

Metody określające chemiowrażliwość komórek raka jajnika *in vitro* – perspektywy na przyszłość

Chemosensitivity testing in ovarian cancer – prospects for the future

Paulina Pogońska¹, Dariusz Wydra¹, Krystyna Serkies², Juliusz Kobierski¹, Anna Łojkowska¹

¹ Katedra i Klinika Ginekologii, Ginekologii Onkologicznej i Endokrynologii Ginekologicznej Gdańskiego Uniwersytetu Medycznego, Polska

² Katedra i Klinika Onkologii i Radioterapii Gdańskiego Uniwersytetu Medycznego, Polska

Streszczenie

Indywidualizacja leczenia chorych poprzez ocenę chemiowrażliwości komórek nowotworowych in vitro to jeden z głównych celów współczesnej onkologii. Dotychczasowe dane donoszą o korzyściach płynących ze stosowania testów laboratoryjnych określających chemiowrażliwość nowotworów złośliwych, niemniej jednak pozostaje to nadal kwestią otwartą.

Niniejsze opracowanie ma na celu przedstawienie metod oceny wrażliwości komórek raka jajnika na stosowane obecnie cytostatyki.

Metodą dotychczas najlepiej poznaną, o udokumentowanej skuteczności jest technika ATP-TCA (ang. ATP-based tumour chemosensitivity assay). Potencjalną możliwość badania wrażliwości komórek nowotworowych na chemioterapię stwarza ocena wielkości kolonii komórek raka jajnika na analizatorze xCELLigence. Zastosowanie tej metody w ocenie chemiowrażliwości pozostaje jednak w fazie badań.

Optymalizacja leczenia chorych z rakiem jajnika za pomocą testów in vitro mogłaby w przyszłości poprawić wyniki leczenia, a więc i wydłużyć czas przeżycia oraz poprawić jakość życia chorych, zmniejszyć narażenie na przedłużoną, często uporczywą chemioterapię, a także pozwoliłoby na lepsze wykorzystanie cytostatyków pod względem ekonomicznym.

Słowa kluczowe: **rak jajnika / protokół ATP TCA / chemioterapia /
/ testy chemiowrażliwości / system xCELLigence /
/ terapia personalizowana /**

Adres do korespondencji:

Paulina Pogońska

Klinika Ginekologii, Ginekologii Onkologicznej i Endokrynologii Ginekologicznej Gdańskiego Uniwersytetu Medycznego

Polska, 80-402 Gdańsk, ul. Kliniczna 1A

tel.: 58 349 34 41, fax: 58 341 80 03

e-mail: p.pogonska@interia.pl

Otrzymano: 18.09.2013

Zaakceptowano do druku: 09.04.2014

Paulina Pogońska et al. *Metody określające chemiowrażliwość komórek raka jajnika in vitro – perspektywy na przyszłość.*

Abstract

Individualization of treatment on the basis of in vitro chemosensitivity testing constitutes one of the aims of contemporary oncology. Although previous studies report advantages resulting from chemosensitivity laboratory tests, the issue remains an area of interest.

The aim of this study was to discuss chemosensitivity assay methods of ovarian cancer cells. ATP-TCA (ATP-based tumor chemosensitivity assay) is the most investigated chemosensitivity test in ovarian cancer, with well-documented efficacy. Potentially, it is possible to use the xCELLigence system to evaluate chemosensitivity of ovarian cancer cells by measuring their colony volume but application of this method remains in the experimental phase. Optimization of ovarian cancer treatment would improve chemotherapy results, thus increasing the overall survival, improving the quality of patient life, decreasing chemotherapy-related toxicity and resulting in economic benefits owing to better drug use.

