

Л. А. СИВАК, Т. Є. ТАРАСЕНКО, С. А. ЛЯЛЬКІН, Н. В. КАСАП, М. Ю. КЛІМАНОВ,
Н. М. МАЙДАНЕВИЧ, А. В. АСКОЛЬСЬКИЙ, Н. О. ВЕРЬОВКІНА (Київ)

ПРОГНОЗУВАННЯ ІНДИВІДУАЛЬНОЇ ЧУТЛИВОСТІ ДО ХІМІОПРЕПАРАТІВ

Національний інститут раку <tarasenko28te@gmail.com>

Вивчення індивідуальної чутливості до хіміопрепаратів спрямовано на проведення лікування за найефективнішими схемами, які дозволять не тільки подовжити життя хворих на онкологічні захворювання, але й покращити його якість, усунувши небажану токсичність.

Ключові слова: онкологія, хіміотерапія, хіміочутливість.

Хіміотерапія (ХТ) є одним з основних компонентів комплексного лікування хворих на онкологічні захворювання. Понад 60 % хворих отримують ХТ на різних етапах лікування. Проте об'єктивного ефекту вдається досягти лише у 70–80 % хворих, що в значній мірі пов'язано з розвитком первинної чи набутої у процесі лікування хіміорезистентності (ХР) пухлинних клітин. Нині активно вивчають методи індивідуалізації вибору схем ХТ, спрямовані на покращання безпосередніх та віддалених результатів лікування, захист хворих від недоцільно підібраних токсичних препаратів.

За сучасними уявленнями, ідеальний метод прогнозування хіміочутливості (ХЧ) теоретично повинен відповідати не менше трьом основним критеріям: бути швидким у використанні, придатним для тестування пухлин різних гістотипів і мати високу прогностичну точність. Проте ряд лабораторних *in vitro* методів оцінки ХЧ пухлинних клітин не відповідає таким вимогам, тому пошук високоінформативних, простих, технічно та матеріально доступних тестувань є надзвичайно актуальною проблемою онкології.

У клінічній практиці використовують такі методики: клонування пухлинних клітин у напіврідкому агарі, АТФ-тест (аденозинтрифосфат), МТТ-тест (мікротетразолієвий), DISC-аналіз (диференційоване забарвлення цитотоксичності), HDRA-тестування (хіміочутливість гістокультури) [20].

Метод клонування пухлинних клітин дозволяє визначити ХР з вірогідністю 85–99 % та з ХЧ 70–80 %. Важливо при цьому вимірювати не ріст клітинної популяції, а інгібування її росту. Недоліком методики є потреба у значній кількості злужісних клітин, що є проблематичним через низькі клоногенні властивості більшості пухлин [1].

Найпопулярнішим тестуванням є оцінка АТФ-азної активності пухлинних клітин, що культивуються *in vitro* за наявності цитостатичних агентів. Цю методику можна застосовувати як для солідних пухлин, так і для метастатичних випотів, а за одне тестування можливо оцінити до 8 препаратів та їх комбінацій. За даними ряду авторів [8, 10], індивідуально підібрані протипухлинні препарати за допомогою АТФ-азної активності пухлинних клітин мали в 3 рази вищу швидкість відповіді та в 2 рази кращі показники виживаності порівняно з емпірично підібраними режимами ХТ. Точність визначення ХЧ за цією методикою становить 85–90 %, а ХР – 100 % [8, 10].

У дослідженні Y. V. Moon та співавт. [12] показано різну відповідь на лікування препаратами платини хворих на недрібноклітинний рак легень: за допомогою АТФ-тесту визначали платиначутливу та платинорезистентну групи хворих; очікувані результати лікування збігались у 68,8 % випадків.

Високу діагностичну цінність АТФ-аналізу підтвердили Н. А. Кім та співавт. [9], порівнюючи ХЧ у хворих на рак грудної залози, яким було показано проведення неоад'ювантної ХТ за стандартною схемою доксорубіцин+паклітаксел/доцетаксел: чутливість, специфічність, прогностичність позитивного та негативного результатів і точність діагностики становили 78,6; 100; 100; 66,7 і 85 % відповідно.

