

# HLAVNÍ KLINICKÉ INDIKACE PRO TESTOVÁNÍ CHEMOREZISTENCE NÁDORŮ *IN VITRO*

## PRINCIPAL CLINICAL INDICATIONS FOR *IN VITRO* CHEMORESISTANCE TESTING OF MALIGNANT TUMORS

KISS I., ŽALOUDEK J., VYZULA R., TOMÁŠEK J., COUFAL O., KOCÁKOVÁ I.

UNIVERZITNÍ ONKOLOGICKÉ CENTRUM BRNO - ODDĚLENÍ KLINICKÉ ONKOLOGIE, CHIRURGICKÁ KLINIKA FN BRNO, MASARYKŮV ONKOLOGICKÝ ÚSTAV

Korespondující autor: I Kiss, FN Brno-Bohunice, Oddělení klinické onkologie, Jihlavská 20, Brno 639 00

**Souhrn:** Na základě testů chemorezistence by teoreticky bylo možné vybrat optimální složení chemoterapie z více možností standardních schémat, zvažovat zda vůbec chemoterapii zahájit, eventuálně zařadit do léčebného schématu nestandardně používaná cytostatika. Nepřímé testy chemorezistence mohou být založeny na a) parametrech obecné biologické aktivity nádorů jako je proliferace, apoptóza, exprese některých regulačních proteinů, b) na specifických mechanismech detoxikace nebo metabolismu cytostatik, například aktivitu P-glykoproteinové pumpy, enzymů jako thymidylát syntáza nebo glutathion-S-transferáza, c) stanovení receptorů pro vazbu specifických inhibitorů jako jsou receptory steroidních hormonů nebo HER2-receptor. Přímé testy hodnotí přímý efekt kontaktu nádorových buněk v kultuře s cytostatikem. Jednoznačnou indikací k testování chemorezistence jsou nádory, u nichž dosud neexistuje statisticky dostatečně účinná chemoterapie jako jsou maligní melanom, adenokarcinom ledvin, nádory centrální nervové soustavy, nemalobuněčný karcinom plic, sarkomy měkkých tkání, hormonálně rezistentní karcinom prostaty, nádory dělohy a čípku, stejně jako nádory horní části zažívacího traktu, tedy jícnu, žaludku, pankreatu, jater a žlučových cest. Léčebné odpovědi na různé režimy chemoterapie v těchto indikacích zřídka přesahují 15-30%. U ostatních nádorů, kde jsou standardizovány relativně účinné režimy mohou testy chemorezistence přispět k rozhodování při progresi v průběhu primární léčby u recidiv k primární terapii již necitlivých. Autoři zdůrazňují potřebu korelací laboratorních nálezů a klinického průběhu a komentují v přehledu některé již publikované práce na toto téma.

**Klíčová slova:** chemorezistence nádorů, přímé a nepřímé testy chemorezistence, klinické indikace

**Summary:** Cancer chemotherapy may be optimized based on chemoresistance testing. In theory, the ineffective drug could be omitted and even replaced by another with pre-tested sensitivity. In indirect testing following parameters can be investigated: a) proliferation, apoptosis, regulatory proteins etc. as markers of biological activity of tumors, b) specific detoxication mechanisms and enzymes of drug metabolism as P-glycoprotein, thymidylate synthase, glutathion-S-transferase, etc., c) specific receptors for inhibitory drugs as steroid hormone receptors, HER2 receptor, etc. Direct testing is based on direct contact of cancer cells in tissue culture with a particular anti-cancer drug. Primary chemoresistant tumors as are melanomas, gliomas, soft tissue sarcomas, kidney carcinomas, non-small cell lung carcinomas, uterine cancer, hormone-independent prostatic carcinomas and especially malignant tumors of upper gastrointestinal tract, pancreas and bile ducts are among the first candidates for chemoresistance testing. Chemotherapy response rates in such tumors rarely achieve 15 to 30%. Even the tumors with good primary responses to standardized chemotherapy regimens as are breast, colorectal, testicular and ovarian cancers may qualify for chemoresistance testing in case of progression under standard chemotherapy or recurrence after therapy. The authors suggest the need for studies correlating the laboratory results with clinical outcomes in order to promote a vision of tailored chemotherapy.

