

CONTRIBUȚII LA STUDIUL SENSIBILITĂȚII LA CITOSTATICE IN VITRO A TUMORILOR OVARIENE MALIGNE

Lilla Lőrinczi

Disciplina de microbiologie
Universitatea de Medicină și Farmacie Târgu-Mureș

Datele statistice din ultimii ani pun în evidență o creștere a numărului de îmbolnăviri prin cancer de ovar. Alegerea unui tratament adecvat pare posibilă, datele bibliografice evidențiind o corelare a sensibilității in vivo - in vitro față de agenții citostatici în 40-80% a cazurilor, iar a rezistenței în 90-100%.

Date bibliografice legate de aplicarea oncobiogramei:

Folosirea celulelor tumorale primare pentru testarea substanțelor antineoplazice a fost raportată prima dată de *Hirschberg* (8), apoi de *Biesele* (citat de *Tanneberger*).

Cercetările complexe în acest domeniu sunt legate de numele lui *Eagle* și *Foley* (5).

Aprecierea efectului citostatic al unei substanțe poate fi studiat prin:

- urmărirea modificărilor morfologice ale celulelor;
- determinarea numărului de celule vii înainte și după tratare cu citostatice;
- determinarea zonei de inhibiție a creșterii culturilor de organe în prezența citostaticului;
- urmărirea modificărilor biochimice (modificări de pH, determinarea activității fosfatazei acide etc.);
- inhibarea incorporării timidinei și uridinei tritiate;
- test de formare a coloniilor - Soft Agar Colonia Assay;
- test de heterotransplantare - Subrenal Capsel Assay.

După *Sanfilippo* (12) pentru studierea efectului substanțelor chimioterapice ar fi trei metode:

- studierea metabolismului celular;
- urmărirea viabilității celulelor;
- capacitatea celulelor de a forma colonii pe geloză.

Autorul este de părere că predicția rezistenței este în general corectă, însă precizarea sensibilității celulelor tumorale nu totdeauna corespunde observațiilor clinice.

Baker și colab. (3) au introdus o metodă nouă de cultivare a celulelor tumorale - Adhesive Tumour Cell Culture System (ATCCS). Metoda ATCCS facilitează cultivarea celulelor tumorale. Acestea in vitro pot adera foarte greu la suprafața recipientului, fenomen care frânează multiplicarea

celulelor. După observațiile autorilor tumorile solide au putut fi cultivate în 70% a cazurilor prin metoda lor.

Hernádi și colab. (7) raportează folosirea metodei lui *Salmon* și *Hamburger* (11) pentru testarea sensibilității celulelor tumorale față de ciclofosamidă, adică melfalan, platidiam, adriblastin. Celulele din ascită au fost trecute printr-un filtru sintetic, iar fragmentele tumorale au fost sectionate și apoi filtrate obținându-se celule izolate. Determinarea viabilității celulelor s-a făcut cu colorantul albastru tripan. Incubarea cu citostatice s-a efectuat timp de o oră la 37°C, iar apoi spălarea se face cu soluția Hanks. Din fiecare lot 1 ml a fost așezat pe suprafața mediului McCoy cu 5% geloză ($3-5 \cdot 10^5$ celule/ml). Incubarea s-a efectuat în prezența de CO₂ 5% la 37°C. Examinarea culturilor s-a făcut în ziua a 8-a și a 16-a urmărind apariția microcoloniiilor. În cazul în care față de martor scăderea formării coloniilor a fost sub 33% celulele au fost rezistente, iar dacă această scădere a fost peste 33% respectiv 66% celulele au fost considerate ca fiind sensibile față de citostaticul testat.

Metodă similară este folosită de *Aapro* și colab. (1) pentru studierea tumorilor ovariene.

Pe baza unor observații de peste două decenii *Nissen* (10) și *Tanneberger* trec în revistă metodele aplicate pentru testarea sensibilității tumorilor față de citostatice.

Material și metodă

Am studiat sensibilitatea in vitro în 15 cazuri de tumori ovariene (histopatologic adenocarcinoame), prin efectuarea oncobiogramei pe culturi de celule tumorale, obținute prin tripsinizarea fragmentelor tumorale sau din lichidul ascitic. Până la prelucrare fragmentele tumorale au fost ținute în soluția Hanks. După tripsinizare a fost controlată viabilitatea celulelor cu albastru de tripan 1%. Pentru cultivarea celulelor am folosit mediul M199 (Institutul Cantacuzino) cu ser de vițel 10% și antibiotice (penicilină 10U/ml, streptomycină 50μg/ml). În experiențe au fost folosite următoarele citostatice: florafur, platidiam, adriblastin, vincristin, vinblastin, farmorubicin, bleomycin, în concentrații apropiate de cele realizate in vivo. După incubare timp de 24 de ore la 37°C s-a controlat multiplicarea celulelor cu ajutorul microscopului invers. Celulele rezistente la un anumit citostatic își păstrează viabilitatea, formând frecvent microcolonii, cele sensibile nu se multiplică. După 48 de ore se verifică viabilitatea celulelor cu albastru de tripan. Se numără celulele care absorb colorantul dintr-o populație de 100 de celule și se stabilește raportul dintre celulele vii (incolore) și moarte (colorate albastru). Se fac frotiuri colorate Giemsa în vederea studierii modificărilor morfologice, comparativ cu celulele din