S. S. Nan та співавт. [4] встановили кореляцію між даними АТФ-тесту та клінічною відповіддю хворих на рак яєчників: чутливість, прогностичність позитивного результату і точність – 94,1; 94,1 та 90 % відповідно.

У 2011 р. Н. Нуг та співавт. [5] навели результати дослідження 63 хворих на колоректальний рак з метастазами в печінку. Хворих було рандомізовано на дві групи: А ($n = 32$) – отримували ХТ за стандартними схемами FOLFOX чи FOLFIRI; В ($n = 31$) – отримували ХТ з урахуванням результатів АТФ-аналізу на чутливість до 5-фторурацилу, оксаліплатину та іринотекану. Режим FOLFOX частіше використовували в групі А – у 26 з 32 (81,3 %) порівняно з групою В – у 20 з 31 (64,5 %) відповідно. У групі В виявлена краща ефективність лікування – 48,4 %, ніж в групі А, – 21,9 %. Крім того, у групі В була вищою резектабельність вогнищ у печінці – 35,5 % проти 12,5 %. Середня тривалість періоду від початку ХТ до проведення оперативного втручання становила 11 циклів у групі А та 8 циклів – у групі В. Це дослідження показало, що у разі прогнозування індивідуальної чутливості при виборі хіміопрепаратів на основі даних АТФ-аналізу можливо покращити ефективність лікування та підвищити резектабельність у первинно неоперабельних хворих.

У дослідженні Yu. Park та співавт. [14], проведеного у 2007–2010 рр. на 243 зразках тканин після гастректомії з приводу раку шлунка, оцінювали ефективність 11 хіміопрепаратів: етопозиду, доксорубіцину, епірубіцину, мітоміцину, 5-фторурацилу, оксаліплатину, іринотекану, доцетакселу, паклітакселу, метотрексату та цисплатину за допомогою АТФ-аналізу. Неінформативним тест виявився у 1,6 % (4/243). Найвищий рівень клітинної загибелі отримали при використанні етопозиду – 35,9 %, а найнижчий метотрексату – 16,6 %. Оксаліплатин був активнішим на початкових стадіях раку шлунка, а при поширених формах – доцетаксел. Вивчали також залежність між ХЧ до доксорубіцину, епірубіцину і мітоміцину та ураженням регіонарних лімфатичних вузлів: у групі з негативними лімфатичними вузлами рівень загибелі клітин був значно вищим.

МТТ-тестування – методика кількісного визначення ступеня пригнічення дегідрогеназної активності пухлинних клітин. Порівняно з іншими *in vitro* методами прогнозу індивідуальної чутливості до хіміопрепаратів МТТ-тест досить простий у проведенні, потребує незначної кількості клітинного матеріалу. J. M. Sargent [1], використовуючи цю методику у хворих на рак яєчників, отримав позитивні результати: кореляція між відповіддю *in vitro* і клінічними даними становила 98 %.

J. M. Xu та співавт. [19] вивчали порівняльну ХЧ у хворих з поширеним раком грудної залози: 156 випадків розподілено на дві групи – у 83 проводили МТТ-тестування, у 73 не проводили. Відповідь на лікування становила 76,7 та 43,8 % відповідно.

У 2008 р. опубліковано результати ретроспективного дослідження Wu Bin та співавт. [2], у якому не виявлено значущої переваги використання МТТ-аналізу. Так, 353 хворих на рак шлунка було рандомізовано на дві групи для проведення ад'ювантної ХТ (цисплатин, 5-фторурацил, мітоміцин, доксорубіцин, паклітаксел, доцетаксел): 157 хворих отримували препарати згідно з даними МТТ-аналізу, а 196 – ХТ за емпірично підібраними режимами. Загальна 5-річна виживаність становила 47,5 та 45,1 % відповідно. Автори зазначили, що при тестуванні на

визначення індивідуальної ХЧ не виявлено суттєвого впливу на віддаленні результати лікування.