Key words: ovarian cancer / ATP TCA / chemotherapy / chemosensitivity tests / xCELLigence system / individualized therapy /

Wstęp

Rak jajnika zajmuje szóste miejsce wśród nowotworów złośliwych u kobiet w Polsce, jest główną przyczyną zgonów w ginekologii onkologicznej [1]. Dane epidemiologiczne wskazują na stały, niewielki spadek zachorowalności i umieralności na przełomie ostatnich 30 lat, niemniej jednak rokowanie jest nadal bardzo poważne [2]. Ze względu na bezobjawowy przebieg wczesnych stadiów choroby oraz brak programów przesiewowych rozpoznanie stawiane jest często późno, co znacznie pogarsza rokowanie. Poważnym problemem w leczeniu nowotworów złośliwych jajnika jest również oporność, pierwotna lub wtórna, na stosowane leki, szczególnie na karboplatynę. Rak jajnika stanowi zatem bardzo poważny problem diagnostyczny, jak i terapeutyczny. Optymalnym leczeniem raka jajnika jest operacja cytoredukcyjna oraz chemioterapia oparta na paklitakselu oraz pochodnej platyny. U znacznej liczby chorych, mimo takiego postępowania, dochodzi do wznowy choroby nowotworowej. Szacuje się, iż około 75% chorych nie przeżywa 5 lat od rozpoznania choroby. U pacjentek, u których doszło do progresji raka jajnika mówimy o przetrwałej chorobie nowotworowej, u chorych tych chemioterapia obecnie stanowi leczenie paliatywne, ma na celu wydłużenie czasu przeżycia oraz poprawę jakości życia. Mimo wielu leków stosowanych w leczeniu uzupełniającym, nie istnieją ścisłe standardy postępowania w przypadkach, gdy chemioterapia pierwszego rzutu zawodzi. Leczenie uzależnione wówczas jest od toksyczności leków, wieku, stanu chorej itp.

Heterogeniczność guza, jak i zmienność osobnicza powodują, iż odpowiedź na leczenie jest różnorodna oraz trudna do przewidzenia. Ponadto typ histologiczny nowotworu złośliwego jajnika nie ma wartości prognostycznej w odniesieniu do odpowiedzi na dany schemat leczenia. Brak czynników predykcyjnych w diagnostyce histopatologicznej guza dodatkowo utrudnia wybór odpowiedniej terapii.

Biorąc pod uwagę niezadowolające wyniki leczenia raka jajnika opracowanie testów chemiowrażliwości *in vitro* może okazać się cennym narzędziem diagnostycznym w rękach klinicystów, dającym możliwość kwalifikowania każdej chorej z rozpoznaniem rakiem jajnika do leczenia według uzyskanego profilu chemiowrażliwości guza.

Testy określające chemiowrażliwość komórek nowotworowych in vitro

Indywidualizacja leczenia nowotworów złośliwych przy pomocy testów laboratoryjnych to niewątpliwie jeden z głównych celów współczesnej onkologii. Naukowcy od ponad 30 lat borykali się z trudnościami, takimi jak heterogeniczność guza, molekularne mechanizmy adaptacyjne komórek nowotworowych, skupiano się wówczas m.in. na metodach klonogenicznych, próby te obarczone były jednak licznymi problemami technicznymi [3, 4, 5]. Nadzieje związane z wprowadzeniem do diagnostyki technik laboratoryjnych wynikają zarówno z tzw. terapii personalizowanej, ograniczenia działań niepożądanych licznych schematów chemioterapii, jak również z racjonalizacji kosztów związanych zarówno z wykorzystaniem cytostatyków, jak i z leczeniem powikłań chemioterapii.

Wiele danych z piśmiennictwa obecnie dowodzi, że wprowadzenie tych metod pozwoliłoby lepiej dobrać terapię przeciwnowotworową, a co za tym idzie poprawić ogólne przeżycie chorych, jak i jakość ich życia. Opracowanie technik *in vitro* ma również ogromne znaczenie w przypadku rzadkich nowotworów, w których leczeniu brak jest standardowych schematów chemioterapii, jak również w testowaniu nowych leków przeciwnowotworowych.

Podjęmuje się obecnie różne próby oceny wartości predykcyjnej dla chemioterapii m.in. czynnościowego badania PET (pozytonowa tomografia emisyjna) [6]. Współcześnie prowadzone badania odnośnie nowotworów złośliwych, w tym również raka jajnika, dotyczą najczęściej testów pomiaru adenozyntrotrójfosforanu (ATP) z wykorzystaniem zjawiska luminescencji, testu MTT (ang. *methyl-thiazolyl-diphenyltetrazolium bromide*) oraz technik EDRA (ang. *extreme drug resistance assay*) i ChemoFX [7, 8]. Dysfunkcja genu BRCA 1 oraz zaburzenia szlaku naprawy DNA *homologous recombination-deficiency* także należą do badanych biomarkerów odpowiedzi na leczenie [9, 10, 11]. W raku jajnika nie ustalono dotychczas czynników klinicznych i patologicznych o wartości predykcyjnej w odniesieniu do odpowiedzi na systemowe leczenie do rutynowego zastosowania.