recipientul martor, fără citostatice. Modificările apar la nivelul membranei citoplasmatică, care devine fragmentată și apare o colorație inegală la nivelul citoplasmei și al nucleului. Dimensiunea celulelor este mai redusă față de celulele martor. În interiorul celulei apar frecvent granulații compacte și vacuolizare pronunțată. Când modificările morfologice nu au fost apreciable, și nici colorația vitală nu ne-a furnizat date apreciable, din sedimentul celulelor spălate cu SST am efectuat studierea activității dehidrazice prin adăugarea de albastru de metilen 1% la celulele tumorale (0,05 ml la 10 ml SST + celulele de testat). După agitarea suspensiei se toarnă parafină topită deasupra, sistemul se menține la 37°C timp de o oră. Celulele vii martor și cele rezistente la citostatice reduc albastrul de metilen.

Rezultate și concluzii

Sensibilitatea celulelor față de citostaticele folosite a fost variată. Nu am constatat nici un caz de rezistență la adriblastin și farmorubicin.

Testele de determinare a viabilității celulelor supuse acțiunii citostaticelor, înainte și după tratament, nu pot înlocui dar pot completa determinările morfologice.

Urmărirea activității dehidrazice a celulelor tumorale tratate cu citostatice este recomandată în cazul în care celulele tripsinizate nu aderă la suprafața recipientului și din acest motiv nu poate fi determinată multiplicarea lor.

Numărul mic de cazuri nu permite tragerea unor concluzii apreciable, dar evidențiază oportunitatea efectuării oncobiogramei în fiecare caz, în scopul aplicării unei terapii individualizate.

Bibliografie

1. *Aapro M.S.* et al.: 14-th International Cancer Congress, Budapest. August 21-27, 1986. Abstracts of Lectures, Symposia and Free Communications. vol. 1, Karger, Akadémiai Kiadó, Budapest. 406;

2. *Apostolescu Elena*: Date preliminare privind metode in vitro în testarea compușilor cu potențial citostatic. *Oncologia*, 1990, 29, 151-156;

3. *Baker et al.*: Assay of primary human tumor cells for drug sensitivity using the adhesive-tumor-cell-culture-system (ATCCS), Anderson Hospital and tumor Institute, Houston, Texas 77030 USA, Life Trac, Irvine, California 92715 USA.

4. *Boga K.* et al.: Puncte de vedere în problema tratamentului cancerului de ovar, formulate pe baza experienței câștigate în 434 de cazuri. *Rev.med.*, 1990, 36, 69-72;

5. *Eagle H., Foley G.E.* cit. de 13;

6. *Farkas I.J. et al.*: Câteva date statistice corelative privind decesele prin cancer în țările dezvoltate și în România. *Rev.med.*, 1990, 36, 25-35;

7. *Hemádi Z. et al.*: Petefészekrákos betegek kemoterapeutikumokkal szembeni érzékenységének előrejelzése biopsziákból származó szövetminták in vitro vizsgálatával. *Magyar Onkológia*, 1985, 29, 175-183;

8. *Hirschberg E.* cit de 13;

9. *László J. et al.*: Studiul sensibilității in vitro a celulelor tumorale față de citostatice. *Rev.med.*, 1990, 36, 35-36;

10. *Nissen E. et al.*: Drug prediction assay in vitro, a basis Symposium, 1984. Akadémiai Kiadó, Budapest, 1985, 583-590;

11. *Salmon S.E.*: Clinical correlations of in vitro drug testing of standard agents. Vor trag Symp. Methods for testing sensitivity of human tumors to anticancer drugs. 12th International Congress of Chemotherapy. 1981, Florenz;

12. *Sanfilippo O.*: In vitro assays for evaluation of drug resistance in human tumors. 14th International Cancer Congress, Budapest, August 21-27, 1986. Abstracts of Lectures and Free Communications. vol I, Karger, Akadémiai Kiadó, Budapest, 406;

13. *Tanneberger S.*: Gewebekulturen und Zytostatica. Aktuelle Probleme der Zellzüchtung. VEB Gustav Fischer Verlag, Jena, 1971, 417-437.

STUDIES ON THE SENSITIVITY OF THE OVARIAN TUMOURS TO CYTOSTATIC DRUGS IN VITRO

Lilla Lőrinczi

The sensitivity of 15 ovarian tumours (histopatologically confirmed as adenocarcinomas) was scrutinized in vitro by making oncobiograms on tumour cell cultures as obtained by trypsin dissociation of fragments of tumoral tissue or from ascites liquid.

The tissues exhibited different sensitivity to various cytostatic drugs.

The tests employed for monitoring the viability of the tumour cells can be used to accomplish morphological analyses, but not to replace them.

Sosit la redacție: 26 octombrie 1993