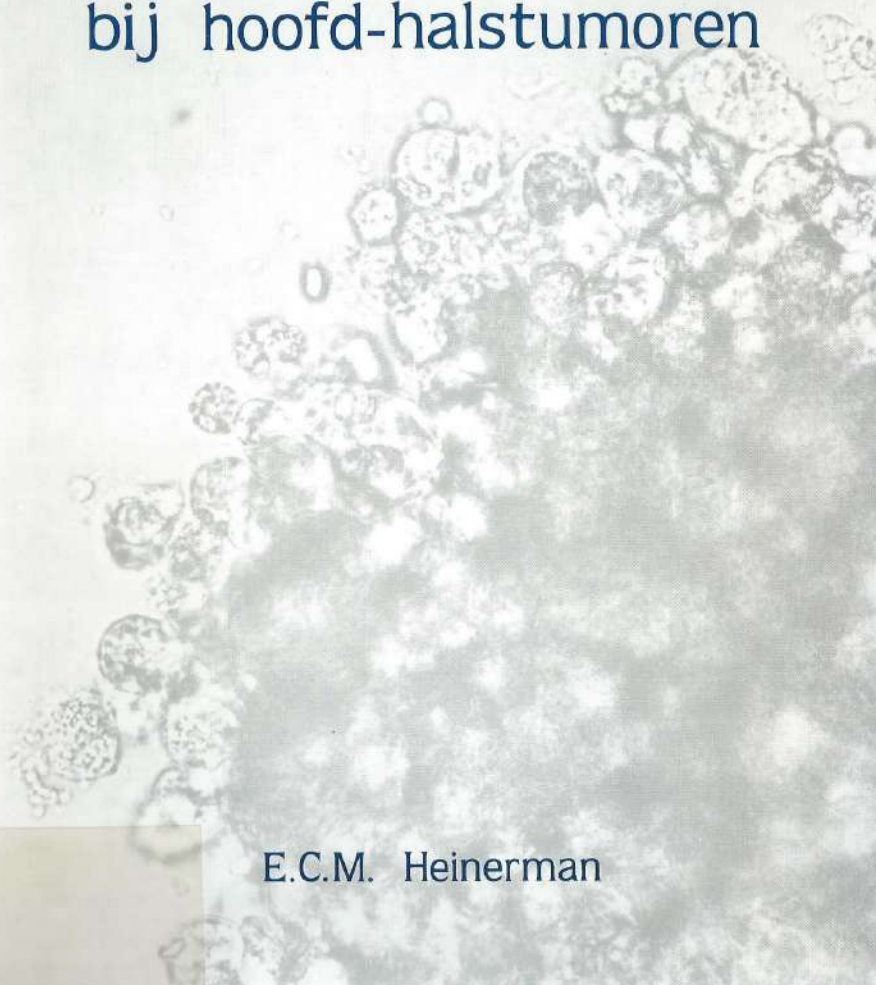


De clonogene assay bij hoofd-halstumoren

De clonogene assay bij hoofd-halstumoren

E.C.M. Heijerman H. D.N. 107

E.C.M. Heijerman



Promotor: prof.dr.G.B. Snow
Referent: prof.dr.H.M. Pinedo

Aan mijn ouders

Voor Dorothée en Stéphanie

VRIJE UNIVERSITEIT TE AMSTERDAM

De clonogene assay bij hoofd-halstumoren

ACADEMISCH PROEFSCHRIFT

ter verkrijging van de graad van doctor aan
de Vrije Universiteit te Amsterdam,
op gezag van de rector magnificus
dr. C. Datema,
hoogleraar aan de faculteit der letteren,
in het openbaar te verdedigen
ten overstaan van de promotiecommissie
van de faculteit der geneeskunde
op vrijdag 9 oktober 1987 te 13.30 uur
in het hoofdgebouw van de universiteit, De Boelelaan 1105

door

EDUARDUS CHRISTIAAN MARIA HEINERMAN

geboren te Rotterdam

drukwerkverzorging OPTIMAX
Wijk bij Duurstede
1987

Inhoudsopgave

<u>Inleiding</u>		9
<u>Hoofdstuk I</u>	Literatuuroverzicht	13
I-1	De clonogene assay en de individuele patiënt	13
I-1-1	Inleiding	13
I-1-2	Tumoren in het algemeen	15
I-1-3	Hoofd-halstumoren	18
I-2	De clonogene assay als screeningsmethode	20
I-3	Andere methoden om cytostatica te testen, die gebruik maken van humaan tumormateriaal	22
I-3-1	Inleiding	22
I-3-2	In vitro testen	23
I-3-3	In vivo testen	25
I-4	Algemene problemen bij het testen van cytostatica	26
<u>Hoofdstuk II</u>	Methode clonogene assay	29
II-1	Techniek en evaluatie clonogene assay	29
II-1-1	Techniek	29
II-1-2	Evaluatie	33

II-2	Eigen onderzoek naar de invloed van de wijze van dissociatie op de resultaten van de clonogene assay	35
II-2-1	Inleiding	35
II-2-2	Materiaal en methoden	38
II-2-3	Resultaten	41
II-2-4	Discussie	46
II-2-5	Conclusies	49
<u>Hoofdstuk III</u>	Groei van hoofd-halstumoren in de clonogene assay na passage in de naakte muis	51
III-1	Inleiding	51
III-2	Patiënten en methoden	52
III-3	Resultaten	53
III-4	Discussie	56
III-5	Conclusies	59
<u>Hoofdstuk IV</u>	De vergelijking van de gevoeligheid van humane hoofd-halstumor xenografts in de clonogene assay en in de naakte muis	61
IV-1	Inleiding	61
IV-2	Materiaal en methoden	62
IV-3	Resultaten	64
IV-4	Discussie	71
IV-5	Conclusies	73

<u>Hoofdstuk V</u>	De invloed van het transplanteren van humane tumoren in de naakte muis op de eigenschappen van deze tumoren, in het bijzonder op de in vitro gevoeligheid voor cytostatica	75
V-1	Inleiding	75
V-2	Materiaal en methoden	77
V-3	Resultaten	77
V-4	Discussie	83
V-5	Conclusies	87
<u>Hoofdstuk VI</u>	Nabeschouwing	89
<u>Samenvatting</u>		93
<u>Summary</u>		99
<u>Literatuur</u>		103
<u>Curriculum vitae</u>		109
<u>Dankwoord</u>		111

Inleiding

Sinds 1977 is hernieuwde belangstelling ontstaan voor in vitro gevoeligheidsbepalingen van tumoren voor cytostatica. In dat jaar waren Hamburger en Salmon (1977) in staat om losse cellen van myelomen en losse cellen uit ascitesvocht van in de peritoneaalholte gemetastaseerde ovariumcarcinomen in kweek te brengen in een dubbele laag zachte agar. Een klein percentage van de cellen bleek uit te groeien tot kolonies. Een jaar later gebruikten zij deze clonogene assay om in vitro de gevoeligheid van tumoren voor cytostatica te bepalen en vervolgens te correleren met de resultaten die in de kliniek bij individuele patiënten werden behaald. (Salmon et al, 1978). Zij vonden een bijna volledige overeenkomst tussen in vivo en in vitro resultaten. Hamburger en Salmon noemden hun methode "De humane tumor stamcel kweek". Zij postuleerden de stelling dat het juist de zogenaamde stamcellen - cellen die in staat zijn om zowel zichzelf te vermenigvuldigen, als uit te groeien tot een meer gedifferentieerd nakomelingschap (Steel, 1977) - zijn die in de door hen ontwikkelde voedingsbodems aanleiding geven tot koloniegroei. Deze hypothese wordt geenszins algemeen aanvaard. Het is dan ook gebruikelijk te spreken van de clonogene assay volgens Hamburger en Salmon.

Later bleken ook solide tumoren, hoewel met aanzienlijk minder succes, in de door Hamburger en Salmon ontwikkelde voedingsbodems in kweek te brengen (Von Hoff et al, 1980, 1983; Salmon et al, 1978, 1980; Sandbach et al, 1982; Sarosdy et al, 1982; Bertelsen et al, 1984). Het

succes percentage bleek ondermeer afhankelijk van het tumortype. Vaak kwamen te weinig kolonies op om betrouwbaar cytostatica te testen. Bovendien was de beschikbare hoeveelheid tumorweefsel - door middel van een biopsie verkregen - nogal eens ontoereikend om naast controle kweken ook met cytostatica geïncubeerde kweken in te zetten. Uiteindelijk bleek "over-all" slechts 1/3 gedeelte van de in kweek gebrachte tumoren evalueerbaar te zijn; Bij solide tumoren uit het hoofd-hals gebied bleek dit zelfs bij nog geen 20% van de ingezette tumoren mogelijk te zijn (Mattox en Von Hoff, 1980 en 1984; Johns, 1982). Nog afgezien van het feit dat de voorspellende waarde van deze in vitro bepaling voor de individuele patiënt zelfs bij minder moeilijk in kweek te brengen solide tumoren nog niet is aangetoond, is dit percentage te laag om de clonogene assay in zijn huidige opzet geschikt te doen zijn als test ter bepaling van de gevoeligheid van tumoren uit het hoofd-hals gebied.

De clonogene assay lijkt echter als screeningsmethode voor nieuw ontwikkelde cytostatica wel toekomst te hebben (Shoemaker et al, 1985). Het is dan namelijk minder bezwaarlijk dat slechts een aantal tumoren aanleiding geeft tot coloniegroei. Bovendien kunnen bij voorkeur grotere tumoren worden gekweekt, zodat voldoende materiaal aanwezig is om cytostatica te testen.

Een andere veelbelovende screeningsmethode maakt gebruik van thymusloze naakte muizen. Door het ontbreken van de thymus hebben deze dieren een verminderde cellulaire afweer. In 1969 implanteerde Rygaard en Povlsen kleine fragmentjes van humane tumoren in de flanken van naakte muizen. Deze groeiden en bleken vervolgens over te enten op andere naakte muizen. Dit kon vele malen herhaald worden, zodat beschikt kon worden over min of meer permanente menselijke tumorlijnen.

Intusselven zijn verschillende typen tumoren, waaronder die uit het hoofd-halsgebied, zij het met wisselend succes, getransplanteerd in deze dieren (Braakhuis et al, 1984). Door deze muizen vervolgens met een cytostaticum te behandelen, kan een indruk worden verkregen van de antitumorverking van dat middel. Het naakte muizenmodel is echter kostbaar en tijdrovend. Door dit model te combineren met de clonogene assay kunnen deze nadelen in belangrijke mate worden ondervangen. Dit

proefschrift beschrijft onze ervaringen met de clonogene assay, vooral in combinatie met het naakte muizenmodel.

In Hoofdstuk I wordt een overzicht gegeven van de literatuur betreffende de ervaringen met de clonogene assay volgens Hamburger en Salmon bij humane tumoren in het algemeen en hoofd-halstumoren in het bijzonder. Er wordt nader ingegaan op de mogelijkheden die de clonogene assay zou kunnen bieden bij de screening van nieuw ontwikkelde cytostatica. Bovendien worden in het kort andere methoden besproken die in de loop der tijd werden ontwikkeld om het effect van cytostatica te voorspellen.

In Hoofdstuk II worden de eigen ervaringen met de techniek van de clonogene assay besproken, in het bijzonder die met verschillende dissociatie methoden om van solide tumoren celsuspensies te maken.

In Hoofdstuk III worden de kweek resultaten met hoofd-halstumoren in de clonogene assay, zowel rechtstreeks van de patiënt als na passage in de naakte muis, gerapporteerd.

In Hoofdstuk IV wordt voor 8 cytostatica bij variërend van 3 tot 6 tumorlijnen, de werkzaamheid in vitro volgens de clonogene assay methode vergeleken met de werkzaamheid in vivo in de naakte muis.

In Hoofdstuk V komt de met betrekking tot de waarde van het gecombineerde screeningsmodel essentiële vraagstelling aan de orde in hoeverre het herhaald transplanteren van een humane tumor in naakte muizen de eigenschappen van deze tumor verandert, in het bijzonder de gevoeligheid voor cytostatica.

In Hoofdstuk VI tenslotte worden op basis van de resultaten uit eigen onderzoek enige opmerkingen gemaakt omtrent toekomstperspectieven van methoden die als doel hebben de verking van cytostatica bij de mens te voorspellen, in het bijzonder bij patiënten met een hoofd-halstumor.

Hoofdstuk I

Literatuuroverzicht

I-1. DE CLONOGENE ASSAY EN DE INDIVIDUELE PATIËNT

I-1-1. Inleiding

Sinds enige decennia beschikt de clinicus over de mogelijkheid patiënten met infecties doelgericht te behandelen. Pathogene bacterien kunnen worden gekweekt in daartoe speciaal samengestelde voedingsbodems. Door in vitro het effect van verschillende antibiotica op de vorming van bacteriecolonies te bepalen, kan de gevoeligheid van bacterien in vivo worden voorspeld. Materiaal, waarvan wordt verwacht dat het de pathogene bacterien bevat (sputum, wondvocht, bloed, urine, enz) wordt in transportmedium naar het bacteriologisch laboratorium opgestuurd. Na enkele dagen tot een week krijgt de clinicus een verslag voor welke antibiotica de bacterie niet en voor welke de bacterie wel gevoelig is.

De oncoloog zou graag over een soortgelijke methode beschikken om patiënten met een maligniteit optimaal te kunnen behandelen met cytostatica. Gezien de ernstige, soms levensbedreigende bijwerkingen, die deze middelen kunnen hebben, kan ook informatie over het waarschijnlijk niet werkzaam zijn van een cytostaticum van waarde zijn voor de individuele patiënt.

Op dit moment beschikt men in de kliniek niet over een dergelijk model. De oncoloog is voor de keuze van chemotherapeutica geheel

afhankelijk van empirische gegevens. Zo zijn bij voorbeeld methotrexaat, cisplatinum en bleomycine bij 20 tot 50% van de plaveiselcelcarcinomen uit het hoofd-hals gebied werkzaam gebleken (Taylor IV, 1983). Helaas ontbreken parameters met een voorspellende waarde ten aanzien van de gevoeligheid van de individuele patiënt voor één van deze middelen. Het is daarom niet verwonderlijk dat vele onderzoekers hebben gepoogd in analogie met de gevoeligheidsbepalingen van bacteriën voor antibiotica, gevoeligheidstesten van tumoren voor cytostatica te ontwikkelen. Het belangrijkste probleem dat zich hierbij voordoet is dat humane tumorcellen buiten het menselijk lichaam snel te gronde gaan. De eisen die een tumorcel aan zijn omgeving stelt blijken veel hoger te zijn dan die van een bacterie.

Hoewel het al eerder was gelukt om humane tumorcellen onder speciale condities buiten het lichaam in leven te houden, en zich te laten delen, leek het onderzoek van Hamburger en Salmon in 1977 een doorbraak te betekenen. Gebruikmakend van kveken met een dubbele laag agar wisten zij overgroei door fibroblasten te voorkomen en dankzij complex samengestelde media werd een omgeving gecreëerd waarin humane tumorcellen konden uitgroeien tot colonies. Zij gebruikten deze kweekmethode om in vitro het effect van een cytostaticum op het al dan niet uitgroeien van een cel tot een colonie te onderzoeken en vervolgens dit effect te correleren met de resultaten die werden behaald met hetzelfde middel bij de patiënt waarvan het tumormateriaal werd verkregen (Salmon et al, 1978). Zij vonden voor in de vrije buikholte gemetastaseerde ovariumcarcinomen en voor myelomen een bijna volledige overeenkomst tussen de in vitro en in vivo resultaten. Hamburger en Salmon noemden de door hen ontwikkelde clonogene assay de humane tumor stamcel kweek. Er wordt verondersteld dat tumoren, evenals het beenmerg, stamcellen bevatten. Deze cellen zouden circa 1% van de totale celpopulatie uitmaken. Stamcellen vertegenwoordigen in zich alle eigenschappen van een bepaald weefsel of een bepaalde tumor. Zij zijn in staat zowel zichzelf te vermenigvuldigen, als uit te groeien tot een meer gedifferentieerd nakomelingschap (Steel, 1977). Een cytostaticum zal vooral effectief zijn indien het juist deze cellen van de tumor in de patiënt vernietigt. Hamburger en Salmon postuleerden de stelling dat het juist de stamcellen zijn die in de voedingsbodems aanleiding geven tot coloniegroei. Deze hypothese -

hoevel aantrekkelijk - is geenszins bewezen. Het is dan ook correct om in plaats van de term "stamcel" de term "clonogene cel" te gebruiken. In het algemeen spreekt men ook niet van de humane tumor stamcel kweek maar van de clonogene assay volgens Hamburger en Salmon.

Hoewel aanvankelijk werd gedacht dat deze kweekmethode specifiek was voor ascites van ovariumcarcinomen en voor myelomen, bleken ook solide tumoren in de door Hamburger en Salmon ontwikkelde voedingsbodems te groeien. Vooral Von Hoff et al (1980, 1981) slaagden er in een groot aantal typen solide tumoren, waaronder hoofd-halstumoren, in kweek te brengen.

Bijna gelijktijdig werd een clonogene assay ontwikkeld door Courtenay en Mills (1978). Ten opzichte van de methode van Hamburger en Salmon bestaan twee essentiële verschillen. Aan de voedingsbodems worden rattenerythrocyten toegevoegd en er wordt gekweekt bij een O₂-spanning van 5% (in tegenstelling tot de normaal in de lucht aanwezige O₂-spanning van 20%). Na enkele dagen lyseren de rattenerythrocyten waardoor voedingsstoffen afgegeven worden op het moment dat de eventuele colonievorming zich in een kritisch stadium zou bevinden. De lage O₂-spanning wordt fysiologisch geacht: de O₂-spanning in vivo in weefsels is mede vanwege de O₂-consumptie altijd lager dan 20%. Hoewel met deze in Engeland ontwikkelde methode meer cellen uitgroeiden tot een colonie kreeg zij minder belangstelling dan de clonogene assay volgens Hamburger en Salmon uit de Verenigde Staten. Later kwam Tveit et al (1981) tot een synthese van beide methoden. De techniek van Hamburger en Salmon werd als basis gebruikt met toevoeging van 5% O₂ en rattenerythrocyten; één en ander leidde tot hogere cloning efficiencies.

I-1-2. Tumoren in het algemeen

Ovariumtumoren die in de vrije buikholte zijn uitgezaaid geven aanleiding tot de vorming van ascites. Deze ascites, bestaande uit een zogenaamde natuurlijke "single cell" suspensie, leent zich voor een directe verwerking in de clonogene assay. De meeste maligniteiten bestaan echter uitsluitend uit solide tumoren. Deze solide tumoren moeten alvorens zij in kweek gebracht kunnen worden in de clonogene

assay, gedissocieerd worden in losse cellen. Aanvankelijk werden vooral mechanische dissociatiemethoden gebruikt, zoals snijden, knippen en filteren. Vanwege de vaak teleurstellende opbrengsten, die deze methoden opleverden, gingen steeds meer onderzoekers over op enzymatische methoden, waarbij men stoffen zoals bijvoorbeeld trypsine en collagenase op de tumoren laat inwerken.

De lage celopbrengst en de mogelijke celbeschadiging die optreedt door de dissociatie zijn mede oorzaak voor het feit dat gemiddeld maar 1/3 gedeelte van de solide tumoren aanleiding geeft tot voldoende coloniegroei om cytostatica te testen. Aangenomen wordt dat ongeacht welke dissociatiemethode wordt gebruikt, de tumorcellen tijdens het dissociatieproces worden beschadigd. Von Hoff (1983), die meer dan 8000 tumoren van verschillende lokalisaties in kweek bracht, merkte op dat in maar 8% van de kweken met voldoende coloniegroei gevoeligheid werd gevonden voor een op dat moment in de kliniek beschikbaar cytostaticum. De reden hiervoor was dat per tumor slechts enkele cytostatica konden worden getest vanwege de beperkte hoeveelheid tumormateriaal.

Hoewel slechts een gedeelte van de patiënten, waarvan tumormateriaal werd gekweekt, ook verkelijk werd behandeld met chemotherapie, is het opmerkelijk dat inmiddels meer dan 40 publicaties verschenen zijn, met in totaal ongeveer 2000 in vitro- in vivo correlaties (Bradley et al, 1984). Het betreft hier een groot aantal verschillende tumortypen. Geen enkel ander experimenteel testmodel voor de verking van cytostatica is zo uitgebreid onderzocht als de clonogene assay. Overeenkomst in gevoeligheid werd in ongeveer 70% van bovengenoemde correlaties gevonden, overeenkomst in resistentie in maar liefst 90%. Hoewel deze resultaten hoopvol zijn, moet worden opgemerkt dat in enkele studies de patiënten werden behandeld met combinatie chemotherapie terwijl in vitro de cytostatica afzonderlijk werden getest.

Het feit dat resistentie beter correleerde dan gevoeligheid, wordt niet toegeschreven aan de clonogene assay zelf, maar aan de situatie in de kliniek. De meeste patiënten met een maligniteit hebben weinig of geen baat bij chemotherapie. Een gedeelte van de correcte

correlaties zal dan ook op toeval berusten. Indien in vitro resistentie wordt gevonden, is de kans dat dit overeenkomt met de situatie in de kliniek, derhalve groter.

Voor enkele typen tumoren zijn de in de vorige alinea genoemde percentages niet hoog genoeg om de keuze van de chemotherapie te beïnvloeden. Uit de kliniek is bijvoorbeeld bekend dat de meeste testiscarcinomen gevoelig zijn voor chemotherapie. Een in vitro gevoeligheidsbepaling die in $\pm 70\%$ correct gevoeligheid voorspelt, is op dat moment inferieur ten opzichte van de kennis van de clinicus. (Selby et al, 1983; Bradley et al, 1984; Singletary et al, 1985). Indien een dergelijke in vitro gevoeligheidsbepaling één cytostaticum aanwijst dat effect heeft bij een coloncarcinoom is dit echter van groot belang, omdat deze tumoren in het algemeen ongevoelig zijn voor chemotherapie. Omgekeerd zal een in vitro test die in 90% correct resistentie voorspelt voor een coloncarcinoom niet van belang zijn (Singletary et al, 1985). De clinicus weet namelijk op grond van zijn ervaring dat de kans dat deze tumor ongevoelig is voor cytostatica groter is dan 90%.

Helaas zijn prospectieve studies, waarbij de behandeling van de patiënt bepaald werd op geleide van de in vitro gevonden uitslagen, slechts beperkt uitvoerbaar gebleken en dan vooral voor niet-solide tumoren (Alberts et al, 1981; Ludwig et al, 1981; Alberts et al, 1982; Von Hoff et al, 1983a). Indien met een tumor voldoende coloniegroei werd verkregen om cytostatica te testen, werd de patiënt behandeld op geleide van de resultaten, terwijl anders klinische ervaring de therapie bepaalde. Op deze manier ontstaan echter 2 groepen die niet zonder meer met elkaar vergeleken mogen worden, omdat tumoren die goed groeien in agar andere eigenschappen zouden kunnen hebben, dan tumoren die dat niet doen. Zolang niet alle tumoren aanleiding geven tot voldoende coloniegroei is een optimale studie opzet bijna niet uitvoerbaar, hetgeen voor het aantonen van de waarde van de clonogene assay essentieel is.

Het feit dat gemiddeld slechts 1/3 van de tumoren in vitro evalueerbaar is, maakt de clonogene assay in zijn huidige opzet ongeschikt als test ter bepaling van de gevoeligheid voor cytostatica

van de individuele patiënt. Er is slechts toepassing te verwachten voor gemakkelijk toegankelijke, goed in vitro groeiende maligniteiten, zoals ascites van ovariumcarcinomen en myelomen.

I-1-3. Hoofd-halstumoren

Na de publicatie van Hamburger en Salmon in 1977 en aangemoedigd door het werk van Von Hoff et al (1980) werden vanuit de verschillende klinische specialismen de mogelijkheden van de clonogene assay onderzocht. Samen met Mattox publiceerde Von Hoff (1980a) voor het eerst de resultaten die werden gevonden bij hoofd-halstumoren. Van 36 patiënten werd tumormateriaal gekweekt. Coloniegroei (> 5 colonies per kweekschuiltje) werd gezien bij 23 tumoren (64%). Kort daarop verscheen van dezelfde onderzoekers een rapport, waarbij van 73 hoofd-halstumoren er 33 (45%) in agar groeiden (Mattox en Von Hoff, 1980b). Uiteindelijk bleek slechts 16% van de tumoren tot voldoende coloniegroei aanleiding te geven om gebruikt te kunnen worden voor het testen van cytostatica (Mattox en Von Hoff, 1980b). Hoewel in vitro enkele middelen werkzaam bleken tegen hoofd-halstumoren konden geen correlaties met in vivo resultaten worden onderzocht, omdat de patiënten waarvan deze tumoren werden verkregen, niet met chemotherapie werden behandeld. Slechts 3 correlaties werden gevonden. De betreffende drie patiënten reageerden niet op chemotherapie. Dit kwam overeen met de resistentie die werd gevonden in de clonogene assay.