W pracy omówiono dwie techniki oraz ich przydatność, w raku jajnika na tle piśmiennictwa, komercyjnie dostępny test ATP-TCA (ang. *ATP-based tumour chemosensitivity assay*) oraz

pozostający w fazie badań test z użyciem systemu xCELLigence. W obu metodach analizie poddawany jest świeży materiał z guza lub popłuczyny z jamy brzusznej. Komputerowy wynik testu przedstawiany jest w formie graficznej i numerycznej.

ATP- TCA

Ocena chemiowrażliwości komórek nowotworowych na podstawie pomiaru adenozyntroójfosforanu ATP-TCA została opisana po raz pierwszy przez Andreottiego w latach 90. Technika ta pozwala na precyzyjne określenie zahamowania wzrostu komórek nowotworowych w obecności cytostatyków, wykorzystując do pomiaru zjawisko luminescencji. Analizie poddawane są próbki guza uzyskane podczas pierwotnej operacji bądź popłuczyny z jamy brzusznej, które po laboratoryjnej obróbce umieszczane są w studzienkach płytki polipropylenowej (20 tysięcy komórek na studzienkę), na których dokonuje się dalszych pomiarów. Jedna płytka zawiera kilkadziesiąt studzienek, co daje możliwość wykorzystania wielu leków przeciwnowotworowych, ich kombinacji oraz różnych stężeń. Precyzyjny pomiar rozpadu adenozyntroójfosforanu, niezbędnego nośnika energii w procesach metabolizmu komórkowego, możliwy jest dzięki reakcji z lucyferyną zachodzącej w obecności enzymu utleniającego – lucyferazy. W wyniku tej reakcji powstaje oksylucyferyna, AMP (adenozyntroójfosforan) oraz dochodzi do emisji fali świetlnej proporcjonalnej do oznaczanego ATP [12, 13, 14].

Potencjalne korzyści ze stosowania protokołu ATP-TCA w ocenie wrażliwości komórek raka jajnika na cisplatynę opisali w 1995 roku Andreotti i wsp. [12].

Wysoką czułość i specyficzność metody (odpowiednio 90% i 80%) wykazały badania Koechli i wsp. na grupie 65 chorych na raka jajnika (41 z guzem pierwotnym, 24 z nawrotowym) leczonych chemicznie na podstawie wyników testu ATP-TCA [15].

W 1998 niemieccy badacze (Kurbacher i wsp.) publikują wyniki pilotażowego, otwartego badania klinicznego potwierdzające przydatność metody w nawrotowym raku jajnika. Całkowity wskaźnik odpowiedzi ORR (ang. *objective response rate*), przeżycie wolne od progresji PFS (ang. *progression free survival*) oraz całkowite przeżycie chorych OAS (ang. *overall survival*) oceniono retrospektywnie u 30 chorych grupy kontrolnej, porównując wyniki z odpowiednio dobraną grupą pacjentek leczonych według uzyskanego profilu chemiowrażliwości *in vitro* (25 chorych). Czas obserwacji dla grupy kontrolnej oraz badanej wynosił odpowiednio: 83,5 vs 80 tygodni. Oceniane parametry w grupie kontrolnej i badanej wynosiły odpowiednio: ORR: 37%, vs 64% ($p=0.04$), PFS: 20 vs 50 tygodni ($p=0.003$) oraz OAS: 69 vs 97 tygodni ($p=0.145$) [16].

Wysoką korelację między wynikami leczenia prowadzonego na podstawie testu z ATP *in vitro* oraz decyzji klinicystów (94% skuteczności) wykazali Tian i wsp. badając grupę 34 chorych. Autorzy ci odnotowali 90% czułość, 91,7% specyficzność testu, dodatnią oraz ujemną wartość predykcyjną wynoszącą odpowiednio 94,7% vs 84,6% [17].

Równie wysoką zgodność odpowiedzi na empirycznie zastosowaną chemioterapię z wynikami chemiowrażliwości *in vitro* raka jajnika, ale także innych nowotworów ginekologicznych oraz raka piersi potwierdzają autorzy kolejnych prac [13, 5].