Згідно з методикою Н. Mueller [13], термін культивування пухлинних клітин як для АТФ-, так і МТТ-методів становив 72 год, проте АТФ-метод навіть через 1 год від початку культивування показав ефект цитотоксичних препаратів. В основі методики МТТ-аналізу лежить відновлення НАДФ-Н-залежними ферментами тетразолієвого барвника в нерозчинний формазин, що забарвлює живі клітини в пурпуровий колір. Однак зниження метаболічної активності не тотожне з цитотоксичністю, а може мати місце при цитостатичному ефекті (зміщення від проліферації до стану спокою) і таким чином мають місце хибні результати (таблиця).

Ефективність тестів *in vitro* для визначення хіміочутливості солідних пухлин

| Автор | Пухлина | Вид дослідження | Кількість хворих, <i>n</i> | Відповідь на лікування, % |
|--------------------------------|------------------------------|-----------------|----------------------------|---------------------------|
| T. Furukawa та співавт., 1995 | Рак шлунка | HDRA-тест | 107 | 92,1 |
| T. Furukawa та співавт., 1995 | Колоректальний рак | HDRA-тест | 109 | 92,1 |
| J. M. Xu та співавт., 1999 | Рак грудної залози | МТТ-тест | 73 | 76,7 |
| Y. Hasegawa та співавт., 2007 | Пухлини голови та шиї | HDRA-тест | 49 | 77,8 |
| Y. V. Moon та співавт., 2007 | Недрібноклітинний рак легень | АТФ-тест | 34 | 68,8 |
| T. Yoshimasu та співавт., 2007 | Недрібноклітинний рак легень | HDRA-тест | 359 | 83 |
| S. S. Han та співавт., 2008 | Рак яєчників | АТФ-тест | 29 | 90 |
| H. A. Kim та співавт., 2008 | Рак грудної залози | АТФ-тест | 43 | 85 |
| J. H. Kim та співавт., 2010 | Рак шлунка | АТФ-тест | 48 | 77,8 |
| R. Kato та співавт., 2011 | Рак шийки матки | HDRA-тест | 54 | 77,8 |
| W. Q. Ge та співавт., 2012 | Рак сечового міхура | АТФ-тест | 58 | 74,3 |
| Y. S. Yoon та співавт., 2012 | Колоректальний рак | HDRA-тест | 324 | 66,3 |
| T. Uguno та співавт., 2015 | Рак щитоподібної залози | HDRA-тест | 22 | 84,2 |

Необхідно зазначити, що АТФ- і МТТ-тести не можна застосовувати при кількості злякисних клітин у субстраті менше 80 %. У такому випадку необхідно провести більш трудомісткий, але й інформативніший DISC-аналіз, який дозволяє диференціювати малігнізовані і занесені незлякисні клітини, мертві клітини. Зразки клітин для DISC-аналізу слід підготувати у суспензованому вигляді. Шляхом об'єднання з методикою проточної цитометрії з'явилась можливість автоматизованої оцінки життєздатності клітин – AutoDISC [16].

Основою HDRA-тесту є культивування тонких зрізів пухлини (близько 400 мкр) на спеціальних мембранах за різних концентрацій хіміопрепаратів, із збереженням міжклітинних контактів.

За допомогою HDRA-тесту T. Uguno та співавт. [18] вивчали ХЧ у хворих на рак щитоподібної залози до паклітакселу, доцетакселу, адриаміцину, недаплатину, цисплатину, карбоплатину, етопозиду, 5-фторурацилу, мітоміцину С та циклофосфаміду. Найефективнішим був паклітаксел – 86,2 %. Як неоад'ювантну ХТ його отримало 59 % хворих на рак щитоподібної залози IVB–IVC стадій в режимі 80 мг/м² щотижня, 4–8 курсів. Для 84,2 % хворих стало можливим оперативне втручання після індукційної ХТ паклітакселом.

R. Kato та співавт. [7] використали HDRA-тест для визначення ХЧ до недаплатину у хворих на рак шийки матки: точність очікуваної відповіді становила 77,8 %; позитивний ефект – 100 %, негативний – 55,6 %.