**Key words:** tumor chemoresistance, indirect and direct tests, clinical indications

### Význam prediktivních a prognostických markerů v klinické onkologii

Pravděpodobnost léčebné odpovědi nádorového onemocnění na podávání cytostatik může být velmi rozdílná. Nádorová onemocnění můžeme z klinického pohledu rozdělit na primárně chemorezistentní (maligní melanom s kurativním efektem téměř 0%) a chemosenzitivní (testikulární nádory s kurativním efektem až 100%). Toto orientační dělení se opírá o výsledky klinických studií v léčbě jednotlivých onemocnění. Dále však existuje individuální rezistence k chemoterapii v rámci jedné skupiny onemocnění, ať se již jedná o primárně rezistentní, například testikulární nádor s progresí v průběhu standardní chemoterapie, či vznik sekundární rezistence podmíněné přerůstající chemorezistentní subpopulací nádorových buněk v průběhu léčby chemoterapií první linie. Současná klinická onkologie staví na výsledcích klinických studií a za nejlepší léčebný standard je přijímán statisticky nejlepší léčebný postup, odpovídající dané histologické diagnóze a konkrétnímu klinickému stadiu, stanovenému na základě TNM klasifikace. Tato, svým způsobem neselektivní chemoterapie, v řadě případů může pacienta poškodit zbytečným toxickým působením neefektivní chemoterapie, prohloubením chemorezistence nádoru na jiná cytostatika, oslabením metabolismu a obranyschopnosti organismu. Jde ovšem také o zbytečné vynakládání finančních prostředků na cytostatika a podpůrnou léčbu.

Na základě testů chemorezistence by teoreticky bylo možné vybrat optimální složení chemoterapie z více možností standardních schémat, zvažovat zda vůbec chemoterapii zahájit, eventuálně zařadit do léčebného schématu nestandardně používaná cytostatika, včetně farmakologického ovlivnění mechanismů chemorezistence. Otázkou je postoj pacienta a příbuzných v případě nádorové polyrezistence na jejímž základě bychom eventuálně paliativní chemoterapii neindikovali.

Jednotlivé testy, odrážející s různou spolehlivostí a specificitou pravděpodobnou neúčinnost chemoterapie, je možno zařadit do několika kategorií:

1. **Nepřímé testy asociované s obecnou biologickou aktivitou nádoru** a sekundárně také s rezistencí k antiproliferační a genotoxické léčbě - proliferace, mitotická aktivita, proapoptotická

pohotovost, genomová instabilita, telomerázová aktivita a typ metabolismu pacienta (1).

2. **Testy založené na specifickém vztahu k určitému cytostatiku** - P-glykoproteinová detoxikační pumpa - taxany, antracykliny, inhibitory topoizomerázy, MRP transportní protein a léková rezistence u platinových derivátů, testy asociované přímo s mechanismem účinku jednotlivých cytostatik. Například thymidylát syntáza (TS) a dihydropyrimidin dehydrogenáza (DPD) v případě fluoropyrimidinů se v současné době považují za silný prediktivní faktor efektu terapie fluoropyrimidiny (TS, DPD) a vedlejších účinků vyplývajících z toxicity při poruchách DPD (2,3,4).
3. **Vyšetření receptorů hormonů**, například estrogenů, progesteronů nebo aromatázové aktivity patří do skupiny testů vázaných na mechanismus účinku antihormonálních preparátů v léčbě hormonálně dependentních nádorů.
4. Celé spektrum je doplněno o **testy přímé**, založené na testování citlivosti či rezistence resekovaného a explantovaného nádoru k jednotlivým cytostatikům v primokulturách či stabilizovaných kulturách *in vitro*. Nejčastěji se jedná o **EDR testy** (Extreme Drug Resistance) s autory deklarovanou 99% úspěšností predikce nádorové rezistence k testovanému cytostatiku a **MTT test**, což je kolorimetrická metoda s jistou možností poloautomatizace, což by mohlo přinést možnost rutinního vyšetření většího množství vzorků nádorové tkáně. Obecně lze konstatovat, že v současné době není možné rutinně provádění testování chemorezistence touto posledně jmenovanou metodou, která je technologicky náročnější, dosud ne zcela standardizovaná a jistě ani do budoucna nebude dostupná pro většinu pracovišť.