W 2007 roku Cree i wsp. opublikowali wyniki prospektywnego badania, w którym 147 chorych na nawrotowego raka jajnika było losowo przydzielanych do chemioterapii z udziałem

leków wybranych w oparciu o wynik testu ATP lub do leczenia zgodnie z decyzją lekarza. *Follow-up* wynosił 18 miesięcy. W ramieniu z protokołem ATP-TCA uzyskano wyższe odsetki odpowiedzi (41% vs 32%) przy czym, w tej grupie stosowano częściej kombinacje leków przeciwnowotworowych zamiast monoterapii (u 88% vs 64% chorych). Nie odnotowano różnic w przeżyciach całkowitych oraz w czasie wolnym od progresji choroby w obu ramionach [18].

Wyniki ostatnio publikowanych badań stale donoszą o korzyściach wynikających ze stosowania protokołu chemiowrażliwości ATP we wsparciu decyzji terapeutycznych w onkologii [19, 20, 21].

Metoda ATP-TCA obecnie uznana jest za najlepiej udokumentowaną oraz dobrze poznaną, której standaryzacja pozwala na zastosowanie w praktyce lekarskiej [9]. W przypadku raka jajnika dostępne testy komercyjne pozwalają na szybką oraz stosunkowo prostą ocenę profilu chemiowrażliwości badanych komórek.

Należy podkreślić, że przewaga ujemnej wartości predykcyjnej nad dodatnią, z punktu widzenia wyboru terapii, jest mniej korzystna oraz stanowi pewne ograniczenie metody.

Pomiar tempa rozpadu komórek raka jajnika na analizatorze Xcelligence

System xCELLigence wykorzystywany jest w prowadzeniu hodowli komórkowych *in vitro*, w badaniach cytotoksyczności związków chemicznych oraz ich wpływu na proliferację komórek, a także do badania adhezji i migracji komórek. Technika polega na pomiarze w czasie rzeczywistym zahamowania wzrostu kolonii komórkowej w dołkach analizowanej płytki [22]. Analizator xCELLigence wykorzystuje technologię złotych mikrosensorów pokrywających powierzchnię płytki, dzięki którym każda zmiana wielkości kolonii jest rejestrowana jako różnica impedancji elektrycznej mikrośrodowiska. Niewątpliwą zaletą metody jest dynamiczność pomiaru tj. możliwość modyfikacji stężeń badanych cytostatyków oraz tworzenia kombinacji leków poprzez dodawanie kolejnych w czasie rzeczywistym pomiaru. Możliwość jednoczesnego prowadzenia niezależnych doświadczeń oraz brak konieczności zakupu odczynników (fluorochromów, co ma miejsce w technice ATP) wpływa na zmniejszenie kosztów badania. Poza technicznymi trudnościami dotyczącymi hodowli komórkowej na wynik testu może mieć wpływ zanieczyszczenie próbki oraz brak pełnego przylegania komórek do płytki. Dotychczas opublikowano pojedyncze prace z wykorzystaniem pomiaru w czasie rzeczywistym przeżywalności komórek nowotworowych w obecności dawek terapeutycznych leków przeciwnowotworowych w badaniach przedklinicznych w tym na liniach komórkowych raka jajnika [23, 24].

Podsumowanie

Biorąc pod uwagę zgromadzone dane z piśmiennictwa należy wnioskować, iż opracowanie i wprowadzenie laboratoryjnych testów chemiowrażliwości, może w przyszłości stanowić cenne narzędzie w rękach klinicystów. Znajomość wrażliwości komórek guza pierwotnego, jak i nawrotowego na cytostatyki przed rozpoczęciem leczenia przyczynić się może do poprawy wyników leczenia raka jajnika. Pozwoli również na zmniejszenie kosztów chemioterapii, jak również związanych z leczeniem jej powikłań. W ocenie amerykańskich ekspertów skupionych przy

Paulina Pogońska et al. *Metody określające chemiowrażliwość komórek raka jajnika in vitro – perspektywy na przyszłość.*

American Society of Clinical Oncology z 2011 roku, na podstawie dotychczasowych danych stosowanie laboratoryjnych testów wrażliwości i oporności na cytostatyki powinno być ograniczone do badań klinicznych. Uważają oni jednocześnie, że ze względu na potencjalnie duże znaczenie testów *in vitro*, uczestniczenie w badaniach dotyczących tych technologii jest priorytetowe.