Протягом 11 років (1994–2005 рр.) Т. Yoshimasu та співавт. [21] досліджували ХЧ HDRA-тестуванням для 359 випадків недрібноклітинного раку легень. Вивчали ефективність цисплатину, доксорубіцину, мітоміцину С, 5-фторурацилу, доцетакселу, паклітакселу, етопозиду, іринотекану та гемцитабіну. Успішне застосування HDRA-методики зареєстровано в 97,4 % випадків; точність очікуваної відповіді – 83 %.

ХЧ до комбінації таксолу з карбоплатином досліджували Р. S. Jung та співавт. [6] у хворих на поширений епітеліальний рак яєчників: HDRA-аналіз проведено в 104 зразках пухлин після циторедуктивного втручання. Чутливим до лікування вважали позитивний ефект обох препаратів, резистентним – відсутність ефекту після впливу одного препарату чи їх комбінації. Рівень рецидиву захворювання був нижчим у хіміочутливій групі, ніж у резистентній, – 29,2 % проти 69,8 % відповідно. У хіміочутливій групі достовірно тривалішим був період без прогресування хвороби порівняно з резистентною групою – 34 міс проти 16 міс відповідно.

Зручний, менш інвазивний та простіший в рутинному використанні аналіз периферичної крові для виявлення циркулюючих пухлинних клітин (ЦПК), різних біологічних маркерів, таких як ctDNA (циркулюючі пухлинні ДНК), мРНК, протеїнів. Більше того, ЦПК та циркулюючі молекули вивільнюються з різних локусів пухлини, що важливо, враховуючи її гетерогенність. Недоліком методики є виявлення дуже низької концентрації ЦПК в крові, а також їх суміш з нормальними клітинами, що потребує надзвичайно чутливих і специфічних методів [12].

Враховуючи, що проведені дослідження з визначення індивідуальної ХЧ нечисленні, з невеликою вибіркою та не задовольняють загальним вимогам включення їх до протоколів лікування, American Society of Clinical Oncology (ASCO) не рекомендує для рутинного використання жоден з дійсних аналізів *in vitro* в клінічній практиці. Нині тактика лікування продовжує враховувати дані клінічних досліджень, властивості пухлини та стан пацієнта [3].

Завдяки швидкому розвитку молекулярної онкології з'явилися нові методи вивчення ХЧ: SNP (single nucleotide polymorphism), SEP (serial gene profiling), визначення рівня експресії мікроРНК, мутаційний аналіз ctDNA/DNA метилування, скринінг siRNA, shRNA, dsRNA, дослідження хромосомних порушень, білкових структур. Безперечно молекулярні підходи найбільш інформативні, проте пухлини одного виду можуть мати багато різних варіантів на генетичному, протеомному й епігенетичному рівнях, а кожен з них – різні ХЧ та ХР. Крім того, результати різних молекулярних аналізів складно зіставити між собою для порівняння й узагальнення [9].

Головною причиною неефективності ХТ вважають формування фенотипу множинної медикаментозної стійкості (ММС) – набуття пухлинними клітинами властивості виживати в умовах високих доз широкого спектра хіміопрепаратів. Розрізняють два типи ММС – первинну, що залежить від індивідуальних особливостей пухлини, її гістогенезу, при якій усі пухлинні клітини є ХР ще до початку лікування, та набуто (адаптивну) ММС, яка виникає в процесі ХТ. Встановлено, що в основі ММС лежить зниження внутрішньоклітинної концентрації протипухлинних препаратів, зумовлене активним АТФ-залежним виведенням речовин у міжклітинне середовище за допомогою білка плазматичної мембрани Р глікопротеїну (Pgp), який кодується геном MDR1 (multi drug resistance). Визначення рівня цього білка можливе за допомогою кількісної полімеразної ланцюгової реакції (ПЛР) в режимі реального часу. При високому рівні експресії генів ММС (MDR, MRP, LRP, BCRP) слід починати ХТ I лінії відразу із застосуванням агресивних програм.