Desondanks waren de auteurs optimistisch over de toekomst van de clonogene assay volgens Hamburger en Salmon. Later moesten zij deze opvatting herzien (Mattox et al, 1983). Twintig patiënten met een hoofd-halstumor werden onder andere met cisplatinum behandeld. Tumormateriaal van deze patiënten kwam voor verwerking in vitro in aanmerking. Uiteindelijk konden slechts 2 tumoren in de clonogene assay worden getest, vanwege te weinig tumormateriaal of onvoldoende coloniegroei. De conclusie luidde dat deze methode geen bijdrage kon leveren bij de behandeling van patiënten met een hoofd-halstumor. Later verscheen een totaal overzicht van de resultaten die zij tot dan toe hadden bereikt (Mattox et al, 1984). Minder dan 20% van alle ingestuurde tumoren bleken geschikt voor het testen van cytostatica.

Johns (1982) vond eveneens, gebruikmakend van dezelfde assay, dat nog geen 20% van de tumoren geschikt was voor het testen van cytostatica. Het feit dat deze onderzoeker niet in staat was lineaire groei aan te tonen, dat wil zeggen dat het aantal colonies dat groeit recht evenredig is met het aantal in kweek gebrachte cellen, doet bovendien twijfel ontstaan aan de juistheid van zijn resultaten. Interessant was de bevinding van Johns dat de overlevingsduur van een patiënt afnam naar mate er meer colonies groeiden in de onbehandelde kweken (controles) (Johns en Mills, 1983). Dit kon niet worden bevestigd door Mattox et al (1984). Zij vonden geen enkele correlatie tussen de parameters overlevingsduur en clonog efficiency.

Johns et al (1983) vonden bij speekselkliertumoren een hoger percentage groei (65%) en meer colonies per controlekweek dan bij plaveiselcelcarcinomen in het hoofd-halsgebied. Volgens deze auteurs berustte dit op het feit dat speekselkliertumoren zich beter laten dissocieren in losse cellen.

De resultaten van Cobleigh et al (1984) waren het meest teleurstellend. Van de 51 in kweek gebrachte hoofd-halstumoren groeide er niet één in de clonogene assay. Het maakte geen verschil of de tumoren enzymatisch of mechanisch werden gedissocieerd.

De clonogene assay volgens Courtenay en Mills (1978) bleek al even weinig succesvol voor wat betreft het in kweek brengen van hoofd-halstumoren. Zeventien tumoren werden verwerkt, slechts eenmaal werd coloniegroei waargenomen. (Rupniak en Hill, 1980).

Tumoren uit het hoofd-hals gebied zijn bijzonder slecht in kweek te brengen. Het aantal gevonden correlaties tussen in vitro en in vivo gegevens is dan ook buitengewoon gering. Kweekomstandigheden moeten worden verbeterd. Schiff en Shuger (1984) bij voorbeeld vervingen bij een beperkt aantal tumoren de agar in de kweekbodems door agarose. Dit leek betere resultaten te geven.

Al eerder werd gesteld dat de clonogene assay op dit moment geen waarde heeft bij de keuze van chemotherapie voor de individuele patiënt met een maligniteit. Uit bovenstaande gegevens blijkt dat dit

in het bijzonder geldt voor de patiënt met een hoofd-hals maligniteit.

I-2. DE CLONOGENE ASSAY ALS SCREENINGSMETHODE

Indien de clonogene assay als screeningsmethode voor nieuw ontwikkelde cytostatica wordt gebruikt, geldt een aantal technische bezwaren in mindere mate. Het is dan minder bezwaarlijk dat niet alle humane tumoren aanleiding geven tot coloniegroei. Bovendien kunnen dan bij voorkeur grotere tumoren worden gekweekt, zodat voldoende materiaal aanwezig is om meer cytostatica te testen.

Het huidige screeningsmodel van het National Cancer Institute (NCI) in de Verenigde Staten verwerkt jaarlijks $\pm$ 20.000 middelen. Al deze cytostatica worden eerst getest in het P388 muizenleukemie model. Stoffen die actief zijn, worden vervolgens op hun werkzaamheid onderzocht in een panel bestaande uit drie muizentumoren (L1210 leukemie, B16 melanoom en M5076 sarcoom) en een xenograft van een humane mammatumor. Tot voor kort werd een uitgebreider tumor panel gebruikt bestaande uit 8 verschillende tumor-modellen waaronder 3 xenografts (Frei, 1982). Staquet et al (1983) toonden echter aan dat het beperktere model dezelfde voorspellende waarde had (zie ook Venditti, 1983).

Er wordt echter steeds meer getwijfeld aan de juistheid van bovenstaande screeningsmethoden. De werkzaamheid van het in de kliniek vaak gebruikte middel Bleomycine zou bijvoorbeeld niet zijn onderkend (Staquet et al, 1983). Het is niet onwaarschijnlijk dat de prescreen door middel van het muizen leukemie model P388 (vroeger L1210) selecteert voor een bepaalde groep werkzame stoffen. Het is in dit verband opvallend dat de meerderheid van de thans in de kliniek gebruikte cytostatica suppressie van het beenmerg als belangrijkste bijwerking heeft (Salmon, 1984). Leukemie is immers een neoplasma van het beenmerg. Het is derhalve onwaarschijnlijk dat met bovengenoemde prescreen middelen worden gevonden die myelosuppressie niet als bijwerking hebben.

Een omvangrijke multi-institutionele studie naar het gebruik van de

clonogene assay als screeningsmodel werd verricht door Shoemaker et al in samenwerking met het NCI (1985). De belangrijkste bevinding was dat van 79 stoffen, die in het P388 model onwerkzaam waren, er 14 wel activiteit vertoonden in de clonogene assay. Enkele van deze middelen hadden een totaal andere structuur dan de tot nu toe bekende cytostatica en konden in relatief hoge dosis aan de muis worden gegeven. Dit opent de weg naar de ontwikkeling van een groep totaal nieuwe cytostatica. Hoevel de capaciteit van de clonogene assay veel groter is dan de capaciteit van de verschillende diersystemen, is het ook met deze methode niet mogelijk het totale aanbod van nieuwe antitumor middelen te verwerken. Door het NCI wordt op dit moment eveneens onderzocht in hoeverre panels van cellijnen, gegroepeerd per tumorsoort, gebruikt kunnen worden om cytostatica op hun werkzaamheid te screenen. Hierbij wordt gebruik gemaakt van een geautomatiseerde verwerking van de resultaten, hetgeen de capaciteit belangrijk vergroot. In de nabeschouwing zal nog worden teruggekomen op deze zogenaamde "disease oriented screening".

Door Salmon (1984) is een andere toepassing van de clonogene assay gepropageerd: selectie van tumortypen voor fase I studies. Deze studies dienen niet om de antitumor werking te evalueren, maar zijn bedoeld om gegevens te verkrijgen over maximaal getolereerde dosis, toxiciteit en farmacologie van het middel. Patiënten aan wie gevraagd wordt aan dergelijke trials hun medewerking te verlenen, komen niet meer voor een gangbare therapie in aanmerking en zijn meestal reeds intensief behandeld (chirurgie, radiotherapie en chemotherapie). Dit heeft ondermeer tot gevolg dat de kans afneemt dat de tumor op het middel reageert (Salmon, 1984). Hoevel de aanwezigheid van een respons voor een bepaald cytostaticum bij patiënten in een fase I studie in principe niet van belang is voor de beslissing omtrent het al dan niet testen in een fase II studie, is het toch voorstelbaar dat bij het opzetten van een fase II studie voorrang wordt gegeven aan cytostatica, die in fase I studies werkzaam zijn gebleken. De kans op dit laatste is groter wanneer voor het fase I onderzoek patiënten worden geselecteerd met een tumortype, dat in vitro gevoeligheid voor het betreffende cytostaticum vertoonde. Een voorbeeld hiervan is het onderzoek van Alberts et al (1982) die in een fase I studie met bisantrene, waarbij enkele patiënten werden geselecteerd op basis van

de gevonden gevoeligheid in vitro voor dit middel een verrassend hoge gevoeligheid van de tumoren vonden.

Van mogelijk groter belang is de selectie van tumortypes voor de fase II studies. Fase II studies zijn bedoeld om na te gaan of een bepaald cytostaticum werkzaam is bij menselijke tumoren. Daartoe dient het betreffende middel per tumortype aan minimaal 14 patiënten te worden toegediend (EORTC richtlijnen). Aangezien de ervaring leert dat de uitkomst wat betreft werkzaamheid over het algemeen negatief is, terwijl meestal wel sprake is van toxiciteit, betekent dergelijk fase II onderzoek een grote belasting voor de betreffende patiënten. Het zou dan ook een belangrijke verbetering zijn, indien in vitro onderzoek in staat zou zijn voor nieuw ontwikkelde cytostatica de menselijke tumortypen te selecteren die daarvoor waarschijnlijk gevoelig zijn. De clonogene assay lijkt hiertoe geschikt, zoals voor mitoxantrene en interferon door Von Hoff et al (1981) en Salmon et al (1983) is aangetoond. Ook voor hoofd- halstumoren lijken hier mogelijkheden aanwezig. Hoewel deze tumoren niet rechtstreeks in de clonogene assay groeien, doen zij dit wel na passage in de thymusloze, naakte muis. (zie ook Hoofdstuk III), zodat kan worden beschikt over een panel van hoofd-halstumoren (Heinerman et al, 1985).

I-3. ANDERE METHODEN OM CYTOSTATICA TE TESTEN, DIE GEBRUIK MAKEN VAN HUMAAN TUMORMATERIAAL

I-3-1. Inleiding

Hoewel op dit moment de clonogene assay de meest gebruikte experimentele methode is om cytostatica op hun antitumor werking te onderzoeken, staan daartoe ook andere methoden ter beschikking. Zij maken alle gebruik van humaan materiaal en zijn gebaseerd op de veronderstelling dat tumoren van patiënten zelfs van eenzelfde lokalisatie en histologie onderling verschillen in gevoeligheid voor cytostatica. Uit de kliniek is dit een bekend gegeven. Een wisselende respons binnen een bepaalde patiënten groep kan echter ook worden veroorzaakt door factoren die niet met de tumor zelf, maar met de gastheer te maken hebben, zoals de conditie van de patiënt en een individueel verschillende farmacokinetiek.

Meestal wordt gebruik gemaakt van tumormateriaal rechtstreeks van de patiënt waardoor het niet eenvoudig is testen te herhalen. Dit zou in belangrijke mate kunnen bijdragen aan de variabele testresultaten, die door veel onderzoekers juist worden uitgelegd als een goede weergave van de resultaten in de kliniek (Courtenay et al, 1980).

Het is mogelijk dat de verschillende testen alleen maar in het algemeen gevoelige van in het algemeen resistente tumoren kunnen onderscheiden. Bij een multi-institutionele studie van Volm et al (1979) bleek dat indien een tumor in vitro ongevoelig was voor adriamycine de groei bij de patiënt progressief was, waarbij het niet van belang was of de patiënt ook werkelijk met dit middel of een ander cytostaticum werd behandeld.

Omdat in een groot aantal studies een goede overeenkomst wordt gevonden tussen de kliniek en de testresultaten blijft de veronderstelling dat er individuele verschillen zijn in de gevoeligheid voor cytostatica niettemin aantrekkelijk.

I-3-2. In vitro testen

Het effect dat een cytostaticum op een tumorcel heeft, kan op verschillende wijzen tot uitdrukking komen. Zo kunnen de morfologie en de viabiliteit na inwerking van een cytostaticum worden bestudeerd. De invloed van een chemotherapeutikum op het celmetabolisme of de inbouw van bouwstenen in het DNA of RNA kan eveneens een onderwerp van onderzoek zijn. Indien het aangrijppingspunt van een cytostaticum in vivo bekend is, kan dit soms in vitro worden bestudeerd. Hieronder volgt een korte opsomming van de methoden die uitgaan van bovengenoemde mogelijkheden.

a. Celmorfologie

Eventuele veranderingen in celmorfologie onder invloed van cytostatica worden geïnterpreteerd. Er wordt gebruik gemaakt van monolayer- of orgaan kweken. Het zijn de oudste methoden, die het voordeel hebben dat de resultaten snel bekend zijn. De beoordeling van de celbeschadiging die optreedt is nogal subjectief. Bovendien kan een

beschadigde cel zich soms nog delen of herstellen, terwijl een morfologisch niet veranderde cel dood kan zijn. Deze factoren zijn waarschijnlijk verantwoordelijk voor de teleurstellende resultaten (Wright et al, 1962; Hurley en Yount, 1965; Lickiss et al, 1974). Bovendien lenen niet alle tumoren zich voor dit type kweken.

b. Celviabiliteit

De celviabiliteit wordt bepaald met behulp van vitale kleurstoffen. Dode cellen zijn niet in staat om deze stoffen buiten de cel te houden en worden dus gekleurd. Hierbij wordt uitgegaan van de veronderstelling dat de celmembranen van dode cellen is beschadigd. Dit is niet altijd het geval. Ook levende cellen kunnen tijdelijk membraanbeschadigingen hebben en derhalve aankleuren. Vooral door het werk van Roper en Drevinko (1976) zijn deze testen in diskrediet geraakt. Weisenthal et al (1983) vonden echter dezelfde resultaten als die welke verkregen werden met een clonogene assay.

c. Het aangrijpingspunt van een cytostaticum in de cel

Voor enkele cytostatica is het aangrijpingspunt in de cel bekend en in vitro te onderzoeken. Een voorbeeld is de remming van dihydrofolaat reductase door methotrexaat (Bryniuk en Bertino, 1969). Het belangrijkste bezwaar in verband met de toepasbaarheid van deze testen is dat het werkingsmechanisme van een cytostaticum bekend moet zijn, hetgeen zelden het geval is. Bovendien zijn deze testen cytostaticum specifiek. Een test die klinische toepassing vindt is de oestrogeen receptor bepaling bij mammatumoren. Aanwezigheid van deze receptoren maakt de kans op respons met hormonale therapie groter (McGuire, 1978).

d. Celmetabolisme

Er zijn methoden ontwikkeld die na toevoeging van cytostatica de zuurstof consumptie of het glucose metabolisme meten. Hoewel enkele studies verschenen met goede resultaten, heeft deze methode weinig

navolging gekregen (Von Hoff en Weisenthal, 1980). Het theoretische bezwaar is dat cellen een gestoord metabolisme kunnen hebben zonder dood respectievelijk niet meer in staat te zijn om te delen (Twentyman, 1978).

e. Inbouw van radioactieve bouwstenen in DNA of RNA

Indien de inbouw van radioactief thymidine of uridine in DNA of RNA in vitro door een cytostaticum wordt geremd, kan gevoeligheid in vivo worden verwacht. Relatief veel onderzoek is met dit soort methoden uitgevoerd, mede vanwege het feit dat langdurige kweken niet nodig zijn en het resultaat snel - binnen enkele uren - bekend is. (Freshney et al, 1975; Mattern et al, 1976; Roper en Drevinko, 1976; Volm et al, 1979). Een multi-institutionele studie in West Duitsland toonde aan dat deze methode niet zo zeer in staat was om het meest effectieve middel te selecteren, maar om te bepalen of een tumor reageert op chemotherapie. (Group for sensitivity testing of tumors, 1981).

I-3-3. In vivo testen

Humane tumor xenografts

Verschillende proefdiermodellen zijn gebruikt om in vivo humane tumoren te testen met cytostatica. Dit betreft enerzijds het implanteren van tumoren op plaatsen waar zij weinig immunologische reactie oproepen, zoals de voorste oogkamer in muizen (Greene, 1952), de vangzak van de hamster (Goldenberg en Witte, 1967) en onder het nierkapsel (Bogden et al, 1979), anderzijds het gebruik van proefdieren met een verminderde afweer. Daarvoor werden aanvankelijk normale proefdieren behandeld met corticosteroiden, bestraling dan wel thymectomie. Dit bleek niet meer nodig te zijn door het beschikbaar komen van een thymusloze muizen mutant. Deze dieren ontberen een cellulaire afweer. Voor het eerst werden deze dieren als gastheer voor humane tumoren gebruikt door Rygaard en Povlsen (1969). Inmiddels is gebleken dat vele humane tumoren, waaronder hoofd-halstumoren, in deze muizen kunnen groeien en in stand te houden zijn (Braakhuis et al, 1984).

Deze zogenaamde tumorlijnen worden als volgt verkregen. Tumormateriaal rechtstreeks van de patiënt wordt in kleine weefselfragmentjes gesneden en vervolgens subcutaan geïmplanteerd in de flanken van een aantal naakte muizen. Indien een tumor aanslaat bereikt zij in enkele weken tot maanden een grootte van $> 500 \text{ mm}^3$. Een dergelijke tumor kan na in stukjes gesneden te zijn, in een nieuwe groep muizen worden geïmplanteerd. Door tumoren telkens opnieuw over te zetten, indien zij een daartoe geschikte grootte hebben bereikt, kan worden beschikt over permanente tumorlijnen. In de meeste gevallen zijn enkele passages nodig alvorens een groot percentage van opnieuw in muizen getransplanteerde stukjes tumorweefsel uitgroeit tot voldoende grootte. Een tumorlijn is pas bruikbaar voor het testen van cytostatica indien wordt beschikt over voldoende muizen met een in beginsel goed groeiende tumor, zodat de groep behandelde en onbehandelde muizen groot genoeg is om statistisch betrouwbare uitspraken te doen. Eén en ander heeft tot resultaat dat meestal pas enkele maanden na het uittrekken van het tumormateriaal van de patiënt cytostatica kunnen worden getest. De individuele patiënt is derhalve niet bij dit model gebaat, zodat het accent ligt op screening. Desondanks dient de waarde van het naakte muizenmodel mede aangetoond te worden door de resultaten bij de muis te vergelijken met die in de individuele patiënt. Vanwege de bewerkelijkheid van dit model is het aantal gepubliceerde correlaties beperkt (Ginovanella et al, 1978; Selby et al, 1980; Shorthouse et al, 1980). Hoewel deze studies allen positieve correlaties rapporteren, vonden wij bij twee verschillende hoofd-halstumorlijnen in de naakte muis resistentie voor methotrexaat, terwijl bij de corresponderende patiënten wel respons op methotrexaat werd waargenomen (Braakhuis et al, 1983). Enkele typen tumoren, waaronder hoofd-hals maligniteiten, groeien na passage door de naakte muis beter in de clonogene assay (Heinerman et al, 1985). Hierdoor kunnen meer cytostatica in een korter tijdsbestek worden geëvalueerd (zie ook hoofdstuk III en IV).

I-4. ALGEMENE PROBLEMEN BIJ HET TESTEN VAN CYTOSTATICA

In hoeverre is materiaal waarmee een test wordt uitgevoerd, representatief voor de gehele tumor? Meestal wordt slechts een gedeelte van de tumor verwerkt. Tumoren kunnen heterogeen in opbouw zijn. Dat dit

problemen zou kunnen geven bij het nemen van biopsies werd aangetoond door Hakanssen en Tropé (1974). Indien een tumor in 4 gelijke delen werd gesneden en vervolgens apart getest, werden er verschillen in gevoeligheid gevonden tussen de delen. Het meest waarschijnlijk is dat de tumoren bestaan uit verschillende subpopulaties cellen die ongelijk over de tumor zijn verdeeld. Een aantal onderzoekers hebben het bestaan van deze subpopulaties kunnen aantonen (Bernal et al, 1983; Dexter et al, 1981; Miller et al, 1981; Stephens en Peacock, 1982; Sweeney et al, 1982; Olsson et al, 1984). Van groot belang zijn de bevindingen van Schlag en Schreml (1982). In een clonogene assay onderzochten zij van dezelfde patiënt zowel de gevoeligheid van de primaire tumor, als van de metastase. Er bleek geen enkele correlatie te bestaan. Meestal wordt de primaire tumor getest, terwijl bij de patiënt chemotherapie vooral gericht is op metastasen.

Een groot aantal in vitro testen moet worden uitgevoerd met losse cellen, de zogenaamde single cell suspensie. Solide tumoren worden derhalve gedissocieerd. Verschillende dissociatiemethoden zijn hiertoe ontwikkeld, mede afhankelijk van het tumortype. Het blijkt onmogelijk een tumor geheel te dissocieren in de cellen waaruit zij bestaat. Het is denkbaar dat deze dissociatiemethoden niet resulteren in een a-selecte single cell suspensie. Gezien de reeds eerder genoemde aanwezigheid van verschillende subpopulaties bestaat dus de mogelijkheid dat de gevonden gevoeligheid voor cytostatica afwijkt van die van de tumor als geheel. Dit probleem komt uitgebreid aan de orde in Hoofdstuk II.

Een ander probleem betreft het gebruik van cytostatica. Het heeft bijvoorbeeld geen zin om concentraties te testen die bij de mens niet haalbaar zijn, vanwege de dan optredende toxiciteit. De kennis over de farmacologie van veel algemeen gebruikte cytostatica is echter beperkt. In nog veel sterkere mate geldt dit voor nieuw ontwikkelde middelen. Fase I clinical trials moeten deze informatie verschaffen. Bovendien blijkt dat de farmacokinetiek van een cytostaticum per patiënt kan verschillen. De concentratie van een cytostaticum ter plaatse van de tumor verschilt vaak van die in het plasma en is meestal lager. Een aantal cytostatica wordt in vivo omgezet in de werkzame stof. Dergelijke middelen lenen zich niet voor in vitro

onderzoek. Het meest bekende voorbeeld in dit opzicht is cyclofosfamide dat in de lever wordt gemetaboliseerd tot het werkzame 4-hydroxycyclofosfamide.

Hoofdstuk II

Methode clonogene assay

In het eerste gedeelte van dit hoofdstuk zal de methode van de clonogene assay, zoals ontwikkeld door Hamburger en Salmon (1977) worden besproken. Daarbij zal in het bijzonder aandacht worden geschonken aan de verwerking en de interpretatie van de resultaten. Hoewel ook andere clonogene assays zijn beschreven, zoals bijvoorbeeld die van Courtenay en Mills (1978), zijn deze slechts door enkele onderzoekers toegepast. Zij zullen daarom buiten beschouwing blijven. In het tweede gedeelte van dit hoofdstuk wordt eigen onderzoek naar de invloed van de wijze van dissociatie van het tumorweefsel op de resultaten van de clonogene assay beschreven.

II-1. TECHNIEK EN EVALUATIE CLONOGENE ASSAY

II-1-1. Techniek

Tumormateriaal wordt bij de mens onder steriele omstandigheden uitgenomen. Indien men slechts de beschikking heeft over een tumorbiopsie is de hoeveelheid tumormateriaal meestal beperkt (doorsnede enkele mm). Het verdient dan ook de voorkeur gebruik te maken van tumormateriaal dat wordt verkregen tijdens operaties (doorsnede enkele cm). Hoewel algemeen wordt aangenomen dat de tijd tussen het uitnemen van het tumormateriaal en de verwerking daarvan in het kweeklaboratorium zo kort mogelijk dient te zijn, niet langer dan 1 à 2 uur, vinden enkele onderzoekers waaronder Von Hoff et al. (1982) goede coloniegroei zelfs na meer dan 24 uur. Het medium waarin het

tumormateriaal wordt vervoerd dient de juiste zuurgraad te hebben. Zovel gebufferde zoutoplossingen volgens Hanks als media met een rijkere samenstelling, al of niet aangevuld met sera, kunnen hiervoor worden gebruikt. Uit praktische overwegingen vindt het transport meestal plaats bij kamertemperatuur. Alvorens verwerking in de clonogene assay kan plaatsvinden, moet het tumorveefsel worden gedissocieerd in losse cellen, tenzij er sprake is van een zogenaamde "natuurlijke" single cell suspensie (bijvoorbeeld ascites van maligne ovariumtumoren). Deze dissociatie kan mechanisch of enzymatisch gebeuren. De verschillende wijzen van dissociatie zullen uitvoerig in deel II-2 van dit hoofdstuk besproken worden.