Wśród omówionych testów przedstawiona w pracy metoda ATP-TCA jest w raku jajnika najczęściej opisywaną. Druga, z użyciem systemu xCELLigence, wydaje się mieć potencjalnie duże znaczenie praktyczne [25]. Wdrożenie w przyszłości omówionych metod wymaga dalszych badań dotyczących ich standaryzacji, jak również możliwości ich wykorzystania w Polsce. Następnie należy ocenić odpowiedź na terapię, podyktowaną testem chemiowrażliwości, w oparciu o duże grupy badawcze oraz porównać wyniki opisanych technik u chorych z rakiem jajnika.

Oświadczenie autorów

1. Paulina Pogońska – autor koncepcji i założeń pracy, przygotowanie manuskryptu i piśmiennictwa – autor zgłaszający i odpowiedzialny za manuskrypt.
2. Dariusz Wydra – autor założeń pracy, analizy i interpretacji wyników, przygotowanie, korekta i akceptacja ostatecznego kształtu manuskryptu.
3. Krystyna Serskies – współautor tekstu pracy i protokołu, korekta i aktualizacja literatury.
4. Juliusz Kobierski – opracowanie piśmiennictwa, współautor tekstu pracy, przygotowanie manuskryptu.
5. Anna Łojkowska – opracowanie piśmiennictwa, współautor tekstu pracy, przygotowanie manuskryptu.

Źródło finansowania:

Praca nie była finansowana przez żadną instytucję naukowo-badawczą, stowarzyszenie ani inny podmiot, autorzy nie otrzymali żadnego grantu.

Konflikt interesów:

Autorzy nie zgłaszają konfliktu interesów oraz nie otrzymali żadnego wynagrodzenia związanego z powstawaniem pracy.

Piśmiennictwo

1. Wojciechowska U, Didkowska J, Zatoński W. Nowotwory złośliwe w Polsce w 2010 roku. Centrum Onkologii Instytut MC Skłodowskiej, Warszawa 2012.
2. Howlader N, Noone A, Krapcho M, [et al.]. SEER Cancer Statistics Review, 1975-2010, National Cancer Institute. Bethesda, MD, http://seer.cancer.gov/csr/1975_2010/, based on November 2012 SEER data submission, posted to the SEER web site, 2013.
3. Van Hoff D, Sandbach J, Clark G, [et al.]. Selection of cancer chemotherapy for a patient by an *in vitro* assay versus a clinician. *J Natl Cancer Inst* 1990, 82, 110-116.
4. Von Hoff D, Kronmal R, Salmon SE, [et al.]. A Southwest Oncology Group study on the use of a human tumor cloning assay for predicting response in patients with ovarian cancer. *Cancer* 1991, 67, 20-27.
5. Kurbacher C, Grecu O, Stier U, [et al.]. ATP chemosensitivity testing in ovarian and breast cancer, early clinical trials. *Recent Results Cancer Res* 2003, 30, 161-221.
6. Hendilisz A, Gollinopoulos V, Deleporte A, [et al.]. Preoperative chemosensitivity testing as predictor of treatment benefit in adjuvant stage III colon cancer (PePITA), protocol of a prospective BGDO (Belgian Group for Digestive Oncology) multicentric study. *BMC Cancer* 2013, 12, 13(1), 190.
7. Herzog TJ, Krivak TC, Fader AN, Coleman RL. Chemosensitivity testing with ChemoFx and overall survival in primary ovarian cancer. *Am J Obstet Gynecol* 2010, 203, 68, E1-6.
8. Burnstein HL, Mangu P, Somerfield MR, [et al.]. American Society of Clinical Oncology clinical practice guideline update on the use of chemotherapy sensitivity and resistance assays. *J Clin Oncol* 2011, 29, 3328-3330.

