pro *in vivo* systém. Je třeba si uvědomit, že v modelových liniích s definovanou mutací/deleci v genu p53 se jedná o alteraci homogenně zastoupenou téměř ve všech buňkách, na rozdíl od situace *in vivo*, kdy změny p53 genu jsou popisovány pouze u určitého procenta nádorových buněk. Nicméně to nevylučuje, že znalost statusu p53 explantovaného nádoru může zpřesnit interpretaci *in vitro* testů lékové rezistence.

Souhlasně s klinickými zkušenostmi ukazují i naše výsledky na modelových buněčných liniích, že účinek cytostatik do značné míry souvisí s histogenetickým původem buněk. Tuto korelaci jsme prokázali pro DOX, DDP, BLEO a VBL. V případě TAX a MTX závislost účinku na histogenetickém typu nebyla patrná. Statistická analýza našich výsledků MTT testů na *in vitro* modelovém systému buněčných linií ukazuje na jejich značnou variabilitu a dokladuje, že z těchto studií lze dělat závěry platné pouze pro tento experimentální systém.

V práci jsme se rovněž zaměřili na hodnocení *in vitro* lékové rezistence primokultur lidského maligního melanomu. První práce tohoto typu se objevují již počátkem 80. let, po vypracování metody kultivace melanomových buněk *in vitro* na měkkém agaru. Schadendorf a spol. (10), testovali chemorezistenci nádorů 19 pacientů s maligním melanomem metodou HTCA k cytostatikům. Pro testy chemorezistence použili následující cytostatika v koncentracích: DTIC 75 g/ml, DDP 40 (Ag/ml), 5-FU 400 µg/ml, DOX 200 µg/ml, BLEO 32 µg/ml, VBL 0,1 (Ag/ml) a MTX 5 µg/ml. Jako nejúčinnější uvádějí 5-FU, VBL a DOX. Srovnáním s klinickou odpovědí zjistili vysokou korelaci mezi rezistencí *in vitro* a *in vivo* a potvrzují tak, že tyto testy mohou vyloučit z léčby málo nebo neúčinná farmaka. Výsledky této skupiny jsme v naší studii potvrdili pro VBL a DOX, nikoliv pro 5-FU. Navíc v našich testech se ukázala jako účinná DDP. Pro tato dvě cytostatika mohou být příčinnou odlišných výsledků značné rozdíly v použitých koncentracích obou látek.

Podobnou studii publikovala skupina Tveita a spol. Autoři explantovali 402 maligních melanomů z nichž ve 240 primokulturách hodnotili chemorezistenci metodou HTCA na 3 cytostatika ve 4 koncentracích: DTIC 80, 250, 800 a 2500 µg/ml, VBL 0,01, 0,1, 1,0 a 10 a lomustine (CCNU) 0,04, 0,4 a 4 µg/ml. Jako nejúčinnější cytostatikum uvádějí DTIC a nejméně účinný VBL. Ani v tomto případě jsme v naší práci nezískaly shodné výsledky, což

s nejvyšší pravděpodobností souvisí jednak v rozdílné metodice hodnocení buněčného poškození (HTCA vs. MTT) a rozdílných koncentracích testovaných farmak.

Velmi zajímavou studii prezentují Tveit a spol. (6), kteří srovnávali citlivost explantovaných primokultur nádorů a od nich ustavených buněčných linií. Autoři udávají pozitivní korelaci na většinu použitých cytostatik, i když některé z ustavených linií vykazovaly zvýšenou chemosensitivitu. Tito badatelé se rovněž zaměřili na velmi zásadní problém, tj. na otázku do jaké míry lze modelové podmínky *in vitro* interpretovat z hlediska podmínek *in vivo*. Práce prokázala výraznou změnu a to jak ve smyslu zvýšené, tak i snížené chemosensitivity po přenosu buněk z *in vitro* do *in vivo* na modelu nu-nu myši a vice versa. Tyto výsledky naznačují, že v *in vivo* systému spolurozhoduje o účinku cytostatik celá řada faktorů, které nelze modelovat v podmínkách *in vitro*.

Cesta individualizované terapie na základě *in vitro* testů se zdá nadějná, ale jak metodický přístup, limitace testů a ověření klinické validity výsledků vyžaduje řadu dalších studií.

#### Poděkování

Studie byla realizována s finanční podporou „Výzkumného záměru Masarykova onkologického ústavu č. MZ 00020980501“.

#### Literatura:

1. Levine A. J.: p53, the cellular gatekeeper for growth and division, *Cell*. 88: 323-31, 1997.
2. Prives C. and Hall P. A.: The p53 pathway, *J Pathol*. 187: 112-26, 1999.
3. Mendelson J., Howley P. M., Israel M. A. and Liotta L. A.: *The Molecular Basis of Cancer*, Philadelphia, 1995.
4. Fan S., Cherney B., Reinhold W., Rucker K. and O'Connor P. M.: Disruption of p53 function in immortalized human cells does not affect survival or apoptosis after taxol or vincristine treatment, *Clin. Cancer Res.* 4: 1047-54, 1998.
5. Furukawa T., Kubota T., Watanabe T., Kase S., Takahara T., Yamaguchi H., Takeuchi T., Teramoto, T., Ishibiki, K., and et al.: Chemosensitivity testing of clinical gastrointestinal cancers using histoculture and the MTT end-point. *Anticancer Res.* 12:1377-82, 1992.
6. Tveit K. M., Fodstad O. and Pihl A.: The usefulness of human tumor cell lines in the study of chemosensitivity. A study of malignant melanomas, *Int J Cancer*. 28:403-8, 1981.
7. Tveit K. M., Gundersen S., Hoire J. and Phil A.: Predictive chemosensitivity testing malignant melanoma: reliable methodology-ineffective drugs, *Br J Cancer*. 58: 734-7, 1988.
8. O'Connor P. M., Jackman J., Bae I., Myers T. G., Fan S., Mutoh M., Scudiero D. A., Monks A., Sausville E. A., Weinstein J. N., Friend S., Fornace A. J., Jr, and Kohn K. W.: Characterization of the p53 tumor suppressor pathway in cell lines of the National Cancer Institute anticancer drug screen and correlation with the growthinhibitory potency of 123 anticancer agents, *Cancer Res.* 57:4285-300, 1997.
9. Goto A., Kanda H., Ishikawa Y., Matsumoto S., Kawaguchi N., Machinami R., Kato Y. and Kitagawa, T.: Association of loss of heterozygosity at the p53 locus with chemoresistance in osteosarcomas, *Jpn J Cancer Res.* 89: 539-47, 1998.
10. Shadendorf D., Worm M., Algermissen B., Kohlms C. M., and Czarnetzki, B. M.: Chemosensitivity testing of human malignant melanoma. A retrospective analysis of clinical response and *in vitro* drug sensitivity. *Cancer*. 73: 103-8, 1994.