De na dissociatie ontstane single cell suspensie wordt vervolgens verdeeld over een aantal kweekbuizen. Aan deze buizen, op één na welke dient als controle, worden cytostatica toegevoegd: per buis één bepaald cytostaticum in één bepaalde concentratie. Hoevel Salmon et al (1978) in eerste instantie meer concentraties per cytostaticum gebruikten, gingen zij later in navolging van Von Hoff et al (1980) over op het testen van slechts één concentratie per cytostaticum. De belangrijkste reden hiervan was het feit dat anders de hoeveelheid tumorveefsel per patiënt meestal te beperkt was om meer cytostatica te testen. De incubatietijden met cytostatica werden door Salmon et al (1978) arbitrair bepaald op één uur. Een cytostaticum kan d.m.v. wasprocedures worden verwijderd: deze wasprocedures bestaan uit het in een cytocentrifuge afdraaien van de kweekbuizen waardoor de cellen op de bodem van de buizen terechtkomen. Vervolgens wordt de er zich boven bevindende vloeistof afgezogen en vervangen en worden de cellen opnieuw gesuspenderd. Het is meestal noodzakelijk deze procedure één of meerdere keren te herhalen.

Omdat voor celcyclusfase specifieke cytostatica de incubatietijd van één uur als te kortdurend wordt beschouwd, hebben vele onderzoekers echter ook gebruik gemaakt van zogenaamde continue incubaties, waarbij het cytostaticum mee in kweek gebracht wordt.

De celsuspensies uit de verschillende kweekbuizen worden, nadat een speciaal samengesteld medium en 0,3% vloeibare agar zijn toegevoegd, gepipetteerd op kort tevoren gemaakte, eveneens speciaal

samengestelde, voedingsbodems met 0,5% agar. Het resultaat is een petrischaaltje (doorsnede 3.5 cm) met een dubbele laag agar (0,5% en 0,3%), met in de bovenste laag verspreid de losse cellen.

Het aantal in kweek gebrachte cellen is voor alle voedingsbodems gelijk en bedraagt, afhankelijk van de verwachte coloniegroei, tussen de 2 en 5 x 10E5 cellen. In tabel I is de samenstelling van de

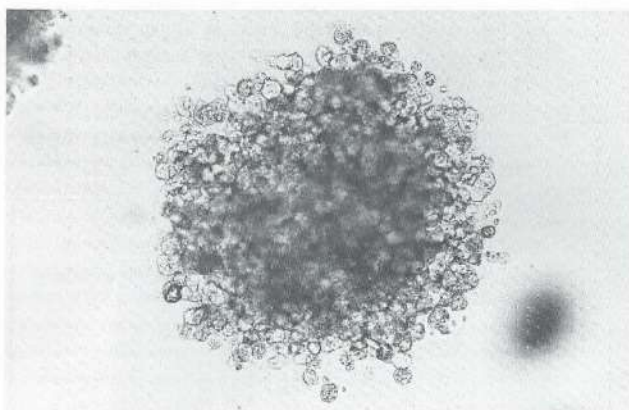
Tabel I

Samenstelling van de kweekbodems zoals ontwikkeld door Hamburger en Salmon.

Bovenste laag	Onderste laag
Losse cellen	
0,3% agar	0,5% agar
CMRL 1066 kweekmedium	McCoy's kweekmedium
10% foetaal kalverserum	15% foetaal kalverserum
5% paardeserum	
Insuline	Tryptic soy broth
Vitamine C	Asparagine
Asparagine	Diethylaminoethyl-dextraan
Diethylaminoethyl-dextraan	Glutamine
Glutamine	Natriumpyruvaat
Penicilline	L-serine
Streptomycine	Penicilline
Mercaptoethanol	Streptomycine

voedingsbodems aangegeven. Hierbij moet worden opgemerkt dat de samenstelling van paardeserum en foetaal kalverserum slechts in beperkte mate bekend is. Dit zou niet eens zo bezwaarlijk zijn als de samenstelling van boven genoemde sera niet zou wisselen, afhankelijk van de gebruikte batch. Deze sera zijn echter voor bijna al het kweekwerk, dus ook voor de clonogene assay, onontbeerlijk voor de celgroei. Direct na het opbrengen van de tweede laag agar worden de voedingsbodems in een speciale broedstof geplaatst (T 37°C, CO2% 5-7%, vochtigheid 100%).

Na 2 tot 3 weken worden de kveken onder de omkeermicroscop beoordeeld op de aanwezigheid van colonies (zie figuur 1). Verondersteld wordt



Figuur 1.
Colonie van een tumor van de tumorlijn HEP-2 (vergroting 100 x).

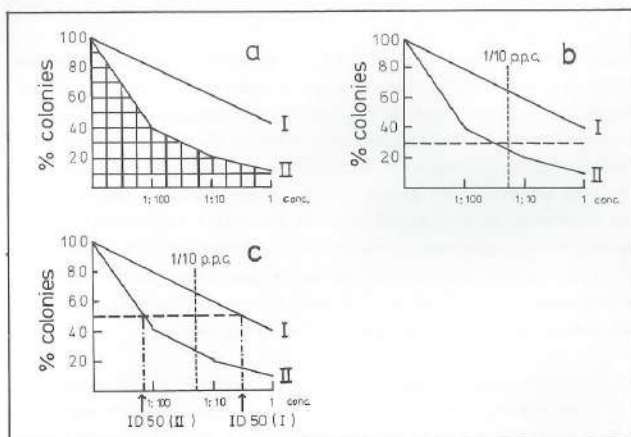
dat deze colonies kunnen ontstaan uit één enkele cel. In het algemeen worden in de controlekweken niet meer dan enkele honderden colonies geteld. In de praktijk blijkt het onmogelijk te zijn celklompen, bestaande uit niet optimaal gedissocieerd weefsel of veer samengeklonterde cellen, te onderscheiden van echte colonies (zie ook Hoofdstuk III). Een maat die meestal wordt genomen voor de coloniegroei is de zogenaamde cloning efficiency: het aantal colonies wordt gedeeld door het aantal in kweek gebrachte cellen, en vervolgens uitgedrukt als een percentage. Met humane tumoren worden zelden hogere cloning efficiencies gevonden dan 1% (Hamburger en Salmon verklaarden dit door er van uit te gaan dat alleen de zogenaamde stamcellen, die geacht worden $\pm$ 1% van de totale celpopulatie uit te maken, kunnen uitgroeien tot een colonie (zie Inleiding en Hoofdstuk I). Het tellen van colonies hetgeen meestal met de hand geschiedt is een tijdrovend en uiterst secuur werk. Automatisering blijkt slechts mogelijk m.b.v. kostbare computergestuurde telapparatuur.

II-1-2. Evaluatie

Vergelijking van het aantal colonies in de met cytostatica behandelde kweken met het aantal colonies in de controle kweken geeft een indruk van de in vitro werkzaamheid van een cytostaticum bij de in kweek gebrachte tumor. Een effect zal zich uiten in een afname van het aantal colonies. In figuur 2 is dit grafisch weergegeven voor 2 fictieve patiënten. Het aantal colonies wordt daarbij uitgedrukt als een percentage van het aantal colonies dat groeit in de controle kweken. Hoevel onderzoekers vooral geïnteresseerd zijn in het aantal colonies, zou ook een eventuele afname in grootte van de colonies van belang kunnen zijn (Kirkels et al 1983); het meten van de grootte van een colonie vereist echter automatische telapparatuur.

Verskillende methoden worden gebruikt ter bepaling van de grens tussen gevoeligheid en resistentie voor een cytostaticum (figuur 2). Salmon et al (1978) bepaalden een zogenaamde "sensitivity index" op basis van de oppervlakte onder de dosis-response curve (Fig. 2a). Deze onderzoekers stelden bij eerdere experimenten voor verschillende in de kliniek gebruikelijke cytostatica op basis van vergelijking van de in vitro gevoeligheid van tumoren met de gevoeligheid in de kliniek de grenzen vast van gevoeligheid en resistentie. Als de sensitivity index van een bepaalde dosis-response curve onder respectievelijk boven die grens lag, beschouwden zij de geteste tumor als gevoelig respectievelijk resistent voor dat cytostaticum. De gebruikte concentraties werden zoveel mogelijk gebaseerd op farmacologische gegevens bij de mens.

Von Hoff et al (1980) gebruikten slechts één concentratie per cytostaticum, namelijk 1/10 van de piek-plasmaconcentratie (p.p.c.), d.w.z. 1/10 van de hoogste concentratie die wordt bereikt in het bloed van de patiënt (Fig. 2b). Het zou deze concentratie zijn die aanwezig is rondom het tumorweefsel van de patiënt. Indien hiermede in vitro een afname werd gezien van het aantal colonies tot 30% van de controle en minder, beschouwden zij - en in navolging van hen vele andere onderzoekers - de tumor als in vitro gevoelig voor dat bepaalde cytostaticum. Indien deze afname tot 30% of minder niet werd bereikt, werd de tumor als resistent beoordeeld.



Figuur 2.

De fictieve in vitro gevoeligheid van tumoren van 2 verschillende patiënten voor één cytostaticum. De grafieken tonen drie verschillende mogelijkheden om de in vitro effecten van een cytostaticum te interpreteren.

- De oppervlakte onder curve II is kleiner dan de oppervlakte onder curve I. Per cytostaticum is de oppervlakte bepaald die de grens aangeeft tussen gevoeligheid en resistentie.
- Als grens tussen gevoeligheid en resistentie wordt een colonie reductie genomen van 70% bij de 1/10 p.p.c. (piek plasma concentratie) van een cytostaticum bij de mens, dat wil zeggen 1/10 van de maximale concentratie van dit cytostaticum dat in het bloed bij de mens wordt bereikt. In dit voorbeeld is dus de tumor van patient II gevoelig en die van patient I ongevoelig. Bij deze methode kan men volstaan met het gebruik van één concentratie in de clonogene assay, namelijk 1/10 p.p.c.
- Voor beide tumoren wordt de ID 50 berekend, dat wil zeggen de concentratie die een colonie reductie zou geven van 50%. Deze ID 50 wordt vervolgens vergeleken met de 1/10 p.p.c. In dit voorbeeld is de ID 50 van II kleiner dan de 1/10 p.p.c., hetgeen gevoeligheid veronderstelt en de ID 50 van I groter dan de 1/10 p.p.c., hetgeen resistentie veronderstelt.

Een andere methode, namelijk het bepalen van de ID 50, heeft weinig navolging heeft gekregen (Fig. 2c). Deze ID 50 is de concentratie die nodig zou zijn om een coloniereductie te bewerkstelligen van 50%. In

Hoofdstuk IV wordt deze ID 50 vergeleken met de 1/10 p.p.c. Hierbij wordt een ID 50 < 1/10 p.p.c. beschouwd als in vitro gevoeligheid, d.w.z. dat al 50% coloniereductie wordt gevonden bij een concentratie die lager is dan 1/10 p.p.c. Is de ID 50 > 1/10 p.p.c. dan wordt in vitro resistentie verondersteld. Om de ID 50 te berekenen moet, evenals voor de berekeningen van de oppervlakte onder de curve, worden beschikt over meer concentraties per cytostaticum.

Welke methode ook gebruikt wordt, de grenzen die worden getrokken tussen gevoeligheid en resistentie zijn arbitrair. Zij worden meestal zo gekozen dat de overeenkomst tussen de resultaten in vitro, in de clonogene assay en de resultaten in vivo, bij de mens of het proefdier, zo goed mogelijk is.

II-2. EIGEN ONDERZOEK NAAR DE INVLOED VAN DE WIJZE VAN DISSOCIATIE OP DE RESULTATEN VAN DE CLONOGENE ASSAY

II-2-1. Inleiding

Bij de clonogene assay moeten losse tumorcellen (de zogenaamde single cell suspensie) in kweek worden gebracht (Hamburger en Salmon, 1977; Salmon et al, 1978). Sommige tumoren, met name die van het ovarium, geven door middel van de vaak optredende ascites een natuurlijke single cell suspensie. De meeste maligniteiten, zoals die uit het hoofd-halsgebied, bestaan echter uit solide tumoren. Deze tumoren moeten daarom bewerkt worden teneinde een single cell suspensie te verkrijgen. In dit verband is het van belang op te merken dat een solide tumor behalve tumorcellen ook stroma, bestaande uit bindweefsel, bloed- en lymfevaten bevat.

Er zijn verschillende methoden ontwikkeld om een tumor te dissociëren. Deze kunnen worden onderverdeeld in mechanische en enzymatische dissociatie methoden. Bij de mechanische dissociatiemethoden wordt gebruik gemaakt van knippen, snijden, filteren of door naalden persen. Bij de enzymatische dissociatie methoden laat men lytische enzymen gedurende enige tijd op het tumorweefsel inwerken. De meest gebruikte enzymen zijn collagenase, trypsine en DNase. In combinatie met vooral

de enzymatische dissociatie methoden kunnen bovendien chelerende verbindingen worden gebruikt. Deze stoffen zijn in staat calcium en magnesium te onttrekken aan hun omgeving. Calcium en Magnesium zijn tweewaardige kationen, die geacht worden een belangrijke rol te spelen bij het instandhouden van de onderlinge samenhang van cellen. De belangrijkste vertegenwoordiger van deze groep is EDTA.

Geen enkele methode is in staat een solide tumor volledig te dissociëren tot een single cell suspensie. Bovendien overleven vele cellen de behandeling niet. Een aantal parameters speelt bij de beoordeling van een dissociatie methode een belangrijke rol. De meest onderzochte parameters zijn opbrengst, d.w.z. het aantal cellen per cm³ tumorweefsel en viabiliteit van de verkregen suspensie. De viabiliteit wordt bepaald met behulp van een kleurmethode, zoals ontwikkeld door Pappenheimer (1917). Deze methode gaat uit van de veronderstelling dat dode cellen worden gekleurd door trypaan blauw, terwijl levende cellen deze stof buiten kunnen houden. Voor de clonogene assay dient bovendien onderzocht te worden in hoeverre de gedissocieerde cellen aanleiding geven tot coloniegroei. Alhoewel een positieve correlatie verwacht zou kunnen worden tussen viabiliteit en het aantal cellen dat na in kweek te zijn gebracht uitgroeit tot een colonie (de zogenaamde cloning efficiency) wordt deze door vele kwekers niet gevonden. (Cowan et al, 1984; Von Hoff et al, 1981a). Hoewel een aantal onderzoekers twee of meer dissociatie methoden met elkaar heeft vergeleken, werd hierbij geen gebruik gemaakt van hoofd-halstumoren (Pavelic et al, 1980; Richmond en Billington, 1981; Wake et al, 1981; Hamburger et al, 1982; Agrez et al, 1982; Dibner en Nakeff, 1983). De resultaten uit de afzonderlijke studies kunnen slechts in beperkte mate met elkaar worden vergeleken. Indien bijvoorbeeld hetzelfde enzym werd gebruikt, verschilden zowel de concentratie hiervan als de tijd gedurende welke men het enzym op de tumor liet inwerken (de zogenaamde incubatietijd).

Een belangrijke vraag die in bijna geen enkele studie werd gesteld, is of de in vitro gevoeligheid van een tumor voor cytostatica niet wordt beïnvloed door de gebruikte dissociatie methode. Er van uitgaande dat 1 cm³ weefsel gemiddeld 10E9 cellen bevat (Slocum et al, 1980) is het rendement van welke dissociatie methode dan ook gering, nl. < 10E8=

10% van het totaal. Niet bekend is in hoeverre via dissociatie verkregen cellen beschouwd mogen worden als een aselechte steekproef van het oorspronkelijk tumorweefsel. Engelholm et al (1985) vonden afhankelijk van de gebruikte dissociatie methode een verschillende DNA distributie bij de na dissociatie ontstane celsuspensies. Dissociatiemethoden zouden kunnen selecteren voor subpopulaties van cellen die onderling verschillen in gevoeligheid voor cytostatica, zodat de vervolgens in vitro gemeten gevoeligheid niet overeen komt met de gevoeligheid van de gehele tumor. Een tweede mogelijkheid is dat de dissociatie methode de in vitro gevoeligheid voor cytostatica van de cellen zelf beïnvloedt. Van trypsine wordt bij voorbeeld gezegd dat dit enzym de celwand beschadigt (Grabstein en Cohen, 1965), zodat het denkbaar is dat bepaalde cytostatica hierdoor gemakkelijker de celwand kunnen passeren. Voor deze middelen zou dan een grotere gevoeligheid worden gevonden. Tot nu toe zijn slechts enkele gegevens bekend omtrent de invloed van een dissociatie methode op in vitro gevoeligheid voor chemotherapie. Rasey en Nelson (1980) zien bijvoorbeeld een wisselende gevoeligheid voor cyclofosfamide en bleomycine afhankelijk van de gebruikte dissociatie methode.

Gelet op het in de vorige alinea besproken feit dat weinig bekend is omtrent de invloed van de gebruikte dissociatie methoden terwijl het op z'n minst niet onwaarschijnlijk is dat de dissociatie methode van belang is hebben wij drie verschillende dissociatie methoden met elkaar vergeleken voor wat betreft de parameters: opbrengst, viabiliteit, cloning efficiency en gevoeligheid voor cytostatica. Er werd gebruik gemaakt van één mechanische dissociatie methode en twee enzymatische dissociatie methoden.

Deze studie bestaat uit twee delen, A en B. In deel A worden de meest geteste parameters, namelijk opbrengst en viabiliteit onderzocht, in deel B bovendien de cloning efficiency en de gevoeligheid voor cisplatinum. Hierbij is gebruik gemaakt van de mogelijkheid humane hoofd-halstumoren te laten groeien in naakte muizen. In ons laboratorium konden wij gebruik maken van een tiental tumorlijnen in naakte muizen, afkomstig van patiënten met een hoofd-hals maligniteit. Tumoren afkomstig van deze lijnen werden gedissocieerd. Vervolgens werden de opbrengst en de viabiliteit bepaald. De resultaten worden

beschreven in deel A.

In deel B worden de resultaten vermeld die werden verkregen met een groot aantal verschillende tumoren van één in naakte muizen groeiende tumorlijn. De eerste passage van deze tumorlijn werd verkregen door het inspuiten van losse cellen van een bekende cellijn (HEP-2), ontstaan uit een hoofd-halstumor (Moore et al, 1955). De tumoren werden gedissocieerd en daarna in kweek gebracht, zowel met als zonder cytostaticum. De cellijn HEP-2 groeit ook rechtstreeks in agar. Hierdoor was het mogelijk een eventuele toxische invloed van de gebruikte dissociatie methode op de cellen zelf op te sporen. Als cytostaticum werd cisplatinum gekozen, ten eerste omdat het één van de meest werkzame middelen is bij hoofd-halstumoren (Taylor IV, 1983) en ten tweede omdat bij eerder onderzoek was gebleken dat met behulp van dit middel in de clonogene assay een dosisafhankelijke respons kon worden verkregen.

II-2-2. Materiaal en methoden

Materiaal en methoden; deel A

Xenografts

Gebruik werd gemaakt van solide tumoren, afkomstig van tien verschillende tumorlijnen in naakte muizen. Deze tumorlijnen werden als volgt verkregen. Tumormateriaal van tevoren onbehandelde patiënten met een hoofd-halstumor werd onder steriele omstandigheden uitgenomen en vervoerd naar het laboratorium in Hanks' gebufferde zoutoplossing met 200 u/ml penicilline en 200 µg/ml streptomycine. Het tumorweefsel werd vervolgens gesneden in kleine stukjes van 3 x 3 x 3 mm³ en daarna subcutaan geïmplanteerd in beide flanken van de thymusloze muizen (B10, LP/CPL, 8-10 weken oud). De hieruit groeiende solide tumoren werden indien zij een grootte hadden bereikt van tussen de 800 en 1000 mm³ op gelijke wijze in serie overgezet in een nieuwe groep naakte muizen. Door deze procedure voortdurend te herhalen, kon worden beschikt over permanente tumorlijnen (Braakhuis et al, 1984).

Dissociatie

Na excisie van de tumor werd het weefsel gesneden in millimeter kleine blokjes in McCoy's 5A medium met 15% foetaal kalverserum (hitte geïnactiveerd). Deze procedure nam 10 minuten in beslag. De hierbij vrijgekomen cellen werden opgevangen en door een filter gehaald. Van de aldus op mechanische wijze verkregen suspensie werden het aantal cellen en de viabiliteit bepaald met behulp van een haematocytometer. De dode cellen worden gekleurd door trypaan-blauw, terwijl de levende cellen deze stoffen buiten kunnen houden. Het overgebleven weefsel werd in twee gelijke delen gescheiden. De ene helft werd geïncubeerd met het enzym collagenase (type II, 150 units/µg, 0,2%). De andere helft met trypsine (0,2%). De totale incubatie duurde 2 uur (bij 37°C, CO₂ 5-7%, 100% vochtigheid). Na 1 uur werden de reeds vrijgekomen cellen opgevangen (de 1 uur fractie) en werd een verse enzym oplossing aan het tumorweefsel toegevoegd. De 1 uur fracties werden geïncubeerd met McCoy's medium + 15% foetaal kalverserum. Na 2 uur werd het tumorweefsel, geïncubeerd met collagenase en het tumorweefsel, geïncubeerd met trypsine, gefilterd en vervolgens gewassen. De twee aldus ontstane single cell suspensies werden de twee uur fracties genoemd. De opbrengsten en viabiliteit van de 1 en 2 uur fracties werden bepaald voor beide enzymen. Per enzym werden voor de totale opbrengst de 1 en 2 uur fractie bij elkaar opgeteld en werd de totale viabiliteit herberekend door het totaal aantal viabele cellen van de 1 en 2 uur fracties tezamen te delen door de totale opbrengst.

Materiaal en methoden; deel B

Xenograft

Van de humane cellijn HEP-2 werden 3 x 10⁶ cellen subcutaan in beide flanken geïnjecteerd van vrouwelijke thymusloze muizen (B10 LP/CPL, 8-10 weken oud). Na enige dagen tot weken ontstonden op de meeste injectie plaatsen tumoren. Negen tumoren van deze zogenaamde eerste passage werden vervolgens op verschillende tijdstippen uitgenomen, gedissocieerd en vervolgens in kweek gebracht. Het volume werd als volgt berekend: lengte x breedte x hoogte x 0.5 (Looney et al, 1973).

Een tumor van deze eerste passage werd gesneden in fragmenten van 3 x 3 x 1 mm en wederom subcutaan geïmplantéerd in beide flanken van een nieuwe groep thymusloze muizen (tweede passage). Na 3-10 weken begon een meerderheid van deze fragmentjes uit te groeien tot solide tumoren. Acht tumoren werden na excisie gedissocieerd en in kweek gebracht. Ook van de vierde passage werden tumoren in kweek gebracht (11 tumoren). Alle procedures vonden plaats onder absoluut steriele omstandigheden in een laminar flow kast.

Dissociatie

De dissociatie vond plaats op de reeds in deel I beschreven wijzen met dit verschil dat er geen verdeling werd gemaakt in één en twee uur fracties. Opbrengst en viabiliteit werden uitgerekend.

Clonogene assay

De single cell suspensies werden in kweek gebracht in een dubbele laag zachte agar op de wijze zoals ontwikkeld door Hamburger en Salmon (1977) en beschreven in het eerste gedeelte van dit hoofdstuk. Paardeserum werd echter vervangen door foetaal kalverserum en mercapto-ethanol werd niet gebruikt. Eveneens werden cellen direct van de cellijn HEP-2 in kweek gebracht, met andere woorden zonder passage in de thymusloze muis. Van deze cellijn, die als monolayer culture in leven wordt gehouden, werd de celsuspensie in drie buizen verdeeld en eveneens gedurende 2 uur bevaard in de CO₂ stoof. Om een eventueel direct toxische invloed van de enzymen op het spoor te komen, werd aan één buis collagenase, en aan één buis trypsine toegevoegd in de bovengenoemde concentraties. Per kweekschachtje werden 3 x 10⁵ cellen in kweek gebracht, of 3 x 10⁴ indien het cellen betrof rechtstreeks van de cellijn. Alle kweken werden in triplo uitgevoerd. Het aantal colonies dat groeide bleek bij eerder onderzoek (resultaten niet vermeld) recht evenredig met het aantal opgebrachte cellen. Aan deze voorwaarde moet worden voldaan alvorens cytostatica kunnen worden getest. Verspreid over de periode, waarin de experimenten met de solide tumoren plaatsvonden, werd de cellijn HEP-2 in het totaal vier maal in de clonogene assay getest.

Cytostaticum

Cisplatinum (Platinol, Bristol Myers) werd in de volgende 3 concentraties aan de bovenlaag toegevoegd: 0.01 µg/ml, 0.1 µg/ml en 1 µg/ml. De kweken werden geplaatst in een stoof bij 37 °C, 7.5% CO₂ en 100% vochtigheid. Een dag na het inzetten van een kweek werden de kweekschachtjes onderzocht op de aanwezigheid van celklompen met behulp van een omkeermicroscop. Indien geen sprake was van een perfecte single cell suspensie werden de resultaten van die kweek niet verwerkt.