9. Dann RB, DeLoia JA, Timms KM, [et al.]. BRCA1/2 mutations and expression, response to platinum chemotherapy in patients with advanced stage epithelial ovarian cancer. *Gynecol Oncol* 2012, 125, 677-682.
10. Blecharz P, Szatkowski W, Bodzek M, Łuczyńska E. Clinical features and disease course in patients with BRCA1-dependent ovarian cancer. *Ginekolog Pol* 2012, 83, 353-356.
11. Mukhopadhyay A, Plummer ER, Elattar A, [et al.]. Clinicopathological features of homologous recombination-deficient epithelial ovarian cancers, sensitivity to PARP inhibitors, platinum, and survival. *Cancer Res* 2012, 72, 567556-82.
12. Andreotti PE, Cree IA, Kurbacher CH, [et al.]. Chemosensitivity testing of human tumors using a microplate adenosine triphosphate luminescence assay, clinical correlation for cisplatin resistance of ovarian carcinoma. *Cancer Res* 1995, 55, 5276-5282.
13. Hunter EM, Sutherland LA, Cree IA, [et al.]. Heterogeneity of chemosensitivity in human breast carcinoma, use of an adenosine triphosphate (ATP) chemiluminescence assay. *Eur J Surg Oncol* 1993, 19, 242-249.
14. Sevin BU, Peng ZL, Perras JP, [et al.]. Application of an ATP-bioluminescence assay in human tumor chemosensitivity testing. *Gynecol Oncol* 1988, 31(1), 191-204.
15. Koechli O, Sevin B, Haller U, (eds.). Chemosensitivity testing in gynecologic malignancies and breast cancer. *Basel, Karger*, 1994, 53-64.
16. Kurbacher CM, Cree IA, Bruckner HW, [et al.]. Use of an *ex vivo* ATP luminescence assay to direct chemotherapy for recurrent ovarian cancer. *Anticancer Drugs* 1998, 9(1), 51-57.
17. Tian HM, Shi XY, Fu J, [et al.]. Correlation between ATP bioluminescence tumor chemosensitivity assay and clinical response in ovarian cancer. *Zhonghua Zhong Liu Za Zhi* 2005, 27(5), 296-298.
18. Cree IA, Kurbacher CM, Lamont A, [et al.]. A prospective randomized controlled trial of tumour chemosensitivity assay directed chemotherapy versus physician's choice in patients with recurrent platinum-resistant ovarian cancer. *Anti-Cancer Drugs* 2007, 18, 1093-1101.
19. Chang J, Lee A, Lee J, [et al.]. Correlation between the molecular subtype of breast cancer and the *in vitro* adenosine triphosphate-based chemosensitivity assay. *J Korean Surg Soc* 2013, 84(6), 313-320. doi, 10.4174/jkss.2013.84.6.313.
20. Singer CP, Klingmüller F, Stratmann R, [et al.]. Response prediction to neoadjuvant chemotherapy, comparison between pre-therapeutic gene expression profiles and *in vitro* chemosensitivity assay. *PLoS One* 2013, 8(6), e66573. doi, 10.1371/journal.pone.0066573. Print 2013.
21. Zhao D, Zhang W, Li XG, [et al.]. Predicting clinical chemo-sensitivity of primary ovarian cancer using adenosine triphosphate-tumor chemosensitivity assay combined with detection of drug resistance genes. *Zhonghua Fu Chan Ke Za Zhi* 2011, 46(3), 193-198.
22. Ke N, Wang X, Xu X, Abassi YA. The xCELLigence system for real-time and label-free monitoring of cell viability. *Methods Mol Biol* 2011, 740, 33-43. doi, 10.1007/978-1-61779-108-6_6.
23. Caltová K, Cervinka M. Antiproliferative effects of selected chemotherapeutics in human ovarian cancer cell line A2780. *Acta Medica (Hradec Kralove)* 2012, 55(3), 116-124.
24. Kustermann S, Boess F, Buness A, [et al.]. A label-free, impedance-based real time assay to identify drug-induced toxicities and differentiate cytostatic from cytotoxic effects. *Toxicol In Vitro* 2013, 27(5), 1589-95. doi, 10.1016/j.tiv.2012.08.019. *Epub* 2012 Aug 28.
25. Limame R, Wouters A, Pauwels B, [et al.]. Comparative analysis of dynamic cell viability, migration and invasion assessments by novel real-time technology and classic endpoint assays. *PLoS One* 2012, 7(10), e46536. doi, 10.1371/journal.pone.0046536. *Epub* 2012 Oct 19.