Kombinace jednotlivých testů skýtá samozřejmě i další možnosti využití, jako je například testování možností modulace chemorezistence (5,6,7). Kombinací cytoflowmetrického stanovení exprese P-glykoproteinu s *in vitro* expozičním testem rezistence k doxorubicinu byl v laboratorních podmínkách prokázán efekt tamoxifenu a cepharanthinu na snížení chemorezistence doxorubicinu k nádorovým buňkám onemocnělých gastrointestinálního traktu, stejně tak i jejich synergičtý efekt.

### Klinické indikace pro testování chemorezistence nádorů.

Jednoznačnou indikací k provádění výše uvedených testů chemorezistence je skupina nádorů, které patří mezi primárně rezistentní a pro které není standardizován žádný dostatečně účinný režim chemoterapie. Jedná se maligní melanom, adenokarcinom ledvin, nádory centrální nervové soustavy, nemalobuněčný karcinom plic, sarkomy měkkých tkání, hormonálně rezistentní karcinom prostaty, nádory dělohy a čípku, stejně jako nádory horní části zažívacího traktu, tedy jícnu, žaludku, pankreatu, jater a žlučových cest. Léčebné odpovědi na různé režimy chemoterapie v těchto indikacích zřídka přesahují 15-30%.

Druhou skupinu tvoří semirezistentní nádorová onemocnění jako jsou kolorektální karcinom, karcinom prsu, karcinom močového měchýře a karcinomy ORL oblasti.

Primárně chemosenzitivní nádory jako jsou karcinomy varlat, ovaríí, choriokarcinom a lymfomy asi není účelné vyšetřovat před zahájením chemoterapie první řady. Spolu s předchozími se však zde otevírá prostor pro testování chemorezistence v období relapsu onemocnění a po vyčerpání možností standardizované chemoterapie.

V současné době patří k nejčastěji testovaným karcinomům právě nádory zažívacího traktu, které jsou běžně resekovány a u nichž bývá k dispozici dostatek nádorové tkáně.

### Dosavadní výsledky klinického zkoušení predikce chemorezistence

V případě karcinomu žaludku pro klinické stadium II. a III. i přes radikální operační výkon včetně následné adjuvantní chemoterapie výsledky 5 letého přežívání jsou 5-20%. Při pokročilém onemocnění stadium IV. na paliativní chemoterapii pod 1%. Standardně se chemoterapie používá jako léčebná modalita v paliativní indikaci. Aplikace v adjuvantní či neoadjuvantní indikaci je předmětem klinického zkoušení. Možná právě cíleněji vedená adjuvance fluoropyrindiny pro selektovanou skupinu pacientů na základě testů chemorezistence může dlouhodobě výsledky přežívání zlepšit. V případě paliativní chemoterapie nám výsledky testů chemorezistence umožní vybrat nejvhodnější chemoterapeutické schéma z rutinně používaných (DDP/FU/FA, FAMTX, FAM, EAP, apod.). Na druhou stranu širší paleta testovaných cytostatik k rezistenci může alternativně poukázat na využití cytostatik, která se v dané indikaci standardně neobjevují, např. irinotecan, CPT-11 (8,9).