Отже, згідно з результатами пошук найбільш оптимальних підходів до визначення ХЧ є актуальною проблемою. Дотепер залишається ряд нез'ясованих питань:

має місце різна відповідь на ХТ при первинних процесах, рецидивах та метастатичних вогнищах [11, 15]. У разі дослідження *in vitro* не враховується вплив пухлинного мікрооточення на ефективність лікування, нівелюється імунне середовище. Досліджуючи лише пухлинний субстрат, неможливо оцінити ступінь токсичного впливу хіміопрепаратів на нормальні клітини і таким чином прогнозувати ризики токсичного впливу лікування на організм у цілому [8, 17]. Разом з тим упровадження методів дослідження індивідуальної чутливості до ХТ у клінічну практику онкологічних установ потребує сучасного високотехнологічного обладнання і матеріально-технічного оснащення та водночас загальнодоступного для хворих.

Таким чином, перспектива оптимізації методу ХТ хворих на онкологічні захворювання пов'язана з прогнозуванням індивідуальної чутливості до препаратів, що дасть можливість провести лікування в оптимальні терміни за найефективнішими схемами, подовжити тривалість життя хворих та поліпшити його якість.

Список літератури

1. *Kurilyak O. A.* Mikrotetrazolievyy test v prognozirovaniy himiochuvstvitel'nosti karcinom yaichnikov cheloveka (eksperimental'noe issledovanie): Avtoref. dis. ... kand. biol. nauk. – М., 1993. – 24 с.
1. *Kurilyak O. A.* Mikrotetrazolievyy test v prognozirovaniy himiochuvstvitel'nosti karcinom yaichnikov cheloveka (eksperimental'noe issledovanie): Avtoref. dis. ... kand. biol. nauk. – М., 1993. – 24 с.
2. *Bin Wu, Zhu J. S., Zhang Y.* et al. Predictive value of MTT assay as an *in vitro* chemosensitivity testing for gastric cancer: One institution's experience // *World J. Gastroenterology*. – 2008. – Vol. 14, N 19. – P. 3064–3068.
3. *Burstein H. J.* American Society of Clinical Oncology clinical practice guideline update on the use of chemotherapy sensitivity and resistance assays // *J. Clin. Oncology*. – 2011. – Vol. 29, N 24. – P. 3328–3330.
4. *Han S. S., Choi S. H., Lee Y. K.* et al. Predictive value of individualized tumor response testing by ATP-based chemotherapy response assay in ovarian cancer // *Cancer Invest*. – 2008. – Vol. 26, N 4. – P. 426–430.
5. *Hur H., Kim N. K., Kim H. G.* et al. Adenosine triphosphate-based chemotherapy response assay-guided chemotherapy in unresectable colorectal liver metastasis // *Br. J. Cancer*. – 2012. – Vol. 106, N 1. – P. 53–60.
6. *Jung P. S., Kim D. Y., Kim M. B.* et al. Progression-free survival is accurately predicted in patients treated with chemotherapy for epithelial ovarian cancer by the histoculture drug response assay in a prospective correlative clinical trial at a single institution // *Ant. Research*. – 2013. – Vol. 33, N 3. – P. 1029–1034.
7. *Kato R., Hasegawa K., Achiwa Y.* et al. Predicting nedaplatin sensitivity of cervical cancer using the histoculture drug response assay // *Eur. J. Gynaecology Oncology*. – 2011. – Vol. 32, N 4. – P. 381–386.
8. *Kern D. H., Mizuno Y., Hashimura T.* et al. Comparison of drug sensitivity among tumor cells within a tumor between primary and metastases, and between different metastases in the human tumor colony-forming assay // *Cancer Research*. – 1984. – Vol. 44. – P. 2309–2312.
9. *Kim H. A., Yom C. K., Moon B. I.* et al. The use of an *in vitro* adenosine triphosphate-based chemotherapy response assay to predict chemotherapeutic response in breast cancer // *Breast*. – 2008. – Vol. 17, N 1. – P. 19–26.
10. *Kurbacher C. M., Grecu O. M., Stier U.* et al. ATP chemosensitivity testing in ovarian and breast cancer: early clinical trials // *Recent Results Cancer Res*. – 2003. – Vol. 161. – P. 221–230.
11. *Michalski C. W., Erkan M., Sauliunaite D.* et al. Ex vivo chemosensitivity testing and gene expression profiling predict response towards adjuvant gemcitabine treatment in pancreatic cancer // *Br. J. Cancer*. – 2008. – Vol. 99, N 5. – P. 760–767.
12. *Moon Y. W., Kim S. W., Nam E. J.* et al. Adenosine triphosphate-based chemotherapy response assay (ATP-CRA)-guided platinum-based 2-drug chemotherapy for unresectable non-small-cell lung cancer // *Cancer*. – 2007. – Vol. 109, N 9. – P. 1829–1835.
13. *Mueller H., Kassack M. U., Wiese M.* Comparison of the usefulness of the MTT, ATP and Calcein Assays to predict the potency of cytotoxic agents in various human cancer cell lines // *J. Biomolecular Screening*. – 2004. – Vol. 9, N 6. – P. 2004.