Verwerking resultaten

De colonies werden geteld na 3 weken. (bij een vergroting van 40 en 100 x). Cel aggregaten bestaande uit meer dan 20 cellen werden beschouwd als colonies. De kweken van de cellijn werden na 2 weken geteld. De cloning efficiency werd gedefinieerd als het aantal colonies per kweekschachtje (controles), uitgedrukt als het percentage van het aantal opgebrachte cellen (3 x 10⁵ of 3 x 10⁴). De in vitro gevoeligheid voor cisplatinum werd als volgt berekend: het aantal colonies dat groeide in de met cisplatinum behandelde kweken wordt gedeeld door het aantal colonies dat groeit in de controlekweken, en vervolgens uitgedrukt als een percentage. Indien minder dan 20 colonies groeiden in de controle kweken werd de in vitro gevoeligheid voor cisplatinum buiten beschouwing gelaten.

Statistiek

Bij de statistische verwerking van de resultaten werd gebruik gemaakt van de symmetrie toets van Wilcoxon (met een betrouwbaarheidsinterval van $p < 0.01$). Correlaties werden getoetst met behulp van de Spearman rank correlatie coefficienten ($p < 0.05$).

II-2-3. Resultaten

Resultaten; deel A

Bij de mechanische dissociatie werd gemiddeld dezelfde opbrengst

Tabel II

Gemiddelde opbrengst en viabiliteit van humane hoofd-hals tumoren afkomstig van 10 verschillende tumorlijnen bij drie verschillende dissociatie methoden ($\pm$ SD)

	Opbrengst (cellen/cm ³ x 10 ⁶)	Viabiliteit (%)
Mechanische fractie	15,67 ($\pm$ 15,43)	15 ($\pm$ 10)
Collagenase 1 uurs fractie	3,85 ($\pm$ 3,45)	14 ($\pm$ 18)
Collagenase 2 uurs fractie	9,77 ($\pm$ 9,27)	22 ($\pm$ 22)
Collagenase 1 + 2 uurs fractie	13,52 ($\pm$ 10,86)	21 ($\pm$ 22)
Trypsine 1 uurs fractie	2,84 ($\pm$ 2,52)	31 ($\pm$ 21)
Trypsine 2 uurs fractie	8,56 ($\pm$ 12,07)	50 ($\pm$ 19)
Trypsine 1 + 2 uurs fractie	11,40 ($\pm$ 12,54)	41 ($\pm$ 18)

verkregen als bij beide enzymatische methoden (Tabel II; 15.67 x 10E6 cellen/cm³ tegenover 13.52 x 10E6 cellen/cm³ en 11.40 x 10E6 cellen/cm³). De hoogste gemiddelde viabiliteit, 41%, werd gezien bij de dissociatie methode met trypsine tegenover 21% bij het gebruik van collagenase en 15% bij de mechanische dissociatie (significant verschillend). Bij beide enzymatische dissociatie methoden was het tweede uur van de incubatie het meest effectief: een betere opbrengst en een betere viabiliteit (hoewel niet significant verschillend).

Resultaten; deel B

De gemiddelde opbrengsten van de tumoren van de naakte muizenlijn HEP-2 staan vermeld in tabel III. Deze zijn beter dan die welke verkregen werden met de xenografts die werden verkregen met tumoren rechtstreeks van de patiënt. In verband met een te geringe hoeveelheid tumorweefsel werd 3 x de dissociatie met trypsine achterwege gelaten. De mechanische dissociatie en de dissociatie met collagenase geven gemiddeld een zelfde opbrengst te zien. (respectievelijk 53.48 x 10E6 cellen per cm³ en 57.19 x 10E6 per cm³). Deze zijn hoger dan de opbrengst verkregen met trypsine (32.81 x 10E6 cellen per cm³, significant verschillend). Het valt op dat voor beide enzymatische

methoden de viabiliteit superieur is ten opzicht van de mechanische dissociatie (significant verschillend)

De cloning efficiencies staan eveneens vermeld in Tabel III. Een tumor gaf geen groei te zien, waarschijnlijk ten gevolge van een procedurefout. Eénmaal bleken alle drie de fracties geïnfecteerd,

Tabel III

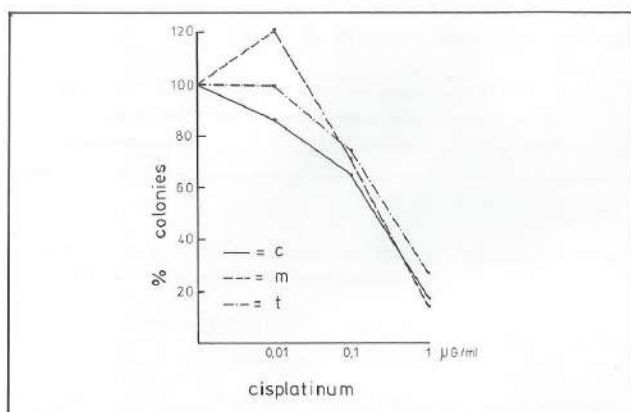
Gemiddelde opbrengst, viabiliteit en cloning efficiency van 28 tumoren van de tumorlijn HEP-2 bij drie verschillende dissociatie methoden ($\pm$ SD).

	Opbrengst (cellen/cm ³ x 10 ⁶)	Viabiliteit (%)	Cloning efficiency (%)
Mechanische fractie	53,48 ($\pm$ 29,07)	12 ($\pm$ 7)	0,019 ($\pm$ 0,045)
Collagenase fractie	57,19 ($\pm$ 31,15)	36 ($\pm$ 17)	0,181 ($\pm$ 0,188)
Trypsine fractie	32,81 ($\pm$ 19,75)	33 ($\pm$ 19)	0,281 ($\pm$ 0,330)

Cloning efficiency: $\frac{\text{aantal colonies}}{\text{aantal in kweek gebrachte cellen}}$

waarschijnlijk op basis van een reeds geïnfecteerde tumor bij de muis. Eénmaal was de collagenase fractie geïnfecteerd en éénmaal de trypsine fractie. De gemiddelde cloning efficiencies van beide enzymatische fracties waren ongeveer 10 x zo hoog als de cloning efficiencies van de mechanische fractie. (0.181% en 0.281% versus 0.019%). Deze verschillen zijn significant. Na mechanische dissociatie werd 5 x geen colonie groei waargenomen (19%), terwijl die wel het geval bleek na de enzymatische dissociatie. De cloning efficiency rechtstreeks van de cellijn varieerde tussen de 5 en 10%. Een goede viabiliteit van de celsuspensies verkregen uit de solide tumoren ging niet gepaard met een hoge cloning efficiency.

De dosis respons curves van de solide HEP-2 tumoren voor cisplatium worden weergegeven in Fig. 3. De daarbij behorende gegevens zijn vermeld in tabel IV. Grote verschillen tussen de 3 dissociatie methoden werden niet gezien. Bij toenemende concentratie cisplatium



Figuur 3.
De gemiddelde gevoeligheid voor cisplatinum van tumoren van de tumorlijn HEP-2 voor drie verschillende dissociatie methoden.

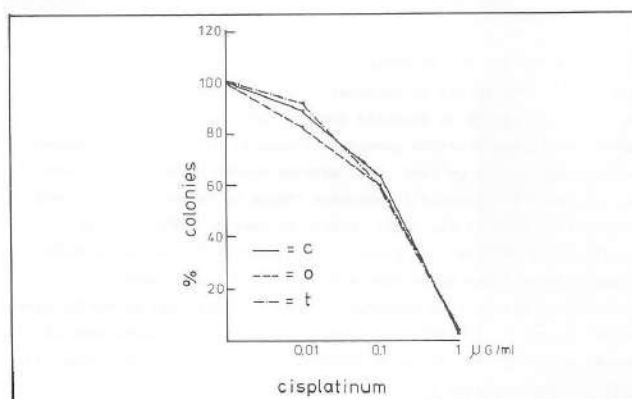
C = collagenase
M = mechanisch
T = trypsine

Tabel IV

Gemiddelde gevoeligheid van 28 tumoren van de tumorlijn HEP-2 voor drie verschillende concentraties cisplatinum bij drie dissociatie methoden. uitgedrukt als een percentage van het aantal in de controles gegroeide colonies ($\pm$ SD)

	0,01 ug/ml (%)	0,1 ug/ml (%)	1 ug/ml (%)
Mechanische fractie	121 ($\pm$ 53)	71 ($\pm$ 38)	14 ($\pm$ 14)
Collagenase fractie	86 ($\pm$ 18)	65 ($\pm$ 22)	17 ($\pm$ 12)
Trypsine fractie	99 ($\pm$ 19)	74 ($\pm$ 21)	26 ($\pm$ 17)

groeiden er minder cellen uit tot colonies. Bij de mechanische dissociatie werd voor de laagste concentratie cisplatinum een geringe groeistimulatie waargenomen (niet significant verschillend ten opzichte van beide enzymatische methoden). De celsuspensie ontstaan na inwerking van trypsine was minder gevoelig voor de hoogste concentratie cisplatinum dan de mechanische en de collagenase fractie. (trypsine: 26% versus mechanisch en collagenase: 14 en 17%; significant verschillend). De standaarddeviatie ten opzichte van het gemiddelde van de mechanische suspensie was groter dan de standaarddeviatie van beide enzymatisch verkregen suspensies. (zie tabel IV). Cellen rechtstreeks van de cellijn HEP-2 vertoonden eveneens een dosis afhankelijke gevoeligheid voor cisplatinum (Fig.4, tabel V). Ten opzichte van de solide tumoren was er sprake van iets toegenomen gevoeligheid met name voor de hoogste concentraties cisplatinum (significant verschillend). Er werd geen invloed waargenomen van collagenase en trypsine op de cellen zelf: de gevoeligheid veranderde niet. De standaard deviaties ten opzichte van



Figuur 4.
De gemiddelde gevoeligheid voor cisplatinum van de cellijn HEP-2, onbehandeld, na inwerking van trypsine en na inwerking van collagenase.

C = Collagenase
O = Onbehandeld
T = Trypsine

Tabel V

Gemiddelde gevoeligheid van de cellijn HEP-2 voor drie verschillende concentraties cisplatinum, onbehandeld en na inwerking van collagenase en trypsine, uitgedrukt als een percentage van het aantal in de controles gegroeide colonies ($\pm$ SD).

	0,01 ug/ml (%)	0,1 ug/ml (%)	1 ug/ml (%)
Onbehandeld	83 ($\pm$ 10)	60 ($\pm$ 11)	4 ($\pm$ 4)
Collagenase fractie	89 ($\pm$ 7)	64 ($\pm$ 15)	4 ($\pm$ 1)
Trypsine fractie	92 ($\pm$ 5)	59 ($\pm$ 11)	4 ($\pm$ 2)

het gemiddelde van de cellijn waren veel kleiner dan die welke bij de solide tumoren werden gevonden.

II-2-4. Discussie

De opbrengsten die met de xenografts van primaire hoofd-halstumoren werden verkregen en met de xenografts ontstaan na inspuiting van de cellijn Hep-2 liggen in dezelfde orde van grootte als die welke door andere onderzoekers werden gevonden (Slocum et al, 1980) met tumoren rechtstreeks van de patiënt. Veel auteurs vinden hogere opbrengsten met enzymatische dissociatie methoden (Rasey en Nelson, 1980; Pavelic et al, 1980; Kern et al, 1982; Dibner en Nakeff, 1983). In ons materiaal was dit niet het geval. De opbrengsten bij de mechanische dissociatie methoden waren niet minder dan die met de beide enzymatische dissociatie methoden. Dit komt overeen met de bevindingen van Hamburger et al (1982). De viabiliteit was hoger indien gebruik gemaakt werd van een van beide enzymatische dissociatie methoden. Dit wordt ook door anderen gevonden. (Dibner en Nakeff, 1983; Pavelic et al, 1980; Kern et al, 1982; Rasey en Nelson, 1980; Hamburger et al, 1982). Het lijkt verstandig niet te kort te incuberen met collagenase en trypsine daar zowel de opbrengst als de viabiliteit het grootst zijn gedurende het tweede uur van de incubatie, zoals blijkt met de xenografts van de primaire hoofd- halstumoren. Nog langere incubaties hebben het praktische bezwaar dat de verkregen suspensie niet nog

dezelfde dag in kweek kan worden gebracht.

Hoewel opbrengst en viabiliteit geen onbelangrijke parameters zijn mede gezien de vaak geringe hoeveelheid tumorweefsel die voorhanden is, is het niet juist op basis daarvan voor de clonogene assay de voorkeur te geven aan enzymatische dissociatie methoden. Ook andere parameters moeten worden vergeleken. Cloning efficiency en de invloed op de in vitro gevoeligheid voor cytostatica spelen een belangrijke rol.

Indien gebruik gemaakt werd van een enzymatische dissociatie methode was de cloning efficiency veel beter dan indien de cellen mechanisch werden gedissocieerd. Een betere groei uitte zich niet alleen in een hogere cloning efficiency, maar ook in het feit dat 5 maal geen groei werd vaargenomen met de mechanische fractie, maar wel met de enzymatische fracties. Met andere typen tumoren werden soortgelijke resultaten gevonden (Hamburger et al, 1982; Pavelic et al, 1980; Kern et al, 1982; Warenus en Bleehen, 1982).

Bij alle drie de dissociatie methoden werd geen correlatie gevonden tussen de viabiliteit en de cloning efficiency. Ook anderen (Weisenthal et al, 1983; Covan et al, 1984) konden niet aantonen dat de viabiliteit voorspellende waarde heeft voor het al dan niet ontstaan van colonies. Derhalve is het niet verstandig op basis van de viabiliteitsbepalingen te beslissen over het al dan niet in kweek brengen van een suspensie.

De cloning efficiencies van de cellijn HEP-2 zijn veel hoger dan die van de solide tumoren, ontstaan uit dezelfde cellijn, namelijk tussen de 5 en 10% tegenover gemiddeld 0.281% na dissociatie met trypsine. Hoewel dit voor de hand lijkt te liggen, vanwege het feit dat een cellijn, in tegenstelling tot solide tumoren, uitsluitend uit maligne cellen bestaat, in tegenstelling tot de solide tumoren, is het bekend dat veel hoofd-halscellijnen geen coloniegroei geven in clonogene assays. Easty et al (1981) waren in staat 10 nieuwe cellijnen te maken. Slechts 2 cellijnen groeiden ook in agar. Bovendien bleek dat niet alle cellijnen, zoals de door ons gebruikte cellijn HEP-2 ingespoten in de thymusloze muis aanleiding gaven tot het ontstaan van

solide tumoren.

De gemiddelde dosis respons curves met cisplatinum van de drie dissociatiefractionen verschilden slechts in geringe mate. Per individuele tumor daarentegen, werden soms grote verschillen gezien. Indien de mechanische methode werd gebruikt werden voor de drie gebruikte concentraties grotere standaarddeviaties gevonden ten opzichte van het gemiddelde dan indien één van beide enzymatische dissociatie methoden werd gebruikt, maar ook indien met collagenase of trypsine werd gedissocieerd, werd een aanzienlijke spreiding waargenomen. Derhalve kan niet worden volstaan met het testen van slechts één of twee tumoren. De standaard deviatie bij de cel suspensies rechtstreeks van de cellijn HEP-2 is kleiner, zodat het mogelijk is dat de spreiding mede wordt verklaard door verschillen in de tumoren onderling en niet alleen door de gebruikte kweektechniek.

De groeistimulatie, hoewel niet significant, die werd waargenomen met de mechanische fractie voor de laagste concentratie cisplatinum (0.01 µg/ml) werd niet gezien bij de enzymatische fracties en ook niet bij de suspensies rechtstreeks van de cellijn HEP-2. Meyskens et al (1983) zien stimulatie van coloniegroei indien getest wordt met een aantal cellen, dat ligt buiten het gebied, waarin het aantal colonies dat groeit recht evenredig is met het aantal in kweek gebrachte cellen. Wanneer steeds meer cellen worden gebruikt, treedt bij een bepaald aantal in plaats van een toename, een afname op van het aantal colonies. Dit wordt verklaard door het feit dat uitputting optreedt van de gebruikte media. Wanneer derhalve cytostatica worden getest bij te veel cellen, resulteert dit wel in een afname van het aantal cellen, maar dit zal zich dan uiten in een toename van het aantal colonies. Omdat wij altijd met aantallen cellen hebben gewerkt waarbij het aantal colonies dat groeide recht evenredig was met het aantal opgebrachte cellen, kan hierdoor de groeistimulatie niet worden verklaard. Mogelijk dat interacties tussen clonogene en niet-clonogene cellen een rol spelen. Hamburger et al (1980) toonden aan dat niet clonogene cellen (macrophagen) de groei van clonogene cellen kunnen beïnvloeden. Indien remmende cellen gevoeliger zijn voor cytostatica dan de clonogene cellen zelf, zal vooral bij lage concentraties groeistimulatie kunnen optreden.

Voor de hoogste concentratie cisplatinum (1 µg/ml) is de trypsine fractie minder gevoelig dan de collagenase fractie en de mechanische fractie (26% versus 17% respectievelijk 14%). Dit wordt niet waargenomen bij de suspensies rechtstreeks van de cellijn HEP-2. Een directe inwerking op de cellen van de enzymen kan derhalve de vat verminderde gevoeligheid voor de hoogste concentratie cisplatinum niet verklaren. Een mogelijkheid is dat dit verschil wordt veroorzaakt door een andere selectie van cellen uit het tumorweefsel door trypsine dan collagenase en de mechanische methode. Dit verschil komt voor de lagere concentraties cisplatinum echter niet aan het licht.

De gevoeligheid van de celsuspensie rechtstreeks van de cellijn HEP-2 is iets groter dan die na passage in de naakte muis, vooral voor de hoogste concentratie cisplatinum (1 µg/ml). De wat verminderde gevoeligheid van de solide tumoren hoeft niet veroorzaakt te worden door passage in de muis, maar kan ook samenhangen met het verschil in cloning efficiency. Om voldoende colonies per kweekschachtje te vinden, werden 10 maal zoveel cellen van solide tumoren in kweek gebracht, als cellen rechtstreeks van de cellijn. Bij de solide tumoren zijn er dus veel meer dode cellen in de voedingsbodems. Deze dode cellen zorgen voor een toename van de hoeveelheid DNA in de kweekmedia. Een groter gedeelte van cisplatinum wordt derhalve aan het DNA gebonden, waardoor minder vrij en dus werkzaam cytostaticum aanwezig is (Rozencweig et al, 1979). Arkin et al (1984) vonden voor onder andere vincristine en bleomycine een afnemende gevoeligheid bij een toename van de celdichtheid, zonder overigens een verklaring hiervoor te geven.

II-2-5. Conclusies

Enzymatische dissociatie methoden geven celsuspensies met een hogere viabiliteit en een betere cloning efficiency. De kans op colonie groei is groter. Anderzijds vertonen de gemiddelde dosis respons curves met cisplatinum na de 3 verschillende dissociaties een grote mate van overeenkomst, zodat voor zover men althans op de bevindingen bij één cytostaticum mag afgaan de gebruikte dissociatiemethode slechts van geringe invloed is op de werkzaamheid van het cytostaticum. Op grond van één en ander moet bij de keuze van dissociatie methode de

voorkeur vorden gegeven aan het gebruik van een enzymatische methode. Met de 3 gebruikte dissociatie methodes, maar vooral met de mechanische, werden tussen de afzonderlijke tumoren (allen afkomstig van de tumor xenograft lijn HEP-2) soms aanzienlijke verschillen in gevoeligheid gevonden, zoals blijkt uit de grote standaard deviaties. Derhalve kan niet worden volstaan met het testen van slechts één of twee tumoren.

Hoofdstuk III

Groei van hoofd-halstumoren in de clonogene assay na passage in de naakte muis

III-1. Inleiding

In Hoofdstuk I is uiteengezet dat de hoge verwachtingen die aanvankelijk bestonden ten aanzien van de bruikbaarheid van de clonogene assay als methode om de gevoeligheid van tumoren voor cytostatica bij individuele patiënten te bepalen, niet zijn uitgekomen. Ook werd aangegeven dat de clonogene assay tegenwoordig meer in de belangstelling staat als screeningsmethode voor nieuw ontwikkelde cytostatica. Het zou kunnen dat deze methode meer voorspellende waarde heeft ten aanzien van de werkzaamheid van cytostatica bij de mens, dan de bestaande screeningsmodellen, waarbij gebruik gemaakt wordt van diertumoren.

Wanneer van de toepassing van de clonogene assay als screeningsmethode gebruik gemaakt zou vorden van tumormateriaal rechtstreeks van de patiënt, zou de methode zeer arbeidsintensief zijn, alleen reeds vanwege het feit dat in de meerderheid der gevallen geen coloniegroei wordt vaargenomen. Een andere mogelijkheid is gebruik te maken van menselijk tumormateriaal groeiend in naakte muizen. In dit Hoofdstuk worden de ervaringen beschreven met de in vitro groei in de clonogene assay van menselijke hoofd-halstumoren afkomstig van xenografts in naakte muizen, waarbij een vergelijking wordt gemaakt met de in vitro groei in de clonogene assay van tumormateriaal rechtstreeks afkomstig van de patiënt.

III-2. Patiënten en methoden

Patiënten

Tumoren werden onder steriele omstandigheden verkregen van 12 niet eerder behandelde patiënten met een hoofd-hals maligniteit. Al het tumormateriaal werd tijdens de chirurgische behandeling uitgenomen en vervolgens vervoerd naar het laboratorium in een Hanks' gebufferde zoutoplossing bij kamertemperatuur. De tijd tussen het uitnemen van het tumormateriaal en de uiteindelijke verwerking hiervan bedroeg maximaal 2 uur.

Xenografts

Humane hoofd-halstumoren, groeiend bij de naakte muis werden onder steriele omstandigheden geëxcideerd en geplaatst in Hanks' gebufferde zoutoplossing. Deze tumorlijnen werden verkregen op de in Hoofdstuk II beschreven wijze (Braakhuis et al, 1984): Er werd gebruik gemaakt van 14 verschillende tumorlijnen (2e tot 11e passage). De passage in de naakte muis had geen invloed op de histologie van de tumor (Braakhuis et al, 1984).

Dissociatie

Tumorweefsel werd in mm kleine stukjes gesneden onder steriele omstandigheden in een laminaire flowkast. Deze procedure vond plaats in McCoy's 5A kweekmedium met 10% FCS (hitte geïnactiveerd) penicilline 100 u/ml en streptomycine 100 µg/ml. Alle vasprocedures werden met behulp van dit medium uitgevoerd. Vervolgens werd het weefsel gedurende 2 uur geïncubeerd met 0.2% collagenase (150 u/µg, type II, 100% vochtigheid, 7.5% CO₂, 37 gr C). Hierna werd het weefsel gevassen en aansluitend zorgvuldig gefilterd teneinde een optimale single cell suspensie te verkrijgen. Viabiliteit werd bepaald met behulp van kleuring door trypaan blauw (zie ook hoofdstuk II).

Clonogene assay

Per tumor werden de volgende aantallen cellen in kweek gebracht: 5 x

10E4, 10 x 10E4, 30 x 10E4 en 50 x 10E4 per kweekschachtje. De kweken werden in triplo uitgevoerd op kleine wijzigingen na volgens de methode ontwikkeld door Hamburger en Salmon (1977) (zie hoofdstuk II) en geevalueerd volgens de in Hoofdstuk II, paragraaf 2-2 genoemde wijze. Cloning efficiency werd berekend bij 3 x 10E5 in kweek gebrachte cellen.

Histologie

De agarbodems werden gefixeerd in 2% glutaraldehyde. Kleine blokjes, die één of meer colonies bevatten, werden uitgesneden en vervolgens gefixeerd in 2% osmium tetroxide. De blokjes werden gedehydrateerd en ingebed in Epon. Coupes met een dikte van 1 µm werden gekleurd met toluidine blauw. De colonies en het oorspronkelijke tumorweefsel werden histologisch met elkaar vergeleken.

III-3. Resultaten

De celopbrengst, de viabiliteit van de in kweek gebrachte celsuspensie en de cloning efficiency staan vermeld in Tabel I voor de tumoren rechtstreeks van de patiënt. De celopbrengst varieerde van 1.4 tot 58.6 x 10E6 cellen per cm³ weefsel met een gemiddelde van 29.7 x 10E6 cellen. De gemiddelde viabiliteit bedroeg 38% (spreiding 0-74%). Slechts één tumor groeide in agar (> 5 colonies per kweekschachtje).