Zajímavé výsledky klinického zkoušení individualizované chemoterapie na základě MTT testů publikovali japonští autoři (10). U 20 pacientů s karcinomem žaludku ve stadiu IV. onemocnění popisují 12 klinických odpovědí (12/20, RR 60%), z toho 5 pacientů dosáhlo kompletní remise. Další 7 pacientů dosáhlo partiální remise, z toho 3 s maligním ascitem, 3 s metastatickým postižením uzlin, 1 s objemným intraabdominálním tumorem. Autoři testovali v *in vitro* podmínkách chemosenzitivitu MTT testem po předchozí purifikaci odebraného vzorku nádorové tkáně. Úspěšnost metody MTT testu byla 51 kultivací z 58 odebraných vzorků (88%), s tím že po zpracování snížili kontaminaci nádorových buněk stromatem na pouhých 10%. Zbývající počet 31 pacientů z 51 úspěšně testovaných obdrželo fluoropyrindiny v adjuvantní terapii. Doba přežívání pacientů byla sledována u pacientů po kurativním chirurgickém řešení původního klinického stadia III a IV (17). Zde byli pacienti pro adjuvantní chemoterapii rozděleni na chemosenzitivní (alespoň najedno z testovaných cytostatik FU, MMC,) a rezistentní na MMC a FU. Adjuvantní chemoterapie byla aplikována ve všech případech. Výskyt relapsů onemocnění byl v senzitivní podskupině ve 3/10 případech a v rezistentní podskupině v 18/22 případech s tím že doba do relapsu a doba přežívání byly signifikantně lepší pro podskupinu chemosenzitivních onemocnění dle výsledků testů *in vitro* ( $p < 0,005$ ).

Dále byla testována retrospektivně korelace tymidilát syntázy (TS) jako prognostického faktoru v případě karcinomu žaludku po kurativní resekcii (67 pacientů) s následnou adjuvantní chemoterapií 5-fluorouracilem, stadium III.B (pT3/pN2). Skupina pacientů TS negativních měla dobu přežití signifikantně lepší ( $p < 0,05$ ), 5leté přežití 42,3% než skupina TS pozitivní 25,1% ( $p < 0,05$ ) (18).

Více výsledků korelace chemorezistence s klinickou odpovědí je k dispozici v případě **kolorektálního karcinomu**. Aktivita tymidilát syntasy jako prediktivního faktoru chemosenzitivity k léčbě fluoropyrindiny byla již prokázána v řadě studií. V součas-

né době se hovoří o tymidilát syntase i jako o prognostickém faktoru v případě kurativně resekovaných karcinomů kolorekta (11,12). Pacienti byli rozděleni do skupiny TS negativní a TS pozitivní. Celková doba přežívání byla signifikantně lepší pro skupinu 107 pacientů TS negativních ve srovnání se skupinou 41 pacientů TS pozitivních ( $p = 0,0003$ ). Současně byl hodnocen i vliv adjuvantní chemoterapie na obě skupiny pacientů. V souboru TS negativních byl zaznamenán jen nevýznamný rozdíl v podskupinách s léčbou cytostatiky nebo bez chemoterapie. V souboru TS pozitivních pacientů podskupina s adjuvantní chemoterapií vykazovala signifikantní prodloužení doby přežití ve srovnání s podskupinou bez chemoterapie ( $p = 0,0439$ ). Jako adjuvantní chemoterapie byla podávána chemoterapie 5-fluorouracilem. Do budoucna může mít TS status vliv na vhodnost indikace adjuvantní chemoterapie v léčbě nádorů horní části gastrointestinálního traktu vůbec, či v případě kolorektálního karcinomu na složení adjuvantní chemoterapie. Částečnou odpověď budeme znát z výsledků EORTC studie, která selektuje nemocné s kolorektálním karcinomem pro chemoterapii 5-fluorouracilem nebo irinotekanem (CPT-11) právě podle stavu exprese tymidilát syntasy.

V léčbě pokročilého kolorektálního karcinomu byly výsledky MTT testů chemorezistence využívány v rámci klinického hodnocení jak v lokoregionální, tak i systémové aplikaci. V případě metastatického onemocnění do jater byla podávána intraarteriální chemoterapie cestou arteria hepatica (13). Autoři zde použili k predikci chemorezistence *in vitro* HTC assay. Korelace s klinickými výsledky je popisovaná pro kompletní a partiální remise 55%. Při výběru systémové chemoterapie byly zohledněny výsledky MTT testů u 15 pacientů s tím že klinická odpověď byla 5/15 s tím, že ve skupině odpovídajících na léčbu byl prokázán vyšší inhibiční efekt Cisplatinu (14). Obdobné závěry na základě MTT testů jsou i z pracoviště Dr. Hajdúcha z Laboratoře experimentální medicíny v Olomouci (9). Autoři se zamýšlí nad dobrými výsledky *in vitro* testů pro cisplatinu a patrně neprávem přehlíženým efektem platinových derivátů u karcinomu kolorekta.