14. *Park Yu., Kim Y. S., Bang S.* et al. In Vitro Adenosine Triphosphate Based Chemotherapy Response Assay in Gastric Cancer // *J. Gastric. Cancer.* – 2010. – Vol. 10, N 4. – P. 155–161.
15. *Phillips R. M., Bibby M. C., Double, J. A.* A Critical Appraisal of Predictive Value of in Vitro Chemosensitivity Assays // *JNCI.* – 1990. – Vol. 82. – P. 1457–1468.
16. *Schinköthe T., Thiruchittampalam D., Schmidt A.* et al. The AutoDiSC: development and validation of a novel chemotherapy sensitivity and resistance assay // *An. Res.* – 2013. – Vol. 33, N 6. – P. 2491–2498.
17. *Susan Jenks* Chemosensitivity Assays: Still Eyeing the Clinic // *J. Natl. Cancer Inst.* – 2012. – Vol. 104 (Iss. 23). – P. 1775–1777.
18. *Urano T., Masaki Ch., Akaishi Ju.* et al. Chemosensitivity of anaplastic thyroid cancer based on a histoculture drug response assay // *Int. J. Endocrinology.* – 2015. – Vol. 967. – P. 286.
19. *Xu J. M., Song S. T., Tang Z. M.* et al. Predictive chemotherapy of advanced breast cancer directed by MTT assay in vitro // *Br. Cancer Res. Treatment.* – 1999. – Vol. 53, N 1. – P. 77–85.
20. *Yongzhuang Su.* Cancer chemosensitivity testing: review // *J. Cancer Therapy.* – 2014. – Vol. 5. – P. 672–679.
21. *Yoshimasu T., Oura S., Hirai I.* et al. Data acquisition for the histoculture drug response assay in lung cancer // *J. Thoracic Cardiovascular Surgery.* – 2007. – Vol. 133, N 2. – P. 303–308.

ПРОГНОЗИРОВАНИЕ ИНДИВИДУАЛЬНОЙ ЧУВСТВИТЕЛЬНОСТИ К ХИМИОПРЕПАРАТАМ

*Л. А. Сивак, Т. Е. Тарасенко, С. А. Лялькин, Н. В. Касап, М. Ю. Климанов,
Н. Н. Майданевич, А. В. Аскольский, Н. О. Верёвкина (Киев)*

Изучение индивидуальной чувствительности к химиопрепаратам направлено на проведение лечения по наиболее эффективным схемам, которые позволят не только продлить жизнь пациентов с онкологическими заболеваниями, но и улучшить её качество, устранить нежелательную токсичность.

Ключевые слова: онкология; химиотерапия; химиочувствительность.

PREDICTION OF INDIVIDUAL SENSITIVITY FOR CHEMOTHERAPY

*L. A. Syvak, S. A. Lyalkin, T. Ye. Tarasenko, N. V. Kasap, M. Y. Klimanov,
N. N. Maydanevich, A. V. Askolsky, N. O. Verovkina (Kyiv)
National cancer institute (Kyiv, Ukraine)*

The study of individual sensitivity to chemotherapy drugs is aimed at providing treatment with the most effective schemes that will not only prolong the life of patients with cancer, but also improve its quality and eliminate unwanted toxicity.

Key words: oncology; chemotherapy; chemosensitivity.