De resultaten die werden verkregen met 14 verschillende tumoren na passage in de naakte muis staan vermeld in Tabel II. De gemiddelde celopbrengst bedroeg 56.2 x 10E6 cellen per cm³ en was hoger dan de opbrengst van tumoren rechtstreeks van de patiënt (significant volgens toets van Wilcoxon, p < 0.05, spreiding 13.6 tot 270.5 x 10E6 per cm³). De gemiddelde viabiliteit van de tumoren rechtstreeks van de patiënt en die groeiend als xenograft, kwamen overeen: 38 respectievelijk 45%. Van de 14 xenografts bleken er 11 (79%) in agar te groeien met meer dan 100 colonies per 3 x 10E5 opgebrachte cellen. De hoogste cloning efficiëncies werden gezien met de slecht gedifferentieerde plaveiselcelcarcinomen en met de melanomen. Tumor materiaal van patiënt CH werd zowel rechtstreeks van de patiënt in kweek gebracht als na 2 passages in de naakte muis. Colonie groei werd

Tabel I

Opbrengst, viabiliteit en cloning efficiency van 12 hoofd-hals tumoren rechtstreeks van de patient.

Patient	Histologie	Localisatie	Celopbrengst (cellen/cm ³ x 10 ⁶)	Viabiliteit (%)	Cloning efficiency (%)
D	Slecht gediff.plav.cel ca.	Orofarynx	58,6	14	0
VA	Slecht gediff.plav.cel ca.	Mondholte	34,5	0	0
E	Matig gediff.plav.cel ca.	Mondholte	39,9	46	0
VR	Matig gediff.plav.cel ca.	Hypofarynx	40,2	71	0
K	Matig gediff.plav.cel ca.	Mondholte	17,5	38	0
L	Matig gediff.plav.cel ca.	Mondholte	36,4	63	0
J	Matig gediff.plav.cel ca.	Orofarynx	33,4	10	0
BM	Goed gediff.plav.cel ca.	Orofarynx	12,6	74	0
VE	Goed gediff.plav.cel ca.	Hypofarynx	28,0	12	0
CM	Melanoom	Mondholte	1,4	39	0
EY	Adenoid cysteus ca.	Mondholte	28,7	52	0,003
N	Adenoid cysteus ca.	Orofarynx	25,3	41	0
Gemiddelde			29,7	38,3	

gediff.plav.cel ca.= gedifferentieerd plaveiselcel carcinoom

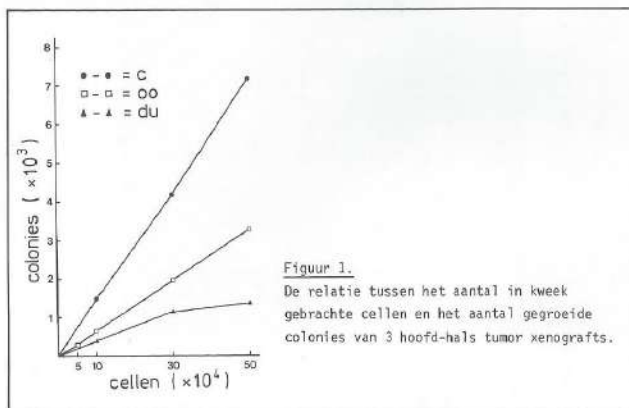
Tabel II

Opbrengst, viabiliteit en cloning efficiency van tumoren van 14 verschillende hoofd-hals tumorlijnen in de naakte muis.

Tumorlijn	Histologie	Localisatie	Celopbrengst (cellen/cm ³ x 10 ⁶)	Viabiliteit (%)	Cloning efficiency (%)
DU	Slecht gediff.plav.cel ca.	Hypofarynx	53,1	89	0,375
OO	Slecht gediff.plav.cel ca.	Hypofarynx	13,6	55	0,649
KE	Slecht gediff.plav.cel ca.	Larynx	110,3	25	0,107
B	Matig gediff.plav.cel ca.	Orofarynx	32,5	17	0,076
GU	Matig gediff.plav.cel ca.	Hypofarynx	15,4	10	0
FR	Matig gediff.plav.cel ca.	Hypofarynx	14,1	44	0,078
OV	Matig gediff.plav.cel ca.	Mondholte	71,8	22	0,031
LP	Matig gediff.plav.cel ca.	Mondholte	22,3	36	0
TI	Goed gediff.plav.cel ca.	Mondholte	270,5	51	0,102
W	Goed gediff.plav.cel ca.	Mondholte	33,5	44	0
G	Goed gediff.plav.cel ca.	Huid	29,0	51	0,077
KO	Goed gediff.plav.cel ca.	Mondholte	54,2	12	0,043
C	Melanoom	Mondholte	52,4	84	0,319
CM	Melanoom	Mondholte	14,1	90	0,162
Gemiddelde			56,2	45	0,216

gediff.plav.cel ca.= gedifferentieerd plaveiselcel carcinoom

alleen gezien na passage in het proefdier. Voor alle tumorlijnen was het aantal colonies dat groeide recht evenredig met het aantal in kweek gebrachte cellen (fig. 1). Infectie van de kweken trad niet op. De onderzochte colonies kwamen histologisch overeen met de tumor van de patiënt.



III-4. Discussie

Van de 12 tumoren rechtstreeks van de patiënt groeide er slechts één in de clonogene assay. De cloning efficiency van deze tumor was bovendien laag (0.003%). De resultaten van Cobleigh et al (1984) waren eveneens teleurstellend: van de 51 in kweek gebrachte tumoren groeide er niet één in de clonogene assay. Mattox en Von Hoff (1980a, 1980b) en Johns (1982) publiceerden enige jaren eerder betere resultaten. Bij 36-49% van de in kweek gebrachte hoofd-halstumoren werd colonie groei gezien (> 5 colonies per 5×10^5 in kweek gebrachte cellen). Een verklaring voor deze minder slechte resultaten zou kunnen zijn dat de genoemde onderzoekers ongedissocieerde celklompen voor colonies hebben aangezien. In tegenstelling tot deze onderzoekers hebben wij een enzymatische dissociatie methode gebruikt. Dit bleek noodzakelijk om een perfecte single cell suspensie te verkrijgen. Niet alleen worden ongedissocieerde celklompen gemakkelijk voor colonies

aangezien, maar bovendien vonden Agrez et al (1982) dat cell-to-cell contact cellen in "clumps" stimuleert om uit te groeien tot colonies.

Kweken van hoofd-halstumoren na passage in de thymusloze muis bleken veel succesvoller te zijn. Indien 3×10^5 cellen in kweek werden gebracht, groeiden er meer dan 100 colonies in de kwekschaaltjes bij 11 van de 14 tumoren. Het feit dat een lineaire correlatie werd gevonden tussen het aantal in kweek gebrachte cellen en het aantal colonies maakt het testen van cytostatica mogelijk.

Mattox et al (1984) en Johns en Mills (1983) konden bij 80% van de tumoren rechtstreeks afkomstig van de patiënt geen cytostatica testen omdat in de controlekweken minder dan 20-30 colonies groeiden. Voor betrouwbare drugscreening is bovendien een groter aantal colonies per kweek vereist, zoals wordt bereikt bij het gebruik van xenografts. Bovendien leveren deze tumoren groeiend bij de naakte muis meestal voldoende cellen op om tegelijkertijd 10 cytostatica te testen in meerdere concentraties. De hoeveelheid tumorweefsel rechtstreeks van een patiënt met een hoofd-halstumor is daarentegen meestal gering, vooral als men slechts de beschikking heeft over biopten. Een ander voordeel van het gebruik van xenografts is dat het testen van cytostatica kan worden herhaald omdat de naakte muis kan dienen als een voorraad van vele tumoren van dezelfde patiënt. Dit is een belangrijke kwaliteitscontrole, die gewoonlijk niet kan worden uitgevoerd indien tumormateriaal wordt gebruikt rechtstreeks van de patiënt omdat de meeste patiënten in de tussentijd één of andere vorm van therapie hebben ondergaan, hetgeen de gevoeligheid van de tumor kan beïnvloeden.

Taetle et al (1981) vonden voor xenografts van andere typen tumoren (onder andere ovariumtumoren, colontumoren en longtumoren) dat de gevoeligheid voor cytostatica in de clonogene assay niet veranderde gedurende een periode van 9 maanden. Eigen onderzoek (zie hoofdstuk V) toont echter aan dat na verschillende passages veranderingen in de gevoeligheid kunnen optreden. Het is derhalve nodig om niet te ver uiteenliggende passages te testen.

Het naakte muizenmodel op zich lijkt van waarde te zijn als

screeningsmethode voor nieuw ontwikkelde cytostatica. Xenografts bleken over het algemeen gevoelig voor middelen die effectief waren in de kliniek bij dezelfde tumorsoort (Kopper en Steel, 1975; Povlsen en Jacobsen, 1975; Osieka et al, 1977; Braakhuis et al, 1983). Dit gaat echter zeker niet altijd op. Zo kon methotrexaat, één van de meest effectieve cytostatica voor patiënten met een hoofd-halstumor, slechts een minimale groeivertraging bevestigen van enkele hoofd-halstumor xenografts (Braakhuis et al, 1983). Shorthouse et al (1980) vonden dat de gevoeligheid voor cytostatica van bronchuscarcinomen groeiend als xenograft, overeenkwam met de reactie van de oorspronkelijke tumoren op dezelfde cytostatica.

Het in vivo testen van cytostatica met xenografts is erg tijdrovend en kostbaar. Door het naakte muizenmodel en de clonogene assay te combineren kunnen deze bezwaren worden ondervangen, omdat tegelijkertijd een veel groter aantal middelen kan worden getest bij meer tumoren.

Het is opvallend dat hoofd-halstumoren na passage in de naakte muis zoveel beter groeien in de clonogene assay dan wanneer zij rechtstreeks van de patiënt in kweek worden gebracht. Slechts 13% van de tumoren van patiënten met een hoofd-hals maligniteit leverde een permanente tumorlijn op in de naakte muis (Braakhuis et al, 1984). Het feit dat deze tumoren als xenografts konden groeien, zou een aanwijzing kunnen zijn voor de onafhankelijkheid van deze tumoren van de humane omgeving. Men kan dan verwachten dat dergelijke tumoren ook eerder in vitro zullen groeien. In tegenspraak hiermede, bleek tumormateriaal van één patiënt niet rechtstreeks te kweken in de clonogene assay, maar wel na passage in de naakte muis. Derhalve is het waarschijnlijk dat het groeiproces in de naakte muis zelf de kans op in vitro groei vergroot. Meer definitieve conclusies zouden mogelijk geweest zijn indien alle tumoren zowel voor als na passage in de muis in kweek waren gebracht. Het is echter niet van tevoren bekend welke tumoren als xenografts zullen groeien. Bovendien kan het maanden tot zelfs een jaar duren voordat er sprake is van een permanente tumorlijn. Het gevaar bestaat dan dat kweekcondities niet meer identiek zijn. Veel laboratoria kennen bijvoorbeeld onverklaarde periodes van afwezigheid van in vitro groei.

Overeenkomst in gevoeligheid voor cytostatica in de clonogene assay en in het naakte muizenmodel zelf is een voorwaarde waaraan moet worden voldaan indien gebruik wordt gemaakt van het gecombineerde model om nieuwe cytostatica te testen. In hoofdstuk IV worden de effecten - in vivo en in vitro - beschreven van verscheidene cytostatica bij een aantal tumorlijnen. Vanzelfsprekend is nog belangrijker dat overeenkomst bestaat tussen in vitro gevoeligheid in de clonogene assay en gevoeligheid in de kliniek van de oorspronkelijke tumor voor cytostatica.

III-5. Conclusies

Slechts één maal (8%) groeide een tumor rechtstreeks van de patiënt in de clonogene assay volgens Hamburger en Salmon. Deze clonogene assay is derhalve ongeschikt als gevoeligheids bepaling voor cytostatica voor de individuele patiënt met een hoofd-halstumor. Veel betere resultaten werden verkregen met xenografts. Elf van de in totaal 14 humane hoofd-halstumoren groeiend bij de naakte muis (79%) gaven aanleiding tot colonie groei met meer dan 100 colonies per 3×10^5 in kweek gebrachte cellen. Voor al deze tumorlijnen bleek het aantal colonies dat uiteindelijk groeide in de agarbodem recht evenredig te zijn met het aantal in kweek gebrachte cellen. Een en ander maakt het mogelijk om cytostatica te testen. De combinatie van het naakte muizenmodel en de clonogene assay zou derhalve in beginsel geschikt kunnen zijn als een screeningsmodel voor nieuw ontwikkelde cytostatica bij hoofd-halstumoren.

De resultaten vermeld in dit hoofdstuk werden eerder gepubliceerd in de Archives of Oto-Rhino-Laryngology (1985), 241:225-232.

Hoofdstuk IV

De vergelijking van de gevoeligheid van humane hoofd-halstumor xenografts in de clonogene assay en in de naakte muis

IV-1. Inleiding

Er is grote behoefte aan betrouwbare experimentele modellen die een voorspellend waarde hebben ten aanzien van de gevoeligheid van menselijke hoofd-halstumoren voor cytostatica.

Het naakte muizenmodel lijkt geschikt om cytostatica op hun werkzaamheid te onderzoeken. Humane tumoren groeiend als xenograft in de naakte muis, zijn in het algemeen gevoelig voor dezelfde cytostatica als die bij de betreffende tumoren in de kliniek actief zijn (Shorthouse et al, 1982; Steel et al, 1983). Bovendien zijn positieve correlaties gevonden tussen de gevoeligheid van xenografts en die van de oorspronkelijke tumor bij de patiënt (Novak et al, 1978; Osieka, 1984; Fiebig et al, 1984). Een belangrijk nadeel van dit model is dat in vivo testen van xenografts tijdrovend en duur is.

De clonogene assay, zoals ontwikkeld door Hamburger en Salmon, lijkt een veelbelovend in vitro model om nieuw ontwikkelde cytostatica op hun werkzaamheid te onderzoeken (Tveit et al, 1982; Salmon, 1984; Shoemaker et al, 1985). De resultaten die met een dergelijk model worden verkregen, zouden aanwijzingen kunnen geven welke cytostatica bij voorkeur moeten worden gebruikt in fase I en fase II studies bij de mens. De resultaten met hoofd-halstumoren waren tot nu toe echter teleurstellend. Dit wordt veroorzaakt door de vaak optredende infecties, de lage celopbrengst en de lage clonage efficiëntie (Johns

en Mills, 1983; Mattox et al, 1984; Cobleigh et al, 1984; Heinerman et al, 1985). Onlangs bleek dat 79% van de humane hoofd-halstumoren groeiend in de naakte muis, in kweek gebracht konden worden in de clonogene assay met een relatief hoge clonogen efficiency, waardoor het testen van cytostatica mogelijk is (Heinerman et al, 1985; zie ook Hoofdstuk III). In deze studie werd onderzocht in hoeverre de combinatie van het naakte muizenmodel en de clonogene assay geschikt is om middelen te selecteren welke waarschijnlijk actief zijn bij hoofd-halstumoren.

IV-2. Materiaal en methoden

Xenografts

De tumorlijnen werden verkregen en in stand gehouden op de in Hoofdstuk II beschreven wijze.

De xenograft HNX-HEP-2 werd verkregen na subcutane injectie van 3×10^6 cellen van de cellijn HEP-2. Het rhabdomyosaroom van de rat (R1) werd verkregen van TNO (Rijswijk) als solide tumor en vervolgens in de naakte muis getransplanteerd. Zowel in vitro als in vivo werden tumoren getest die niet meer dan 4 passages van elkaar verschilden.

In vitro gevoeligheidsbepalingen

Dissociatie vond plaats m.b.v. 0,2% collagenase gedurende 2 uur volgens de in Hoofdstuk II beschreven wijze. Als kweekmethode werd de clonogene assay volgens Hamburger en Salmon toegepast, zoals beschreven in Hoofdstuk II.

De volgende cytostatica werden gebruikt: Bleomycine (BLM, Lundbeck), Cisplatinum (CDDP, platinol, Bristol Meyers), cyclofosfamide (Cy, ASTA-Werke), doxorubicin hydrochloride (Dox, adriablastine, Laboratoire Roger Bellon), 5-fluorouracil (5-Fu, Hoffman-la Roche), hydroxyurea (Squibb), methotrexaat (MTX, Ledertrexaat, Lederle) en vincristine sulfaat (VCR, Oncovin, Eli Lilly). Deze stoffen werden opgelost zoals aangegeven door de fabrikant. Voor de in vitro experimenten werden bovenstaande middelen verdund met fysiologisch zout in een concentratie $10 \times$ zo hoog als de hoogste concentratie die

verd getest. De cytostatica werden bewaard bij een temperatuur van -20°C . Omdat cyclofosfamide in vitro onverkzaam is, werd gebruik gemaakt van een actieve analoog van cyclofosfamide, mafosfamide (ASTA Z 7557, ASTA-verke). Dit middel werd opgelost in fysiologisch zout direct voor gebruik.

Gevoeligheidsbepalingen voor cytostatica werden uitgevoerd met een continue incubatie van 3×10^5 cellen per kweekschachtje (hoofd-halstumor xenografts) of 0.2×10^5 cellen per kweekschachtje (R1 tumor). Alle middelen werden in 3 concentraties getest met een 10-log interval. Er werd getest met klinisch relevante concentraties zoals vermeld door Alberts en Chen (1980). De piek plasma concentratie van 4-hydroxy-cyclofosfamide, de actieve metaboliet van mafosfamide en cyclofosfamide (Hilgard en Brock, 1984) werd verkregen van Voelcker et al (1984). Cytostatica of fysiologisch zout (controle kweken) werden direct voor het in kweek brengen toegevoegd. Bij ieder experiment werden 6 controlekweken getest, terwijl iedere cytostaticum concentratie werd getest in triplo.

In vivo gevoeligheidsbepalingen

Chemotherapie van tumor xenografts groeiend subcutaan in de thymusloze naakte muis, werd uitgevoerd zoals eerder gepubliceerd (Braakhuis et al, 1983). Met de behandeling werd gestart indien de tumoren een grootte bereikten van 100 mm^3 ($50\text{--}150 \text{ mm}^3$). De tumoren werden at random verdeeld in controlegroepen en groepen die behandeld werden. Per groep werden minimaal 5 tumoren getest. De cytostatica werden intraperitoneaal toegediend in een zo hoog mogelijke dosering, d.v.z. een dosering waarbij een maximaal gewichtsverlies per muis werd gezien van 15%. De volgende schema's werden gebruikt: Bleomycine: 15 mg/kg dagelijks gedurende 3 dagen, cisplatinum 3 $\mu\text{g/kg}$ dagelijks gedurende 3-4 dagen, doxorubicine: 8 mg/kg op dag 1, en 8, 5-fluorouracil: 25 mg/kg dagelijks gedurende 4 dagen. Methotrexaat: 5 mg/kg gedurende 5-7 dagen en vincristine: 1mg/kg dagelijks gedurende 2 dagen. De groeivertraging die werd veroorzaakt door de behandeling werd gedefinieerd als het verschil tussen de gemiddelde waarden van de tijdsduur die behandelde en onbehandelde tumoren nodig hadden om in volume te verdubbelen gedeeld door de gemiddelde tijdsduur die de

controle tumoren nodig hadden om in grootte te verdubbelen.

Statistiek

De gemiddelde waarden van de verdubbelingstijden van controle- en behandelde tumoren werden geevalueerd met behulp van de "one-way" variantie analyse gevolgd door de Student-Newman-Keuls test (Sokal en Rohlf, 1969).

IV-3. Resultaten.

Xenografts van 6 humane hoofd-halstumoren, 5 plaveiselcelcarcinomen en 1 adenoid cysteus carcinoom, werden op hun gevoeligheid voor cytostatica onderzocht in de clonogene assay. Bovendien werd een rhabdomyosarcoom (R1) eveneens groeiend als een xenograft in de naakte muis in deze studie betrokken. De belangrijkste karakteristieken van deze 7 tumoren zijn vermeld in Tabel I. Eerdere experimenten met de R1 tumor toonden aan dat deze tumor in hoge mate gevoelig is voor chemotherapeutische behandeling. Het kveken van tumorcellen in aantallen van 30.000 - 500.000 (Hoofd-hals xenografts) of 3000-50.000 (R1 xenografts) resulteerde voor alle gebruikte xenografts in een lineaire relatie tussen het aantal in kweek gebrachte cellen en het aantal colonies dat na 3 weken kon worden geteld. Voor een aantal tumorlijnen is deze lineaire relatie grafisch weergegeven in hoofdstuk III (Heinerman et al, 1985). Van iedere tumorlijn werden minimaal 3 verschillende tumoren getest. Bij drie experimenten werd geen coloniegroei gezien. In alle andere experimenten (17 van de 20) groeiden in de controlekveken meer dan 50 colonies, waardoor het mogelijk was het effect van cytostatica te evalueren. Tussen tumoren van dezelfde lijn werd een grote variatie in cloning efficiency gevonden (tot een factor 10). De gemiddelde cloning efficiënties voor de verschillende lijnen kwamen overeen met uitzondering van de R1 tumorlijn, waarvan de tumoren groeiden met een gemiddeld 10 x zo hoge cloning efficiency.

Een dosis afhankelijke remming van de colonie groei werd voor alle cytostatica behalve methotrexaat gevonden (figuur 1). Bij de hoogste concentratie methotrexaat (50 µg/ml) leek het zelfs alsof de

Tabel I

Karakteristieken van de gebruikte tumorlijnen

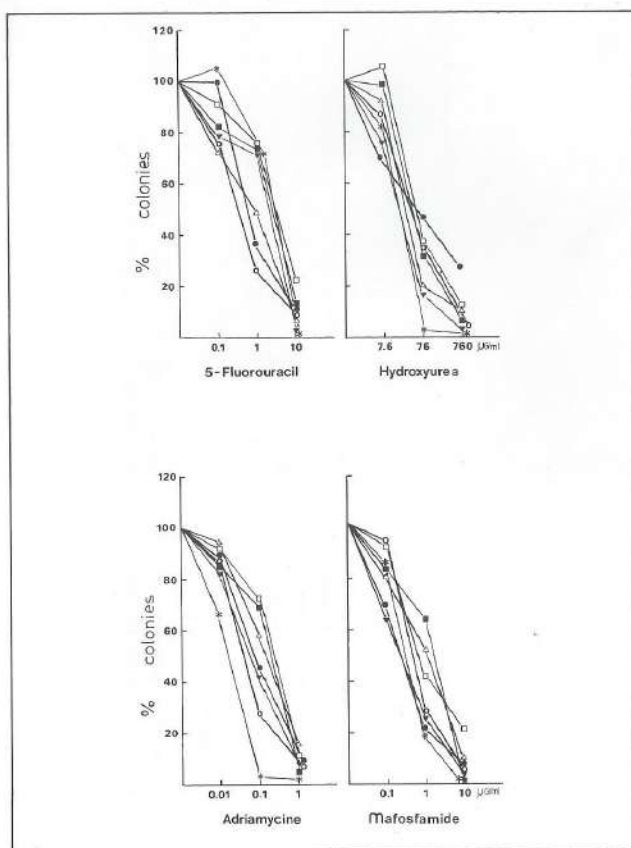
Tumorlijn ^a	Histologie	Localisatie	Verdubbelingstijd ^c	Coloniegroei	Cloning efficiency
HNX-FR	Matig gediff.plav.cel ca.	Hypofarynx	14	2/3	0,047-0,108
HNX-G	Goed gediff.plav.cel ca.	Huid	15	3/3	0,052-0,148
HNX-GU	Matig gediff.plav.cel ca.	Hypofarynx	16	2/3	0,065-0,130
HNX-HA	Adenoid cysteus ca.	Mondholte	19	2/3	0,026-0,292
HNX-HEP-2	Slecht gediff.plav.cel ca.	Larynx	8	5/5	0,019-0,100
HNX-KE	Slecht gediff.plav.cel ca.	Larynx	6	3/3	0,036-0,130
R1 ^d	Rhabdomyosarcoom		4	3/3	0,252-1,269

a) HNX: Head & Neck (tumor) Xenograft.

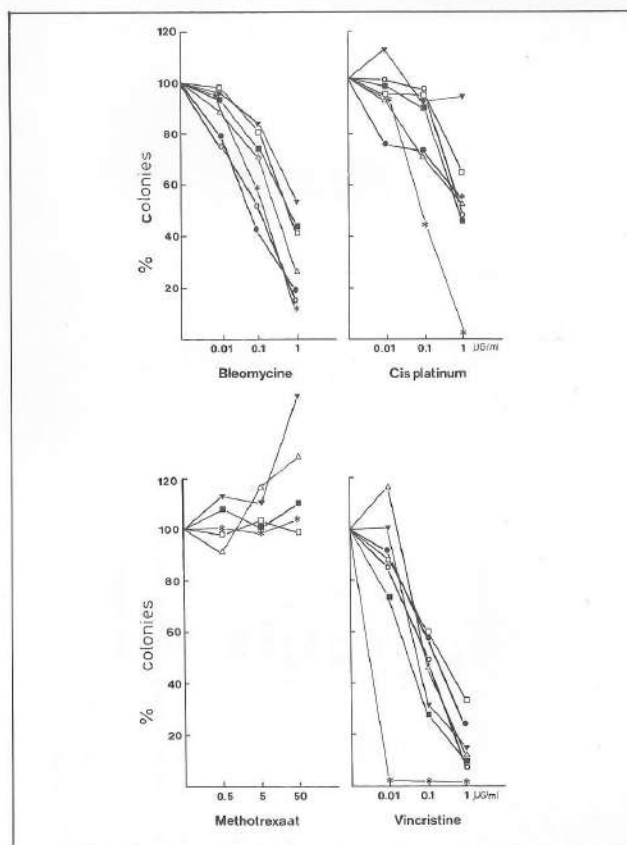
b) gediff.plav.cel ca. = gedifferentieerd plaveiselcel carcinoom.

c) Verdubbelingstijd: Gemiddeld aantal dagen waarin de tumor groeit van 100 mm³ naar 200 mm³.

d) R1: Rhabdomyosarcoom van de rat, groeiend als xenograft in de naakte muis.