Obdobně v případě **bronchogenního karcinomu** výsledky testů chemorezistence *in vitro* umožňují větší výběr ze spektra standardně používaných léčebných schémat. K testování by byl vhodný panel standardně používaných cytostatik jako cisplatinu, karboplatinu, topotekan, vinorelbin, vinblastin, paklitaxel, 5-fluorouracil, mitomycin C, etoposid a gemcitabin. Vzhledem k obtížnějšímu odběru dostatečného vzorku nádoru potřebného k testování nádorů plic nejsou zatím dostupná data klinické korelace. V případě podskupiny pacientů s extensivní formou malobuněčného karcinomu plic byla retrospektivně klinická korelace demonstrována současně i s ovlivněním délky přežití (15).

V případě **maligního melanomu** byla možnost vyhnout se neefektivní chemoterapii na základě testů chemorezistence potvrzena v retrospektivní studii (16). Celkově bylo testováno 26 onemocnění metastatického melanomu z nichž dle výsledku testů a možnosti sledování klinické odpovědi bylo pouze 19. Celkově bylo 8 pacientů označeno jako senzitivních na základě *in vitro* testů. Klinické odpovědi, z toho kompletní remise 1x a partiální remise 2x, byly zaznamenány v případě 3 senzitivních onemocnění (3/3). Stabilizace onemocnění byly zjištěny u dalších 4 chemosenzitivních případů a progresse onemocnění pouze u jednoho pacienta z podskupiny senzitivních. Naopak v 11 případech (10 rezistentních a 1 senzitivní) nastala progresse onemocnění.

V současné době probíhá jen několik aktivních studií k verifikaci testů chemorezistence klinickými korelátů. Jedná se o studii zaměřenou na recidivující **karcinom ovaria** (M. D. Anderson Protocol GYN 97), metastatický **karcinom prsu** (UCLA, M. D. Anderson a dalších 13 center v U.S.A.), neoadjuvantní chemoterapii pro **karcinom ovaria** (EORTC 55971) a rekurentní **glioblastom** (UCLA).

(Práce je podpořena grantem MŠMT J07/98-141100003)

### Literatura:

1. Žaloudík J.: Chemorezistence jako bioparametr prediktivní onkologii. E RA 2000, Brno 13.4.2000,123-124.
2. Coufal O, Žaloudík J, Malaska J, Vyzula R.: Tymidilát syntaza a její význam v prediktivní onkologii. Klinická onkologie, 2000, 4,116-121.
3. Kirihara Y, Yamoto W, Toge T, Nishiyama M.: Dihydropirimidine dehydrogenase, multidrug resistance-associated protein, and thymidilate synthase gene expression levels can predict 5-fluorouracil resistance in human gastrointestinal cancer cells. Int J Oncol 1999 Mar; 14(3): 551-556.