Figuur 1.
Dosis respons curves van 8 verschillende cytostatica bij 5 humane hoofd-hals tumorlijnen en 1 rattenrhabdomyosarcoom lijn. Per tumorlijn werden in vitro 2 tot 5 tumoren getest.
▼ = HNX-FR, △ = HNX-G, ● = HNX-GU, ○ = HNX-HA, ■ = HNX-HEP-2,
□ = HNX-KE, * = R1.



coloniegroei werd gestimuleerd. De *in vitro* gevoeligheid van een middel kan worden uitgedrukt met behulp van de ID 50, dat wil zeggen de concentratie die nodig is om colonievorming met 50% te remmen (Tabel II). Wanneer de ID 50 minder is dan de klinisch relevante concentratie (1/10 van de hoogste plasma concentratie),

Tabel II

In vitro gevoeligheid van tumor xenografts

	ID 50							
Cytostaticum	1/10 p.p.c. ^a	HMX-FR ^b	HMX-G	HMX-GU	HMX-HA	HMX-HEP-2	HMX-KE	RI ^c
Bleomycine	0,2	> 1,0	0,51	0,14	0,22	0,85	0,78	0,33
Cisplatium	0,2	> 1,0	> 1,0	> 1,0	0,96	0,86	> 1,0	0,14
Adriamycine	0,04	0,075	0,27	0,090	0,065	0,36	0,43	0,026
Hydroxyurea	7,6	36,5	46,2	65,8	54,1	67,0	60,1	34,5
Naftosamide	0,2	0,50	2,28	0,45	0,73	2,91	0,87	0,60
Methotrexaat	0,3	> 50,0	> 50,0	> 50,0	> 50,0	> 50,0	> 50,0	> 50,0
Vincristine	0,01	0,075	0,094	0,35	0,098	0,054	0,58	<< 0,01
5-Fluorouracil	6,0	3,75	1,36	0,81	0,58	4,45	4,56	3,54

De onderstreepte waarden geven aan dat er sprake is van gevoeligheid, dat wil zeggen dat de ID 50 kleiner is dan de 1/10 p.p.c (piek plasma concentratie bij de mens).

a) 1/10 p.p.c.: 1/10 van de piek plasma concentratie bij de mens.

b) HMX: Head & neck tumor xenograft.

c) RI: Rhabdomyosaroom van de rat.

Tabel III

In vivo gevoeligheid van tumor xenografts.

Cytostaticum	HMX-FR ^a	HMX-G	HMX-GU	HMX-HEP-2	HMX-KE	RI ^b
Bleomycine	0,8	0,4	2,6	0,4	0,4	1,2 (0/6) ^c
Cisplatium	1,0	1,4	--	1,6	1,5	2,4 (1/5)
Cyclophosphamide	0,2	1,9	--	0,4	1,0	5,4 (6/7)
Adriamycine	--	--	--	0,6	0,4	5,8 (3/9)
Methotrexaat	0,0	1,6	0,1	--	0,3	3,3 (1/9)
Vincristine	--	0,6	--	--	0,5	3,5 (5/7)
5-Fluorouracil	1,0	0,4	0,9	--	1,0	0,7 (0/8)

De getallen geven aan de tijd (uitgedrukt in tumorverdubbelingstijden van die tumorlijn) die wordt gewonnen met de behandeling. Indien de waarde is onderstreept, is er sprake van een significante groeivertraging.

a) HMX: Head and neck xenograft.

b) RI: Rhabdomyosaroom van de rat.

c) Tussen haakjes: Het aantal tumoren dat volledig in regressie is gegaan, gedeeld door het aantal tumoren dat werd behandeld.

--: Niet getest.

wordt de tumor als gevoelig beschouwd. Wanneer de ID 50 groter was dan de klinisch relevante concentratie, wordt de tumor als resistent beschouwd (zie Hoofdstuk II). De verschillen in gevoeligheid van de individuele tumoren van eenzelfde tumorlijn waren niet groot. De variatie coëfficiënt (standaard afwijking gedeeld door het gemiddelde) van de ID 50 was gemiddeld kleiner dan 30%. In het algemeen werden geen grote verschillen gevonden tussen dosis respons curves van de verschillende hoofd-halstumorlijnen. Alle lijnen waren resistent voor cisplatinum, doxyrubicine, hydroxyurea, mafosfamide en methotrexaat. De HNX-FR lijn was buitengewoon ongevoelig voor cisplatinum; bij een concentratie van 1 µg/ml werd geen enkele remming waargenomen. Bleomycine bleek actief in een van de zes en 5-fluorouracil in 6 van de 6 geteste hoofd-halstumorlijnen. Het R1 ratten rhabdomyosaroom was gevoelig voor cisplatinum, doxyrubicine, 5-fluorouracil, vincristine en ongevoelig voor bleomycine, hydroxyurea, mafosfamide en methotrexaat.

Teneinde in vitro en in vivo gevoeligheid voor cytostatica te correleren werden ook de tumoren bij de muis behandeld met dezelfde middelen. Tot nu toe waren wij in staat 6 tumorlijnen met 3-7 stoffen in vivo te testen (Tabel III). Tien van de 25 experimenten met hoofd-halstumoren lieten een significante groeivertraging zien. Indien een groeivertraging van meer dan 2 werd aangehouden als de in vivo grens tussen ongevoelig en gevoelig, zoals voorgesteld door Iweit et al (1982) en Osieka (1984), bleek slechts één hoofd-halstumorlijn op de behandeling te reageren (HNX-GU voor bleomycine). De R1 tumorlijn was gevoelig (groeivertraging >2) voor alle geteste middelen, behalve voor 5-Fu en bleomycine.

De correlatie tussen de in vivo en in vitro resultaten worden beschreven in Tabel IV. In vitro werden de in vivo resultaten met bleomycine, cisplatinum, doxyrubicine en vincristine correct voorspeld. HNX-FR was zowel in vivo als in vitro het meest resistent voor cisplatinum. Voor drie middelen bleken de in vitro en in vivo resultaten niet volledig overeen te komen. In vitro waren 5 tumorlijnen gevoelig voor 5-FU. In vivo echter, werd bij geen van deze lijnen groeivertraging gemeten. Alle humane tumorlijnen waren ongevoelig voor mafosfamide en methotrexaat in vitro. Daarentegen was

Tabel IV

Correlatie tussen de in vitro en in vivo gevoeligheid.

Cytostaticum	G/G ^a	R/G	G/R	R/R	Totaal
Bleomycine	1			5	6
Cisplatinum	1			4	5
Adriamycine	1			2	3
Mafosfamide/Cyclophosphamide		1		4	5
Methotrexaat		1		4	5
Vincristine	1			2	3
5-Fluorouracil			5		5
Totaal	4	2	5	21	32

a) G: Gevoelig, R: resistent (in vitro/ in vivo).

Gevoeligheid in vitro: ID 50 < 1/10 piek plasmaconcentratie

Gevoeligheid in vivo: Groeivertraging > 2,0.

In vivo gevoeligheid in vitro juist voorspeld: 4/6 (66,7%)

resistentie juist voorspeld: 21/26 (80,8%)

de R1 tumor in vivo vel gevoelig. In 4 van de 6 (66,7%) werd gevoeligheid juist voorspeld. Resistentie werd juist voorspeld in 21/26 (80,8%).

IV-4. Discussie

Humane hoofd-halstumoren getransplanteerd en groeiend in naakte thymusloze muizen kunnen worden gekweekt in de clonogene assay met een hoog succespercentage. Dit is in tegenstelling tot de resultaten die met hoofd-halstumoren rechtstreeks van de patiënt in de clonogene assay vonden verkregen. Een lage celopbrengst, lage cloning efficiencies, en een grote kans op infectie beperken in de laatste situatie de toepasbaarheid van de clonogene assay voor het testen van cytostatica (Johns en Mills, 1983; Mattox et al, 1984; Cobleigh et al, 1984; Heinerman et al, 1985). Bovendien blijkt dat xenografts voldoende cellen kunnen leveren om minstens 24 cytostatica of cytostatica concentraties te testen.

Remming van meer dan 50% bij continue incubatie met 1/10 van de piek plasma concentratie werd gezien in 7 van de 48 experimenten met 6 verschillende hoofd-halstumorlijnen (14.6%, Tabel II). Dit komt overeen met de resultaten die werden verkregen met tumoren van verschillende lokalisaties rechtstreeks afkomstig van de patiënt (Von Hoff et al, 1983; Bertelsen et al, 1984; Shoemaker et al, 1985). De in vivo behandeling van naakte muizen met hoofd-halstumoren toonde aan dat bij alle tumorlijnen minstens met één cytostaticum groeivertraging kon worden verkregen. Een groeivertraging van meer dan 2 werd echter maar éénmaal gezien (Bleomycine).

De clonogene assay zou geschikt kunnen zijn om middelen te selecteren actief tegen hoofd-hals maligniteiten. Hierdoor zou het tijdrovende in vivo testen van cytostatica kunnen worden vermeden. Het is dan ook belangrijk te weten of in vitro de resultaten in vivo juist kunnen worden voorspeld. In deze studie bleek de clonogene assay de gevoeligheid juist te voorspellen in 4/6 (66.7%) en ongevoeligheid in 21/26 correlaties (80.8%). De overall correlatie was 100% voor bleomycine, cisplatinum, vincristine en doxycubine (voor vincristine en doxycubine konden echter slechts 3 experimenten worden gecorreleerd). Positieve correlaties tussen de gevoeligheid en resistentie van humane tumor xenografts in het naakte muizenmodel en de clonogene assay werden eerder gerapporteerd (Bateman et al; 1980, Tveit et al, 1980; Taetle et al, 1982; Zirvi et al, 1983; Friedman et al, 1984). Bateman et al (1980) vonden dat de in vitro activiteit van doxycubine zich niet uitte in een groeivertraging door dit middel van de tumor in vivo. Dit is niet in overeenstemming met de resultaten van Taetle et al (1982) en die welke hierboven zijn vermeld.

Een aantal problemen doet zich voor bij het correleren van in vivo en in vitro gegevens (Selby et al, 1983; Singletary et al, 1985; Twentyman, 1985). Groeivertraging van een tumor in vivo door een cytostaticum hangt af van de dosis, het behandelingsschema en van de farmacokinetiek in de muis. Bovendien wordt groeivertraging in vivo niet alleen veroorzaakt door het doden van colonie vormende cellen, maar ook van de andere cellen in een tumor. Remming van coloniegroei is afhankelijk van de concentratie van het gebruikte middel, de incubatietijd en de stabiliteit van een cytostaticum in vitro. Het

ontbreken van een correlatie tussen de in vivo en in vitro gevoeligheid van cyclofosfamide (R1 tumor) en 5-fluorouracil (alle tumorlijnen) zou kunnen samenhangen met de hierboven genoemde problemen. De totale afwezigheid van activiteit van 5-fluorouracil in het naakte muizenmodel zou kunnen worden veroorzaakt door de relatief lage piek plasma concentraties die in de naakte muis bereikt worden in vergelijking met de humane situatie (Inaba et al, 1984). De resistentie voor MTX in vitro zou kunnen worden veroorzaakt door de aanwezigheid van nucleobasen in de kweekmedia (Umbach et al, 1984). Recent vonden wij dat colonie groei van de MTX gevoelige R1 tumor volledig kon worden geremd met een concentratie van 0.05 µg/ml, indien werd gekweekt in nucleosidenvrije kweekmedia en gedialyseerd foetaal runderserum (resultaten niet vermeld).

De clonogene assay is op dit moment niet toepasbaar bij het voorspellen van de gevoeligheid van een tumor bij de individuele patiënt (Von Hoff et al, 1983). Shoemaker et al (1985) varen van mening dat deze methode een belangrijke rol zou kunnen spelen bij de selectie van nieuwe cytostatica. Het gebruik van xenografts als bron voor tumormateriaal heeft voordelen boven het gebruik van tumoren rechtstreeks van de patiënt. De clonog efficiencies zijn hoger in xenografts dan in humane tumoren. Dit geldt in het bijzonder voor hoofd-hals maligniteiten (Heinerman et al, 1985; zie Hoofdstuk III). Een belangrijk voordeel van het gebruik van xenografts is dat experimenten kunnen worden herhaald.

De clonogene assay zou kunnen worden gebruikt als "pre-screen" voor het naakte muizenmodel. De resultaten met de in de kliniek gebruikte cytostatica geven aan dat de clonogene assay in de meerderheid de resistentie en de gevoeligheid correct voorspelt. Gezien het feit dat voor enkele cytostatica de correlatie tussen in vitro en in vivo gevoeligheid ontbreekt, is enige voorzichtigheid op zijn plaats bij het interpreteren van de resultaten verkregen bij de combinatie van beide modellen.

IV-5. Conclusies

Hoofd-halstumoren groeiend bij de naakte muis werden getest in de

clonogene assay met het doel in vitro de gevoeligheid voor cytostatica te bepalen. Zeventien van de 20 hoofd-halstumor xenografts, verkregen van 6 verschillende tumorlijnen, gaven aanleiding tot voldoende coloniegroei om in vitro cytostatica op hun werkzaamheid te onderzoeken. Bovendien blijkt dat alle xenografts voldoende cellen bevatten om 8 middelen elk bij drie concentraties te testen. Behalve voor methotrexaat werd bij alle cytostatica een dosis afhankelijke groeiremming verkregen. Tumoren werden als gevoelig, respectievelijk resistent beschouwd indien de concentratie van het gebruikte cytostaticum, nodig om het aantal colonies met 50% te reduceren, lager, respectievelijk hoger was dan 1/10 van de piek plasma concentratie bij de patiënt. Alle hoofd-halstumorlijnen waren resistent voor cisplatinum, doxorubicine, hydroxyurea, mafosfamide (een in vitro actieve analoog van cyclofosfamide) en methotrexaat. Bleomycine was actief in één van de 6 en 5-fluorouracil in 6 van de 6 geteste hoofd-halstumorlijnen. In totaal konden 32 maal de in vitro gegevens van de hoofd-halstumorlijnen en een gevoelige ratten rhabdomyosarcom worden vergeleken met de resultaten in vivo, zoals gevonden in het naakte muizenmodel. De clonogene assay voorspelde correct gevoeligheid in 4/6 (66.7%) en resistentie in 21/26 (80.8%) gevallen. Er werd een volledige overeenkomst gevonden tussen de gevoeligheid in vitro en de gevoeligheid in vivo voor bleomycine, cisplatinum, adriamycine en vincristine, echter niet voor methotrexaat, 5-fluorouracil en cyclofosfamide. Voor 5-fluoropuracil ontbrak de overeenkomst zelfs geheel. Het in vitro kweken van humane hoofd-halstumor xenografts zou kunnen dienen als een snelle screeningsmethode om nieuwe middelen te vinden, actief tegen hoofd-hals maligniteiten. Bovendien zou de clonogene assay uit het grote aanbod van cytostatica middelen kunnen selecteren om deze vervolgens te testen in het naakte muizenmodel. Het feit dat voor enkele cytostatica in deze studie de overeenkomst tussen de in vitro en in vivo gegevens niet volledig is, of zelfs ontbreekt, wijst er op dat de resultaten verkregen met het in vitro testen van tumor xenografts met enige voorzichtigheid moeten worden geïnterpreteerd.

De resultaten vermeld in dit hoofdstuk werden eerder gepubliceerd in de British Journal of Cancer (1986), 54:53-59.

Hoofdstuk V

De invloed van het transplanteren van humane tumoren in de naakte muis op de eigenschappen van deze tumoren, in het bijzonder op de in vitro gevoeligheid voor cytostatica

V-1. Inleiding

Het naakte muizenmodel lijkt een vaste plaats verworven te hebben bij de evaluatie van nieuwe cytostatica (Frei, 1982; Staquet et al, 1983; Venditi, 1983). Xenografts zijn gevoelig voor cytostatica die actief zijn in de kliniek (Shorthouse et al, 1982; Steel et al, 1983). Bovendien zijn positieve correlaties gerapporteerd tussen de gevoeligheid van xenografts en de reactie van de oorspronkelijke tumor bij de patiënt (Nowak et al, 1978; Osieka, 1984; Fiebig et al, 1984). Vanwege de bewerkelijkheid van het naakte muizenmodel is het aantal gepubliceerde correlaties echter gering, terwijl ook negatieve correlaties werden gevonden. Zo bleek bij eerder onderzoek in ons laboratorium methotrexaat in het naakte muizenmodel niet werkzaam te zijn bij hoofd-hals xenografts, hoewel de tumoren bij de patiënten van wie de tumoren afkomstig waren, wel op MTX reageerden (Braakhuis et al, 1983).

Xenografts van verschillende typen tumoren blijken in kweek gebracht te kunnen worden (Bateman et al, 1980; Zirvi et al, 1983; Friedman et al, 1984; Heirnerman et al, 1985). Voor het merendeel werden positieve correlaties tussen groeiremming door cytostatica bij de naakte muis, en inhibitie van colonie groei in vitro door dezelfde stoffen (zie ook Hoofdstuk IV).

Tot nu toe was het niet mogelijk om het effect van een cytostaticum op

de coloniegroei van een xenograft te correleren met de respons van de oorspronkelijke tumor bij de patiënt. Het is niet bekend in hoeverre het transplanteren van een tumor van een patiënt in naakte muizen de oorspronkelijke gevoeligheid van deze tumor voor cytostatica beïnvloedt. Het feit dat tumoren heterogeen in samenstelling kunnen zijn (zie ook Hoofdstuk II) maakt het mogelijk dat een niet-representatief tumorfragmentje aansluit bij de naakte muis. In beperkte mate zijn gegevens bekend over de verschillen in gevoeligheid die kunnen optreden tussen afzonderlijke passages van dezelfde tumorlijn in de naakte muis (Bogden et al, 1978; Ishi et al, 1983).

Wij onderzochten de invloed van de naakte muis op een humane hoofd-halstumor door verschillende passages met elkaar te vergelijken. De gevoeligheid voor chemotherapie werd in vitro volgens de methode van Hamburger en Salmon bepaald. Hoewel de gevoeligheid ook in vivo kan worden bepaald - dat wil zeggen dat de muis zelf met cytostatica wordt behandeld - heeft dit als bezwaar dat dit tijdrovend is en veel proefdieren vergt in tegenstelling tot het testen in de clonogene assay (Heinerman et al, 1985). Met deze methode kunnen in korte tijd een groot aantal cytostatica worden getest. Uit de resultaten vermeld in Hoofdstuk IV blijkt dat de gevoeligheid in vivo en in vitro in grote lijnen met elkaar overeenkomen. Bovendien bestaat de mogelijkheid om onder gelijke omstandigheden de gevoeligheid in vitro te bepalen voor passage in de naakte muis. Hiertoe werd gebruik gemaakt van de cellijn HEP-2. Deze cellijn geeft niet alleen na insputting in de naakte muis aanleiding tot tumorgroei en vervolgens een permanente tumorlijn, maar is ook rechtstreeks in de clonogene assay te onderzoeken. Hierdoor kan beschikt worden over de oorspronkelijke dosis respons curves van alle geteste cytostatica. Tenslotte kan door het testen in vitro in plaats van in vivo de invloed van de farmacokinetiek van een cytostaticum in de naakte muis worden vermeden. Het is bekend dat de farmacokinetiek van een cytostaticum in de muis, afhankelijk van het gebruikte middel, kan verschillen van de farmacokinetiek bij de mens (Selby et al, 1983; Singletary et al, 1985; Twentyman, 1985).

V-2. Materiaal en methoden

In vivo

De tumorlijn HNX-HEP-2 werd verkregen op de in Hoofdstuk II beschreven wijze.

De take rate (het percentage geïmplanteerde tumorstukjes dat uitgroeit tot een grotere tumor) werd bepaald voor de eerste tot en met de zestiende passage. De tumoren van deze passages werden beoordeeld op histologie, verdubbelingstijd (de tijd die een tumor nodig heeft om te groeien van 100 naar 200 mm³) en latentie tijd (de tijd die een tumor nodig heeft om na implantatie een grootte te bereiken van 100 mm³).

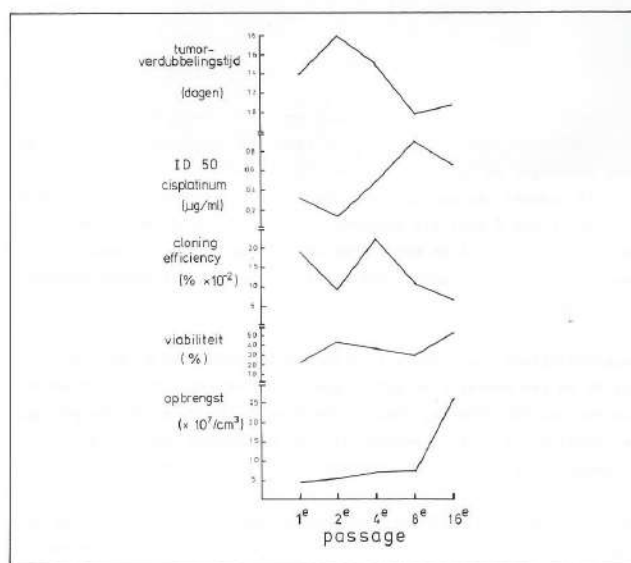
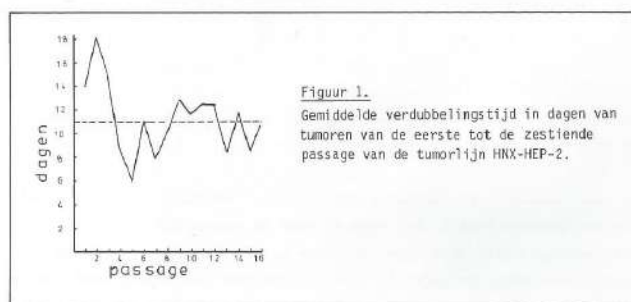
In vitro

Van de 1e, 2e, 4e, 8e en 16e passage werden minimaal 5 tumoren na dissociatie in kweek gebracht in de clonogene assay, zoals ontwikkeld door Hamburger en Salmon en beschreven in Hoofdstuk II. Er werd gebruik gemaakt van een enzymatische dissociatie methode (collagenase 0.2% gedurende 2 uur; zie Hoofdstuk II). Er werden eveneens cellen gekweekt van de cellijn HEP-2 ("nulte" passage). Van alle solide tumoren werd de opbrengst, viabiliteit en clonogen efficiency bepaald zoals beschreven in Hoofdstuk II.

De gevoeligheid voor cisplatine werd onderzocht voor de 0e, 1e, 2e, 4e, 8e en 16e passage, de gevoeligheid voor adriamycine, mafosfamide, bleomycine, hydroxyurea, vincristine voor de 0e, 8e en de 16e passage. De coloniegroei werd uitgedrukt als een percentage van het aantal colonies dat groeide in de onbehandelde kweken. De ID 50 is die concentratie die een colonie reductie zou geven van 50%. De celconcentraties, die in kweek werden gebracht, waren dezelfde als die werden genoemd in Hoofdstuk IV. Dezelfde statistische methoden werden gebruikt als die genoemd in Hoofdstuk II en IV.

V-3. Resultaten

De take rate van de eerste vijf passages varieerde tussen de 50 en



100%. De volgende passages hadden allen een take rate van 75% of hoger. De gemiddelde tumorverdubbelingstijd bedroeg 11.1 dagen. (SD 3.0). Deze vertoonde gedurende de eerste 5 passages een grotere spreiding (6 tot 18 dagen), dan de latere passages (8 tot 12 dagen; Fig. 1 en 2). Dit werd niet gevonden met de latentie tijd, de tijdsduur nodig om of na injectie of na implantatie een grootte te bereiken van 100 mm³ (25 dagen, SD 9.3). De histologie van de verschillende passages kwam overeen en vertoonde het beeld van een slecht gedifferentieerd plaveiselcelcarcinoom. Grotere tumoren hadden meer necrose dan de kleinere. Er werd een toename van de celdichtheid gevonden bij latere passages.

De celopbrengst (per cm³) nam geleidelijk toe van de eerste tot en met de achtste passage (1e passage: 45.10 x 10E6; 2e: 55.05 x 10E6; 4e: 68.65 x 10E6 en 8e: 81.60 x 10E6). Een grote toename werd gevonden van de achtste naar de zestiende passage (16e: 264.40 x 10E6; Tabel I en Fig.2).

Tumoren van de 16e passage bleken na dissociatie de meest viabele

Tabel I

Gemiddelde opbrengst, viabiliteit en cloning efficiency van tumoren van de 1^e, 2^e, 4^e, 8^e en 16^e passage van de xenograft tumorlijn HEP-2 ($\pm$ SD).

Passage	Opbrengst (cellen/cm ³ x 10 ⁶)	Viabiliteit (%)	Cloning efficiency (%)
1	45,70 ($\pm$ 17,21)	32 ($\pm$ 19)	0,188 ($\pm$ 0,187)
2	55,05 ($\pm$ 26,26)	43 ($\pm$ 19)	0,095 ($\pm$ 0,079)
4	68,65 ($\pm$ 40,26)	35 ($\pm$ 14)	0,222 ($\pm$ 0,226)
8	71,40 ($\pm$ 38,71)	30 ($\pm$ 10)	0,122 ($\pm$ 0,041)
16	264,40 ($\pm$ 75,70)	52 ($\pm$ 10)	0,067 ($\pm$ 0,021)

Cloning efficiency: $\frac{\text{aantal colonies}}{\text{aantal in kweek gebrachte cellen}}$

Per passage werden 5 tumoren getest.

De cloning efficiency van de cellijn HEP-2 bedroeg 5%.

single cell suspensie op te leveren. De 1e, 2e, 4e en 8e passage varen niet verschillend in dit opzicht. (Tabel I, Fig. 2). Er werd geen correlatie gevonden tussen de viabiliteit en de verdubbelingstijd van een tumor.

De laagste cloning efficiency werd gezien met tumoren van de 16e passage (0.067%, SD: 0.021). De hoogste met tumoren van de 4e passage (0.222%, SD: 0.226). Een toe- of afname bij stijgende passagenummers werd niet gevonden (Tabel I, Fig. 2). De cloning efficiency van de cellijn was circa 5%. Er werd geen correlatie gevonden tussen de cloning efficiency en de verdubbelingstijd van de tumor. Er bleek eveneens geen correlatie te bestaan tussen de cloning efficiency en de viabiliteit.

De gemiddelde gevoeligheid voor cisplatinum is uitgezet in Fig. 2. De ID 50 was niet constant voor de verschillende passages. (tabel II). De meest resistente tumoren kwamen uit de 8e passage (ID 50: 0.905 µg/ml, SD: 0.108). Coloniegroei van tumoren van de 2e passage werd het meest geremd (ID 50: 0.126 µg/ml, SD: 0.093). Met 1/10 peak plasma concentratie van cisplatinum (0.2 µg/ml) als grens tussen gevoelig en ongevoelig, was derhalve de 2e passage gevoelig voor dit cytostaticum en alle andere passages niet. Ook de cellijn (ID 50: 0.297, SD: 0.156 µg/ml) bleek ongevoelig voor cisplatinum. De tendens was dat bij toenemende passagenummer een grotere ongevoeligheid werd gezien voor dit middel. Er bestond een negatieve correlatie tussen de gemiddelde ID 50 van een passage en de gemiddelde tumor-verdubbelingstijd (Spearman rank correlatie coefficient = -0.862, niet significant) dat wil zeggen hoe langzamer de tumoren van een passage groeiden, des te gevoeliger bleek die passage voor cisplatinum in vitro. De gemiddelde tumor verdubbelingstijd van de enige passage (2e) die gevoelig bleek te zijn, was het hoogst (18 dagen). De dosis responscurves van alle cytostatica voor de 0e, 8e en 16e passage worden grafisch weergegeven in Fig. 3. De bijpassende ID 50 evenals de 1/10 piek plasma concentraties van de verschillende cytostatica worden vermeld in Tabel II.

Er werden geen significante verschillen gevonden tussen de 8e en de 16e passage voor alle geteste cytostatica. Zowel de 8e als de 16e passage varen resistent voor adriamycine, mafosfamide, bleomycine,

Tabel II

In vitro gevoeligheid (ID 50) van de cellijn HEP-2 (0^e passage) en tumoren van de 1^e, 2^e, 4^e, 8^e en 16^e passage van de xenograft tumorlijn HEP-2. ($\pm$ SD).

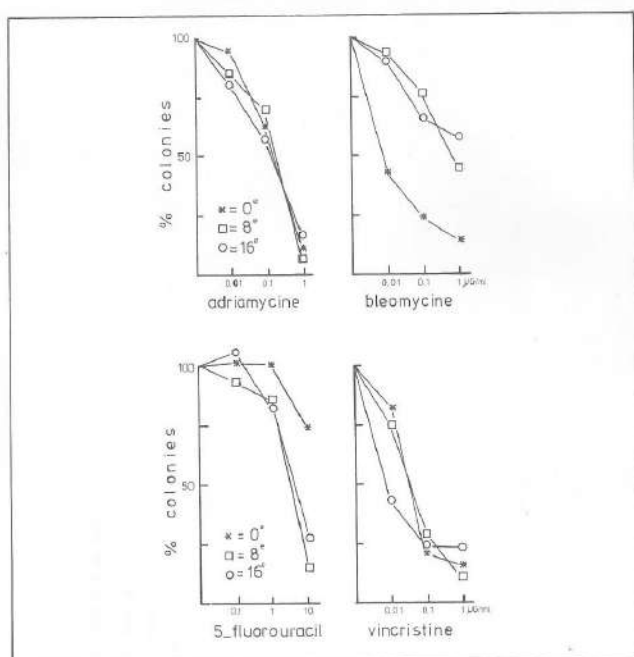
		0 ^a	1	2	4	8	16
Cytostaticum	1/10 p.p.c. ^a	0.2	0.297 ($\pm$ 0.156)	0.328 ($\pm$ 0.192)	0.126 ($\pm$ 0.093)	0.482 ($\pm$ 0.257)	0.905 ($\pm$ 0.108)
Cisplatinum							0.660 ($\pm$ 0.281)
Cytostaticum	1/10 p.p.c.	0	8	16			
Adriamycine	0.04	0.275 ($\pm$ 0.247)	0.36 ($\pm$ 0.07)	0.220 ($\pm$ 0.304)			
Bleomycine	0.2	0.039 ($\pm$ 0.031)	0.052 ($\pm$ 0.018)	> 1			
5-Fluorouracil	6.0	> 10	4.45 ($\pm$ 0.97)	5.75 ($\pm$ 2.02)			
Hydroxyurea	7.6	257.2 ($\pm$ 203.4)	67.0 ($\pm$ 6.1)	330.9 ($\pm$ 311.0)			
Mafosfamide	0.2	5.58 ($\pm$ 1.12)	2.91 ($\pm$ 1.16)	1.95 ($\pm$ 1.34)			
Vincristine	0.01	0.053 ($\pm$ 0.002)	0.054 ($\pm$ 0.019)	0.022 ($\pm$ 0.035)			

De onderstreepte waarden geven aan dat er sprake is van gevoeligheid, dat wil zeggen dat de ID 50 kleiner is dan de 1/10 p.p.c. (pik plasma concentratie bij de mens).

Per passage werden 5 tumoren getest. De cellijn werd 4 x in kweek gebracht.

a) 1/10 p.p.c.: 1/10 van de pik plasma concentratie bij de mens.

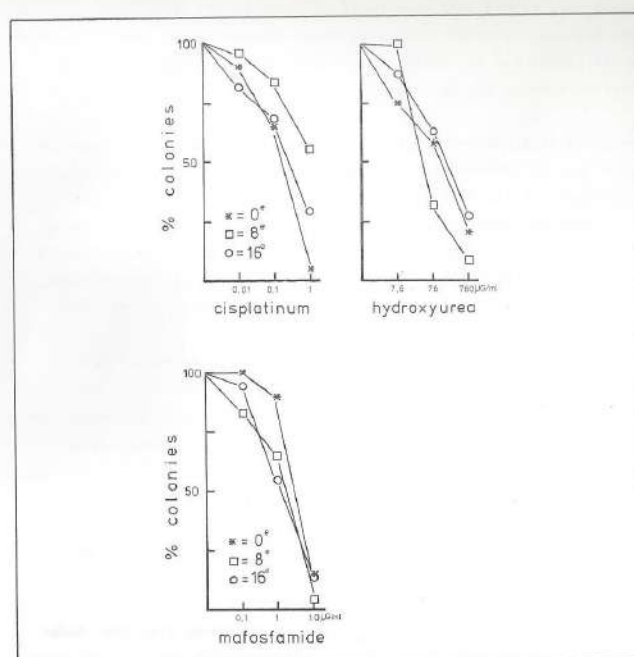
b): Passage nummer.



Figuur 3.

De gemiddelde gevoeligheid van de cellijn HEP-2 (nulde passage) en tumoren van de achtste en zestiende passage van HNX-HEP-2 voor zeven verschillende cytostatica. De cellijn werd viermaal in kweek gebracht in de clonogene assay. Van zowel de achtste als de zestiende passage werden vijf tumoren getest.

hydroxyurea, vincristine en cisplatinum. Beide passages waren gevoelig voor 5-Fluorouracil. De cellijn ("nulde" passage) was eveneens ongevoelig voor adriamycine, mafosfamide, hydroxyurea, vincristine en cisplatinum. De cellijn bleek echter wel gevoelig voor bleomycine. Het omgekeerde werd gezien voor 5-fluorouracil: de cellijn was niet gevoelig, de 8e en de 16e passage waren dat wel.



V-4. Discussie

Na de 4e passage bedroeg de take rate minimaal 75%. Eenzelfde beeld werd door Braakhuis et al (1984) gezien bij twee andere hoofd-halstumorlijnen en door Mattern et al (1981) bij de lijnen van borst- en ovariumtumoren. Daarentegen vonden Braakhuis et al (1984) bij 4 tumoren uit het hoofd-hals gebied een wisselende take rate. Eenzelfde resultaat werd gevonden door Houghton en Taylor (1978) voor colontumoren.

De latentie tijd nam niet af bij opeenvolgende passages. De spreiding was groot (14.3-50.1 dag).

Vennerberg (1984) vond voor hoofd-halstumoren bij latere passages wel een kortere tijdsduur voordat de tumor meetbaar werd. Volgens Solesvik et al (1985) kan dit worden veroorzaakt door veranderingen in de vaatvoorziening van de tumor.

De gemiddelde tumorverdubbelingstijd van HNX-HEP-2 was twee keer zo groot als die van andere hoofd-halstumoren (11.1 versus 4-6 dagen) (Braakhuis et al, 1984; Vennerberg, 1984). De groeisnelheid nam toe gedurende de eerste passages. Braakhuis et al (1984) en Vennerberg (1984) zagen voor de meeste hoofd-halstumorlijnen een afname van de tumorverdubbelingstijd, hetgeen ook werd gevonden bij borsttumoren, maar niet voor melanomen (Fodstad et al, 1980; Bailey et al, 1981).

De histologie veranderde niet tijdens passage in de naakte muis. Braakhuis et al (1984) vonden voor 12 hoofd-halstumorlijnen een gelijkblijvende histologie. Povlsen en Jacobsen (1975) en Mattern et al (1981) rapporteerden voor andere tumortypes een afname van de differentiatie. Sharkey et al (1984, 1985) zagen voor verschillende tumorlijnen zowel een toe- als afname van de differentiatie. Voor enkele lijnen vonden zij een toename van de celdichtheid in de latere passages. Dit komt overeen met onze bevindingen en verklaart de toegenomen celopbrengst bij latere passages.

De viabiliteit en het aantal clonogene cellen namen niet toe. Omdat ook de tumorverdubbelingstijd en de differentiatie van de tumor niet bleek af te nemen, kan voor deze lijn niet de stelling van Sharkey et al (1985) worden ondersteund dat een tendens bestaat dat tumorlijnen zich ontwikkelen tot een kwaadaardiger fenotype.

Het meest belangrijke aspect van deze studie betreft de invloed van de thymusloze naakte muis op de gevoeligheid van een tumor voor cytostatica. In totaal werden 7 cytostatica getest. Methotrexaat werd niet gebruikt, hoewel het een veel gebruikt en effectief middel is tegen hoofd-halstumoren. Bij eerder onderzoek was namelijk gebleken dat dit cytostaticum niet werkzaam kan zijn in de standaard media, gebruikt voor de clonogene assay (zie ook Hoofdstuk IV). Hierdoor zou altijd overeenkomst in resistentie worden gevonden tussen de verschillende passages.

Passage in de naakte muis had geen invloed op de gevoeligheid voor adriamycine, mafosfamide, hydroxyurea en vincristine. Fiebig en Löhr (1984) vonden voor 6 tumorlijnen en 7 cytostatica geen verschillen tussen vroege passages (tweede tot vierde) en late passages (achtste en hoger). Shorthouse et al (1982) rapporteerden dat de gevoeligheid van één tumorlijn niet veranderde in een periode van 9 maanden. Voor de cytostatica Bleomycine, 5 FU en iets mindere mate voor cisplatinum bleek in ons onderzoek de gevoeligheid wel te veranderen. Door passage in de muis bleek HNX-HEP-2 resistent geworden te zijn voor Bleomycine en juist gevoelig voor 5 FU. Deze verandering in gevoeligheid moet in de eerste passages zijn opgetreden omdat de 8e en de 16e passage niet van elkaar verschilden. Het is mogelijk dat de allereerste passage - dat wil zeggen de injectie van losse cellen van de cellijn - hiervoor verantwoordelijk is. Hiertegen pleiten de bevindingen met cisplatinum. Met name de vroege passages bleken onderling verschillend te zijn voor wat betreft de reactie op cisplatinum. De tweede passage was zelfs gevoelig voor cisplatinum, terwijl de cellijn en de andere passages dit niet waren. Bogden et al (1978) rapporteerden dat een rattetumor tijdens passage in de naakte muis resistent werd voor L-phenyl-alanine. In de rat was deze tumor wel gevoelig voor dit middel. Een andere rattetumor was zowel in de rat als in de naakte muis ongevoelig. Ishi et al (1983) vonden met een humaan synoviaal sarcoom dat de 18e passage in vitro gevoeliger was voor mitomycine, adriamycine, vincristine en cytosine arabinoside dan de 3e passage. Het omgekeerde werd gezien bij de passages van een humaan rhabdomyosarcoom: de 26e passage was ongevoelig voor vincristine, mitomycine, adriamycine en bleomycine. De 16e passage was wel gevoelig voor deze cytostatica. Ook bij latere passages (15e en hoger) kunnen dus veranderingen optreden. Leibovici (1984) die met gewone muizen werkte, zag bij opeenvolgende passages een afname van de gevoeligheid voor polysacharide levan en een gelijkblijvende reactie op methotrexaat. Uit bovenstaande gegevens valt op te maken dat eventuele verschillen in reactie op cytostatica, die worden veroorzaakt door de gastheer, zowel afhankelijk zijn van de tumor, als van het gebruikte middel.

Men kan zich afvragen welke mechanismen een rol spelen bij het veranderen van de gevoeligheid van tumoren tijdens passage in de

naakte muis. Prolifererende cellen zijn voor meer cytostatica gevoeliger dan rustende cellen (Valeriote en van Putten, 1975). Men zou derhalve verwachten dat coloniegroei van cellen van de cellijn HEP-2 ("nulde" passage) meer geremd werd dan de coloniegroei van de cellen afkomstig van de solide tumoren (celverdubbelingstijd 1 dag, tumorverdubbelingstijd 11 dagen). Een relatief groter aantal cellen van de cellijn zullen zich immers in de proliferatiefase bevinden op het moment dat deze cellen in kweek worden gebracht; dit werd alleen gevonden voor bleomycine en niet voor alle andere geteste middelen. Het cytostaticum 5 FU was zelfs effectiever bij de solide tumoren.

Een aantal onderzoekers vaarschuwt voor het effect dat veranderde tumorverdubbelingstijden kunnen hebben op de reactie op chemotherapie (Pickard et al, 1975; Wennerberg, 1984; Sharkey et al, 1985). Tumoren met een korte tumorverdubbelingstijd hebben meer cellen in de proliferatie fase dan langzaam groeiende tumoren en zouden dus gevoeliger moeten zijn voor chemotherapie. Voor cisplatinum werd in dit onderzoek echter het tegenovergestelde waargenomen. Een negatieve correlatie werd gevonden (niet significant) tussen de tumorverdubbelingstijd en de gevoeligheid; hoe langzamer de tumor groeide, des te gevoeliger was deze voor cisplatinum. Ishi et al (1983) zagen bij gelijkblijvende tumorverdubbelingstijden veranderende reacties op cytostatica. Bovendien zijn xenografts ondanks het feit dat zij sneller groeien dan de oorspronkelijke tumoren van de patiënt, niet gevoeliger voor chemotherapie.

Solide tumoren moeten worden gedissocieerd alvorens ze in kweek gebracht kunnen worden. In Hoofdstuk II werden de problemen besproken die dit met zich mee kan brengen. De dissociatie methode op zich kan inwerken op de cellen zelf en er kan sprake zijn van een niet representatieve selectie van cellen uit de tumor. Geen enkele dissociatiemethode is in staat een tumor volledig in losse cellen te dissocieren. Hoevel met 3 verschillende dissociatiemethoden slechts geringe verschillen werden gevonden in gevoeligheid voor cisplatinum, is het niet uitgesloten dat met andere cytostatica wel grote verschillen in gevoeligheid kunnen optreden, afhankelijk van de gebruikte dissociatiemethode.

De naakte thymusloze muis is geen indifferente gastheer. Afweer is, hoevel verminderd, nog wel aanwezig (Bloemmen en Eyssen, 1973; Pantelouris en Flisch, 1972; Wortis, 1971, 1974). Er van uit gaande dat tumoren opgebouwd kunnen zijn uit subpopulaties met verschillende antigeniciteit, bestaat de mogelijkheid dat sommige subpopulaties door de passage in de naakte muis meer worden onderdrukt dan andere. Subpopulaties blijken onderling te kunnen verschillen voor wat betreft de gevoeligheid voor cytostatica (Dexter et al, 1981; Miller et al, 1981; Stephens en Peacock, 1982; Sweeney et al, 1982; Bernal et al, 1983; Olsson et al, 1984). Door een verandering in samenstelling van een tumor zou derhalve de gevoeligheid van de gehele tumor kunnen veranderen (Bogden et al, 1978). Uit het onderzoek van Bogden et al (1978) blijkt dat veranderingen in gevoeligheid voor cytostatica niet altijd blijvend zijn. Een rattetumor die ongevoelig werd in de naakte muis herkreëg zijn oorspronkelijke gevoeligheid na terugplaatsing in de rat.

De cloning efficiency van de solide tumoren en de cellijn is verschillend. De suspensies van de solide tumoren bevatten relatief meer niet-clonogene cellen. Dergelijke cellen zouden invloed op de colonie groei kunnen uitoefenen. Hamburger et al (1978) toonden aan dat de in ascites van de ovariumtumoren aanwezige macrophagen de colonie groei verbeterden. Het is niet bekend in hoeverre niet-clonogene cellen anders reageren op cytostatische behandeling. Bij de vergelijking van de gevoeligheid van de cellijn met de solide tumoren, is derhalve enige voorzichtigheid op zijn plaats.

Onze bevindingen tonen aan dat - hoevel het naakte muizenmodel over het algemeen wordt beschouwd als een belangrijk screeningsmodel - bij de interpretatie van de resultaten rekening gehouden moet worden met de mogelijkheid van een veranderde gevoeligheid ten opzichte van de tumor bij de patiënt. Niettemin blijkt voor de meeste onderzochte cytostatica de gevoeligheid niet te veranderen.

V-5. Conclusies

Algemeen wordt het naakte muizenmodel van waarde geacht als screeningsmethode voor nieuwe cytostatica. De naakte muis zal zich dan

zo veel mogelijk moeten gedragen als een indifferente gastheer. Een belangrijke voorwaarde is daarbij dat de gevoeligheid van de tumoren die bij de naakte muizen groeien, zo min mogelijk verandert door passage in deze proefdieren.

De onderzoeksresultaten vermeld in dit hoofdstuk tonen aan dat enige voorzichtigheid bij de interpretatie van de uitkomsten met het naakte muizenmodel gecombineerd met de clonogene assay op zijn plaats is. Ten eerste bleek voor 2 van de in totaal 7 gebruikte cytostatica de gevoeligheid van de solide tumor anders te zijn dan de gevoeligheid van de cellijn. De cellijn HEP-2 was gevoelig voor bleomycine; De solide tumoren bleken daarentegen resistent. Het omgekeerde werd gevonden voor 5 FU: de cellijn was resistent voor dit middel, de solide tumoren waren gevoelig. Hierbij moet wel worden opgemerkt dat de cellen van de cellijn HEP-2 veel beter in agar groeien dan de cellen uit de solide tumoren, hetgeen van invloed kan zijn geweest op de uitkomsten. Ten tweede werd gevonden dat de vroege passages (1e t/m 8e) onderling verschilden in gevoeligheid voor cisplatinum.

Niettemin tonen de resultaten in dit hoofdstuk aan dat de gevoeligheid van tumoren meestal niet verandert door passage in de naakte muis. Er werden geen verschillen gevonden in gevoeligheid voor cytostatica tussen de cellijn en de solide tumoren voor 5 van de 7 geteste cytostatica. Voor alle 7 geteste cytostatica kwam de gevoeligheid van de 8e en de 16e passage overeen.

Hoofdstuk VI

Nabeschouwing

De resultaten vermeld in dit proefschrift bevestigen dat de clonogene assay geen plaats heeft bij de bepaling van de gevoeligheid voor cytostatica van tumoren bij individuele patiënten. Daarentegen lijkt deze methode zich een plaats te verwerven als screeningsmethode voor nieuw ontwikkelde cytostatica.

Bij onderzoek naar de werkzaamheid van een cytostaticum worden twee fasen onderscheiden, namelijk een pre-klinische en een klinische fase. Alvorens een middel bij de mens in de kliniek kan worden getest, moet worden aangetoond dat dit middel een antitumor werking bezit. Dit gebeurt tot nu toe uitsluitend in diermodellen. Het huidige screeningmodel van het National Cancer Institute (NCI) in de Verenigde Staten verwerkt jaarlijks ± 20.000 middelen. Al deze cytostatica worden eerst getest in het P388 muizenleukemiemodel. Stoffen die actief zijn, worden vervolgens op hun werkzaamheid onderzocht in een panel bestaande uit 3 muizentumoren (L1210 leukemie, B16 melanoom, en M5076 sarcoom) en een xenograft van een humane mammatumor. Met behulp van deze screening worden middelen geselecteerd waarvan verwacht wordt dat deze antitumorwerking zullen hebben bij patiënten met een maligniteit. Na deze preklinische fase worden de cytostatica op hun bruikbaarheid getest bij de patiënt in zogenaamde clinical trials. Allereerst worden fase I studies uitgevoerd, waarbij niet in eerste instantie de antitumorwerking wordt geevalueerd, maar wel gegevens worden verzameld omtrent maximaal getoelade dosis, toxiciteit en farmacokinetiek van het

middel bij de mens. Pas wanneer die gegevens over een cytostaticum bekend zijn, wordt in fase II studies bij patiënten nagegaan of het betreffende cytostaticum antitumor activiteit heeft. Indien dit het geval blijkt, kan eventueel in een fase III studie een groep patiënten met het nieuwe cytostaticum worden behandeld en een groep patiënten met de op dat moment als best bekend staande therapie om een betrouwbare vergelijking mogelijk te maken.

Met de clonogene assay kunnen, evenals met het tot nu toe gebruikte model van het National Cancer Institute (NCI) in de Verenigde Staten, jaarlijks grote aantallen cytostatica worden getest. Het interessante van de clonogene assay ligt in het feit dat deze screeningsmethode mogelijk selecteert voor een ander type cytostatica dan het tot nu toe door het NCI gebruikte muizen-leukemie model P388 (voorheen L1210). Dit model zal vooral selecteren voor middelen die als bijwerking suppressie van het beenmerg hebben. Leukemie is immers een neoplasma van het beenmerg. Juist middelen die myelosuppressie niet als bijwerking hebben, worden derhalve gemist (zie hoofdstuk I). Shoemaker et al (1985) vonden dat van 79 stoffen, die onverkzaam bleken in het P388-systeem, 14 wel activiteit vertoonden in de clonogene assay. Enkele van deze middelen hebben een totaal andere structuur dan de tot nu toe bekende cytostatica en kunnen in relatief hoge doses aan de muis worden gegeven. Dit opent mogelijk de weg naar de ontwikkeling van een groep nieuwe cytostatica.