4. Gamelin E, Boisidron-Celle M, Guérin-Meyer V, Delva R, Lortholary A, Genevieve F, Larra F, Ibrah A, Robert J: Correlation between uracil and dihydrouracil plasma ratio fluorouracil (5-FU) pharmacokinetic parameters, and tolerance in patients with advanced colorectal cancer: A potential interest for predicting 5-FU toxicity and determining optimal 5-FU dosage. *IClin Oncol* 1999 Apr; 17(4): 1105-1110.
5. Hotta T, Tanimura H, Yamaue H, Iwahashi M, Tani M, Tsunoda T, Tamai M, Noguchi K, Mizobata S, Arai K, Terasawa H: Tamoxifen circumvents the multidrug resistance in fresh human gastrointestinal cancer cells. *Anticancer Res* 1997 Mar-Apr; 17(2A): 885-889.
6. Hotta T, Tanimura H, Yamaue H, Iwahashi M, Tani M, Tsunoda T, Tamai M, Noguchi K, Mizobata S, Arai K, Terasawa H: Modulation of multidrug resistance by cepharanthine in fresh human gastrointestinal tumor cells. *J Surg Res* 1996 Nov; 66(1): 31-35.
7. Hotta T, Tanimura H, Yamaue H, Iwahashi M, Tani M, Tsunoda T, Tamai M, Noguchi K, Mizobata S, Terasawa H: Synergistic effect of tamoxifen and cepharanthine for circumventing the multidrug resistance. *Hum Cell* 1995 Dec; 8(4): 185-188.
8. Tsunoda T, Tanimura H, Hotta T, Tani M, Iwahashi M, Tanaka H, Matsuda K, Yamaue H: *In vitro* antitumor effect of topoisomerase-I inhibitor, CPT11, on freshly isolated human gastric and colorectal cancer. *Anticancer Res* 1999; 19: 5451-5455.
9. Zaloudik J, Hajduch M, Coufal O, Kiss I, Vyzula R: Možnosti testování chemorezistence nádorů trávicího traktu. *Brněnské onkologické dny*, 24.-26.5.2000., abstr. 60
10. Yamaue H, Tanimura H, Noguchi K, Hotta T, Tani M, Tsunoda M, Iwahashi M, Tamai M, Iwakura S: Chemosensitivity testing of fresh human gastric cancer with highly purified tumor cells using MTT assay. *Br J Cancer* 1992; 66:794-799.
11. Takenoue T, Nagawa H, Matsuda K, Fujii S, Nita M E, Hatano K, Kitayan T, Muto T: Relation between thymidilate synthase expression and survival for colon carcinoma, and 'determination of appropriate application xxxxx fluorouracil by immunohistochemical method. *Ann Surg Oncol* 2000 Apr; 7(3): 193-198.
12. Edler D, Kressner U, Ragnhammar P, Johnston PG, Magnusson I, Glimel, Pahlman L, Lindmark G, Blomgren H: Immunohistochemically detected thymidilate synthase in colon cancer: an independent prognostic factor of survival.
13. Link K H, Kornmann M, Leder G H, Butzer U, Pillasch J, Staib L, Gansauge F, Beger H G: Regional chemotherapy directed by individual chemosensitivity testing in vitro: a prospective decision-aiding trial. *Clin Cancer Res* 1996 Apr; 2(4): 623-33.
14. Yamaue H, Tanimura H, Nakamori M, Noguchi K, Iwahashi M, Tani M, Hotta T, Murakami K, Ishimoto K: Clinical evaluation of chemosensitivity testing for patients with colorectal cancer using MTT assay. *Cancer Lett* 1996 Oct 1; 107(1): 117-123.
15. Gazdar AF, Steinberg S M, Russel E K, Linooil IL, Oie H K, Ghosh B C, Cotelingam J D, Johnson B E, Minna J D, Hide D C: Correlation of in vitro drug-sensitivity testing results with response to chemotherapy and survival in extensive-stage small cell lung cancer: a prospective clinical trial. *J Natl Cancer Inst* 1990; 82: 117-124.
16. Schandendorf D, Worm M, Algermissen B, Kohlms C M, Czarnetzki B M: Chemosensitivity testing of human malignant melanoma: A retrospective analysis of clinical response and in vitro drug sensitivity.
17. Furukawa T, Kubota T, Hoffman M: Clinical applications of the histoculture drug response assay. *Clin Cancer Res* 1995 Mar; 1: 305-311.
18. Suda Y, Kuwashima Y, Tanaka Y, Uchida K, Akazava S: Immunohistochemical detection of thymidilate synthase in advanced gastric cancer: a prognostic indicator in patients undergoing gastrectomy followed by adjuvant chemotherapy with 5-fluorouracil. *Gan To Kagaku Ryoho* 1999 Feb; 26(3): 321-327.