Dit proefschrift beperkt zich tot een bepaalde tumorsoort, namelijk hoofd-halstumoren. Deze benadering sluit in feite aan bij de sinds kort door het NCI in de Verenigde Staten gepropageerde "Disease Oriented Screening", met behulp van cellijnen (Shoemaker, 1986). Onderzoek is gestart naar de bruikbaarheid van een panel van longtumorcellijnen, terwijl het de bedoeling is ook andere soorten cellijnen te gebruiken. Hoewel bij patiënten tumoren van hetzelfde histologische type en dezelfde lokalisatie kunnen verschillen in gevoeligheid voor cytostatica (zie Hoofdstuk I) geldt dit, in nog grotere mate voor tumoren met een verschillende lokalisatie en histologie. Een cytostaticum dat bij de ene tumorsoort resulteert in tumor regressie bij bijvoorbeeld de helft van de patiënten, kan totaal onverkzaam zijn bij een andere tumorsoort. Fase II studies

zijn dan ook in het algemeen tumorsoort specifiek. Aangezien de ervaring leert dat de uitkomst wat betreft werkzaamheid over het algemeen negatief is, terwijl meestal wel sprake is van toxiciteit, betekent een dergelijke fase II onderzoek een grote belasting voor de betreffende patiënten. Dit geldt in het bijzonder voor patiënten met een hoofd-halstumor die, vanwege het feit dat er bij patiënten die in aanmerking komen voor fase II studies meestal sprake is van een lokaal/regionair recidief, toch al in grote mate lijden onder hun aandoening. Deze tumoren zijn relatief zeldzaam en de overlevingsduur na het constateren van een recidief, is vaak niet langer dan enkele maanden. Bovenstaande factoren beperken het aantal fase II studies dat bij patiënten met deze tumoren kan worden uitgevoerd. Een tumorspecifieke screening zou hierbij van belang kunnen zijn door uit de groep cytostatica, die in fase I studies bij de mens al zijn onderzocht op toxiciteit en farmacologie, middelen te selecteren die een grote kans hebben om in fase II studies bij de mens verkzaam te zijn bij hoofd-halstumoren (in vitro fase II screening volgens Salmon, 1984). Bovendien zouden ook cytostatica kunnen worden gevonden, die specifiek verkzaam zijn bij hoofd-halstumoren. Omdat deze tumoren vooral werden behandeld met cytostatica die verkzaam waren gebleken bij vaker voorkomende tumoren, kon hiervan tot nu toe geen sprake zijn.

Het is overigens niet noodzakelijk dat deze screening voor de verschillende tumor typen op identieke wijze plaatsvindt. Het eigen karakter van een tumorsoort brengt vaak met zich mee dat een screeningsmethode moet worden aangepast. Voor hoofd-halstumoren geldt bijvoorbeeld, zoals de resultaten in dit proefschrift tonen, dat de clonogene assay alleen in combinatie met het naakte muizenmodel kan worden gebruikt vanwege de afwezigheid van colonie groei met tumoren rechtstreeks van de patiënt (zie Hoofdstuk III).

Hoewel het naakte muizenmodel op zich eveneens geschikt lijkt te zijn als screeningsmethode, is deze methode tijdrovend en kan jaarlijks slechts een beperkt aantal cytostatica worden getest. Door het naakte muizenmodel en de clonogene assay te combineren, zouden deze bezwaren kunnen worden ondervangen: tientallen cytostatica kunnen tegelijkertijd binnen enkele weken worden onderzocht op hun

antitumorwerking (zie Hoofdstuk IV).

Voor welk screeningsmodel ook wordt gekozen, er zal niet alleen rekening moeten worden gehouden met het feit dat niet in voldoende mate wordt gescreend met representatief tumormateriaal (zie hoofdstuk II), maar ook met het feit dat de eigenschappen van een model, zoals bijvoorbeeld aangetoond voor het naakte muizenmodel (zie hoofdstuk V), in de loop der tijd kunnen veranderen. Dit maakt een voortdurende kwaliteitscontrole noodzakelijk. Het is te verwachten dat de clonogene assay gecombineerd met het naakte muizenmodel een waardevolle screeningsmethode zal blijken te zijn, in het bijzonder voor hoofd-halstumoren.

Samenvatting

In hoofdstuk I wordt een overzicht gegeven van de literatuur betreffende de ervaringen met de clonogene assay volgens Hamburger en Salmon bij humane tumoren in het algemeen en hoofd-halstumoren in het bijzonder. Hieruit blijkt dat in het algemeen gemiddeld slechts 1/3 van de solide tumoren aanleiding geeft tot voldoende colonie groei om cytostatica te testen. Dit maakt de clonogene assay derhalve ongeschikt als test ter bepaling van de gevoeligheid voor cytostatica van tumoren bij individuele patiënten. Dit geldt in het bijzonder voor hoofd-halstumoren omdat deze tumoren nog slechter danwel helemaal niet in kweek te brengen zijn. Daarentegen lijkt de clonogene assay als screeningsmethode voor nieuw ontwikkelde cytostatica wel toekomst te hebben. Naast de clonogene assay worden andere methoden besproken bij welke gebruik wordt gemaakt van humaan tumor materiaal om het effect van cytostatica te voorspellen. In het bijzonder wordt aandacht geschonken aan het naakte muizenmodel.

In hoofdstuk II wordt nader ingegaan op de techniek van de clonogene assay, terwijl bovendien aandacht wordt geschonken aan de wijze van interpretatie van de resultaten. In het bijzonder worden de eigen ervaringen met drie verschillende dissociatie methoden, noodzakelijk om van solide tumoren celsuspensies te maken, besproken. Hierbij wordt niet alleen aandacht geschonken aan de parameters opbrengst en viabiliteit, maar ook aan de invloed die dissociatie methoden hebben op het aantal colonies dat uiteindelijk in de kweken groeit en aan de invloed van de dissociatiemethoden op de gevoeligheid voor het cytostaticum cisplatinum. Na enzymatische dissociatie ontstaan celsuspensies met een hogere viabiliteit en een betere cloning efficiency dan na mechanische dissociatie, terwijl bovendien de kans op colonie groei groter is. De gemiddelde dosis respons curves voor cisplatinum vertonen voor de drie gebruikte dissociatie methoden een grote mate van overeenkomst, zodat - voor zover men althans op de

bevindingen bij één cytostaticum mag afgaan - de dissociatie methode slechts van geringe invloed is op de werkzaamheid van het cytostaticum. Op grond van één en ander moet bij de keuze van dissociatie methode de voorkeur worden gegeven aan het gebruik van een enzymatische methode (collagenase of trypsine). Met de drie gebruikte dissociatie methodes, maar vooral met de mechanische, werden tussen de afzonderlijke tumoren van de tumorxenograftlijn HEP-2 soms aanzienlijke verschillen in gevoeligheid gevonden. Derhalve kan niet worden volstaan met het testen van één of 2 tumoren van eenzelfde tumorlijn.

In Hoofdstuk III worden de kweekresultaten met hoofd-halstumoren in de clonogene assay, zowel rechtstreeks van de patiënt als na passage in de naakte muis, gerapporteerd. Dertien tumoren rechtstreeks van de patiënt werden in kweek gebracht. Slechts één maal (8%) werd coloniegroei in de kweken waargenomen. Veel betere resultaten werden verkregen met xenografts. Elf van de in totaal 14 humane hoofd-halstumoren (79%) groeiend bij de naakte muis, gaven aanleiding tot colonie groei met meer dan 100 colonies per 3×10^5 in kweek gebrachte cellen. Voor al deze tumorlijnen bleek het aantal colonies dat groeide in de agar bodems recht evenredig te zijn met het aantal in kweek gebrachte cellen. Eén en ander maakt het mogelijk om cytostatica te testen.

In Hoofdstuk IV wordt voor 8 cytostatica bij variërend van 3 tot 6 tumorlijnen, de werkzaamheid in vitro volgens de clonogene assay vergeleken met de werkzaamheid in vivo in de naakte muis. Behalve voor methotrexaat werd bij alle cytostatica een dosis afhankelijke groeiremming verkregen. Tumoren werden als gevoelig respectievelijk resistent beschouwd indien de concentratie van het gebruikte cytostaticum, nodig om het aantal colonies met 50% te reduceren, lager respectievelijk hoger was dan 1/10 van de piek plasma concentratie bij de patiënt. Alle hoofd-halstumorlijnen waren resistent voor cisplatinum, doxycycline, hydroxyurea, mafosfamide (een in vitro actieve analoog van cyclofosfamide) en methotrexaat. Bleomycine was actief in 1 van de 6 en 5-fluorouracil in 6 van de 6 getest hoofd-halstumorlijnen. De clonogene assay voorspelde correct de gevoeligheid in het naakte muizen model in 4/6 (66.7%) en

resistentie in 21/26 (80.8%) gevallen. Er werd een volledige overeenkomst gevonden tussen de gevoeligheid in vitro en de gevoeligheid in vivo voor bleomycine, cisplatinum, adriamycine en vincristine, echter niet voor methotrexaat, 5-fluorouracil en cyclofosfamide. Voor 5-fluorouracil ontbrak de overeenkomst zelfs geheel. Geconcludeerd wordt dat het in vitro kweken van humane tumor xenografts zou kunnen dienen als een snelle screeningsmethode om nieuwe middelen te vinden die actief zijn tegen hoofd-hals maligniteiten. Bovendien zou de clonogene assay uit het grote aanbod van cytostatica middelen kunnen selecteren om deze vervolgens te testen in het naakte muizenmodel. Het feit dat voor enkele cytostatica in deze studie de overeenkomst tussen de in vitro en in vivo gegevens niet volledig is of zelfs ontbreekt, wijst er op dat de resultaten verkregen met het in vitro testen van tumor xenografts met enige voorzichtigheid moeten worden geïnterpreteerd.

In Hoofdstuk V komt de met betrekking tot de waarde van het gecombineerde screeningsmodel essentiële vraagstelling aan de orde in hoeverre het herhaald transplanteren van een humane tumor in naakte muizen de eigenschappen van deze tumor verandert, in het bijzonder de gevoeligheid voor cytostatica. De gevoeligheid voor de cytostatica bleomycine, cisplatinum, adriamycine, hydroxyurea, mafosfamide, methotrexaat, vincristine en 5-fluorouracil van de cellijn HEP-2 en de gevoeligheid van de solide tumorxenografts uit deze cellijn ontstaan werden met elkaar vergeleken. De onderzoeksresultaten vermeld in dit hoofdstuk tonen aan dat enige voorzichtigheid bij de interpretatie van de uitkomsten met het naakte muizenmodel gecombineerd met de clonogene assay op zijn plaats is. Ten eerste bleek voor 2 van de in totaal 7 gebruikte cytostatica, indien dezelfde criteria voor de gevoeligheid en resistentie worden gebruikt zoals beschreven in de vorige alinea, de gevoeligheid van de solide tumoren anders te zijn dan de gevoeligheid van de cellijn. De cellijn HEP-2 was gevoelig voor bleomycine; de solide tumoren bleken daarentegen resistent. Het omgekeerde werd gevonden voor 5-fluorouracil: de cellijn was resistent voor dit middel, de solide tumoren waren gevoelig. Ten tweede werd gevonden dat de vroege passages (1e tot en met de 8ste) onderling verschilden in gevoeligheid voor cisplatinum. Niettemin tonen de resultaten aan dat

de gevoeligheid van tumoren meestal niet verandert door passage in de naakte muis. Er werden geen verschillen gevonden in gevoeligheid voor cytostatica tussen de cellijn en de solide tumoren voor 5 van de 7 geteste cytostatica. Voor alle 7 geteste cytostatica kwam de gevoeligheid van de 8e en 16e passage overeen.

In Hoofdstuk VI worden op basis van de resultaten van het eigen onderzoek enige opmerkingen gemaakt omtrent toekomst perspectieven van methoden die als doel hebben de werking van cytostatica bij de mens te voorspellen, in het bijzonder bij patiënten met een hoofd-halstumor. Uit de literatuurgegevens komt naar voren dat de clonogene assay mogelijk selecteert voor een ander type werkzame cytostatica dan het tot nu toe door de NCI in de Verenigde Staten gebruikte screeningsmodel. Een zogenaamde "disease oriented screening"- waarbij cytostatica per tumorsoort worden getest - lijkt, in het bijzonder voor hoofd-halstumoren, voordelen te kunnen bieden.

De volgende publicaties hebben betrekking op de in dit proefschrift beschreven resultaten.

- Boerrigter, G.H., Heinerman, E.C.M., Braakhuis, B.J.M. & Snow, G.B. (1985) Human oral cancer in the clonogenic assay. *J.Oral Pathol.*, 14, 66.
- Boerrigter, G.H., Heinerman, E.C.M., Braakhuis, B.J.M., & Snow, G.B. (1986) Chemosensitivity of human head and neck cancer xenografts in the clonogenic assay and in nude mice. *Br.J. Cancer*, 54, 53.
- Braakhuis, B.J.M., Heinerman, E.C.M., Schoevers, E.J. & Snow, G.B. (1983) Minimal activity of methotrexate against human head and neck cancer xenografts in nude mice. Second European Conference on Clinical Oncology and Cancer Nursing. Amsterdam (abstract).
- Braakhuis, B.J.M., Schoevers, E.J., Heinerman, E.C.M., Sneeuwloper, G. & Snow, G.B. (1983) Chemotherapy of human head and neck cancer xenografts with three clinically active drugs: cisplatinum, bleomycin and methotrexate. *Br.J. Cancer*, 48, 711.
- Braakhuis, B.J.M., Schoevers, E.J., Heinerman, E.C.M., Boerrigter, G.H. & Snow, G.B. (1984) Unexpected minimal activity of

- methotrexate in human head and neck cancer xenografts. Int. Conference of Head and Neck Cancer, Baltimore, USA (abstract).
- Braakhuis, B.J.M., Schoevers, E.J., Heinerman, E.C.M., Boerrigter, G.H. & Snow, G.B. (1985). Oral cancer in the nude mouse xenograft model. *J.Oral Pathol.*, 14, 67.
- Braakhuis, B.J.M., Heinerman, E.C.M., Boerrigter, G.H. & Snow, G.B. (1986) Chemosensitivity of human head and neck cancer xenografts in the clonogenic assay and in nude mice. 5th NCI-EORTC Symposium on New Drugs in Cancer Therapy, Amsterdam (abstract).
- Heinerman, E.C.M., Braakhuis, B.J.M. & Snow, G.B. (1983) Human head and neck cancer xenografts as a tumour source in human tumour stemcel assay. Second European Conference on Clinical Oncology and Cancer Nursing, Amsterdam (abstract).
- Heinerman, E.C.M., Braakhuis, B.J.M., Boerrigter, G.H. & Snow, G.B. (1985) Successful in vitro growth of human head and neck cancer after transplantation in athymic nude mice. *Arch. Otorhinolaryngol.*, 241, 225.
- Heinerman, E.C.M., Boerrigter, G.H., Braakhuis, B.J.M. & Snow, G.B. (1985) Drug sensitivity testing of human head and neck cancer in the clonogenic assay. *Clin. Otolaryngol.*, 10, 228.
- Heinerman, E.C.M., Braakhuis, B.J.M., Boerrigter, G.H. & Snow, G.B. (1987). Chemosensitivity of head and neck tumour xenografts. Comparison of the nude mice model with the clonogenic assay. *Clin. Otolaryngol.* In press.

Summary

In Chapter I a review of the literature is given concerning the experiences with the clonogenic assay as developed by Hamburger and Salmon on human tumours in general, and particularly on head and neck tumours. Only 1/3 of the solid tumours shows sufficient colony growth to test cytostatic drugs. Therefore, at the present time the clonogenic assay can not be recommended as a useful in vitro drug sensitivity test for tumours in individual patients. This holds particularly true for head and neck tumours because these tumours demonstrate even less growth, or no growth at all. On the contrary the clonogenic assay does seem suitable for the screening of new anticancer drugs. Other methods, using human material, developed to test cytostatic drugs are reviewed.

In Chapter II the technique of the clonogenic assay and the methods of interpretation of the results are described. Our experiences with three different methods of dissociation, necessary to obtain a single cell suspension, are reported. Not only the parameters cell yield and viability, but also the possible influence of the dissociation method on the number of colonies grown in the clonogenic assay and the sensitivity profiles for the drug cisplatin have been investigated. With enzymatic dissociation cell suspensions are obtained with higher viability and higher cloning efficiencies than with mechanical dissociation. Also the chance that colony growth will result is greater with enzymatic methods. The mean dose response profiles with cisplatin are almost similar for the three dissociation methods used. This means that for cisplatin the dissociation method does not influence the sensitivity for this drug. It can be concluded that enzymatic dissociation methods are to be preferred over mechanical methods. Between tumours of the same tumour xenograft line HEP-2 different sensitivity profiles are observed. Therefore it is necessary to test at least two tumours of the same tumour line.

In Chapter III the results are reported on culturing head and neck tumours in the clonogenic assay directly from patients and after passaging in the nude mouse. Thirteen tumours directly from patients were cultured. Only one of these tumours (8%) demonstrated growth. Much better results were obtained with xenografts. Eleven of 14 human head and neck tumours (79%) growing in nude mouse demonstrated growth with more than 100 colonies per 3×10^5 cells plated. In all tumour lines the number of colonies obtained was proportional to the number of cells plated, making drug testing possible.

In Chapter IV the in vitro activity of 8 cytostatic drugs in the clonogenic assay is compared to the activity in the nude mouse model. Tumours were taken from 3-6 different xenograft lines. A dose dependent inhibition of colony growth was obtained with all drugs tested, except methotrexate. Tumours were considered sensitive respectively resistant when the drug concentration required to inhibit colony formation by 50%, was less respectively more than 1/10 of the peak plasma concentration in patients. All head and neck tumour lines were resistant to cisplatin, doxorubicin, hydroxyurea, maphosphamide (an in vitro active analogue of cyclophosphamide) and methotrexate. Bleomycin was active in 1/6 and 5-fluorouracil in 6/6 of the head and neck tumour lines tested. The clonogenic assay correctly predicted sensitivity in 4/6 (66.7%) and resistance in 21/26 (80.8%) of the cases when compared to the activity in the nude mouse model. A lack of correlation was noted for methotrexate, 5-fluorouracil and cyclophosphamide. In vitro culture of human head and neck xenografts may provide a means for a rapid and large scale screening to identify new drugs active against head and neck malignancies. In addition the clonogenic assay may help to select drugs for subsequent testing in the nude mouse xenograft model. A lack of correlation of some drugs indicates that there are some limitations in the use of xenograft tumour material for in vitro testing of new drugs.

In Chapter V the essential question arises to what extent the characteristics of a tumour, particularly the sensitivity to cytostatic drugs, are changed by repeated transplantation in nude mice. The sensitivity profiles for bleomycin, cisplatin, doxorubicin,

hydroxyurea, mafosfamide, methotrexate, vincristine, fluorouracil of the cell line HEP-2 and the sensitivity profiles for the same drugs of the solid tumours in nude mice, originated from this cell line, were compared. The results reported in this chapter indicate that careful interpretation of the data obtained with the combined model (the nude mouse xenograft model and the clonogenic assay) is necessary. In the first place for 2 out of 7 cytostatic drugs the sensitivity of the solid tumours differed from the sensitivity of the cell line. The cell line HEP-2 proved sensitive to Bleomycin; the solid tumours, on the contrary, were resistant to this drug. For 5-fluorouracil it was the other way around: the cell line was resistant, the solid tumours were sensitive. In the second place it was found that the early passages (1st-8th) varied in sensitivity to cisplatin. Nevertheless the results show that the sensitivity of the tumour generally does not change by passaging in nude mice. No differences were found in sensitivity to cytostatic drugs between the cell line and the solid tumours for 5/7 tested drugs. The sensitivity for all 7 drugs tested were similar for the 8th and 16th passage.

In Chapter VI some comments, based on our own experiences are made on the future perspectives of methods, developed to predict the activity of cytostatic drugs, particularly in patients with a head and neck tumour. The results reported in the literature show that it is possible that the clonogenic assay selects another type of cytostatic drugs, compared to the screening model used until now by the NCI in the USA. It is likely that a disease oriented screening has some advantages, particularly for head and neck malignancies.

Literatuur

- Agrez, M.V., Kovach, J.S. & Lieber, M.M. (1982) Cell aggregates in the soft agar "human tumour stem cell assay". *Br.J.Cancer*, 46, 880.
- Ahmann, F.R., Meyskens, F.L., Moon, T.E., Durie, P.G. & Salmon, S.E. (1982) In vitro chemosensitivities of human tumor stem cells to the phase II drug 4'-(9-acridinylamino) methanesulfox-M-aniside and prospective in vivo correlations. *Cancer Res.*, 42, 4495.
- Alberts, D.S., Chen, H.S.G., Salmon, S.E. et al (1981) Chemotherapy of ovarian cancer directed by the human tumor stem cell assay. *Cancer chemother. Pharmacol.*, 6, 279.
- Alberts, D.S., Mackel, C., Forelinko, R. & Salmon, S.E. (1982) Phase I clinical investigation of 9,10-Anthracenedicarboxaldehyde Bis [(4,5-dihydro-1H-imidazol-2-yl) hydrazones] dihydrochloride with correlative in vitro human tumor clonogenic assay. *Cancer Res.*, 42, 1170.
- Arkin, H., Ohnuma, T., Holland, J.F. & Gailani, S.D. (1984) Effects of cell density on drug-induced cell kill kinetics in vitro. *AACR abstracts*, 1984.
- Bailey, M.J., Ormerod, M.G., Imrie, S.F. et al (1981) Comparative functional histopathology of human breast carcinoma xenografts. *Br.J.Cancer*, 42, 125.
- Bateman, A.E., Selby, P.J., Steel, G.G. & Twose, G.D.W. (1980) In vitro chemosensitivity tests on xenografted human melanomas. *Br.J. Cancer*, 41, 189.
- Bernal, S., Thompson, R., Gilbert, F.N. & Baylin, S.B. (1983) In vitro and in vivo growth characteristics of two different cell populations in an established line of human neuroblastoma. *Cancer Res.*, 43, 1256.
- Bertelsen, C.A., Sondak, V.K., Mann, B.D., Korn, E.L. & Kern, D.H. (1984). Chemosensitivity testing of human solid tumor. *Cancer*, 53, 1240.
- Bloemmen, J. & Eyssen, H. (1973) Immunoglobulin levels of sera of genetically thymusless (nude) mice. *Eur.J. Immunol.*, 3, 1117.
- Bogden, A.E., Kelton, D.E., Cobb, W.R., Galkin, T.A. & Johnson, R.K. (1978) Effect of serial passage in nude athymic mice on the growth characteristics and chemotherapy responsiveness of 13762 and R 230 AC mammary tumor xenografts. *Cancer Res.*, 38, 59.
- Bogden, A.E., Haskell, P.M., Le Page, D.J., Kelton, D.E., Cobb, W.R. & Esvu, H.J. (1979) Growth of human tumor xenografts implanted under the renal capsule of normal immunocompetent mice. *Exp. Cell Biol.*, 47, 281.
- Braakhuis, B.J.M., Schoevers, E.J., Heijerman, E.C.M., Sneeuvloper, G., & Snow, G.B. (1983) Chemotherapy of human head and neck cancer xenografts with three clinically active drugs: Cisplatinum, Bleomycin and Methotrexate. *Br.J. Cancer*, 48, 711.
- Braakhuis, B.J.M., Sneeuvloper, G. & Snow, G.B. (1984). The potential of the nude mouse xenograft model for the study of head and neck cancer. *Arch. Otorhinolaryngol.*, 239, 69.
- Bradley, E.C., Issell, B.F., & Hellman, R. (1984). The human tumor colony forming chemosensitivity assay: a biological and clinical review. *Invest. New Drugs*, 2, 59.
- Cobleigh, M.A., Gallagher, P.A., Hill, J.R., Applebaum, E.L. & McGuire, V.P. (1984) Growth of human squamous head and neck cancer in vitro. *A.J. Pathol.*, 115, 397.
- Courtenay, V.D. & Mills, J. (1978) An in vitro colony assay for human tumours grown in immune-suppressed mice and treated in vivo with cytotoxic agents. *Br.J. Cancer*, 37, 261.
- Courtenay, V.D., Mills, J. & Steel, G.G. (1982) The spectrum of chemosensitivity of two human pancreatic carcinoma xenografts. *Br.J. Cancer*, 46, 436.
- Cowan, J.D., Von Hoff, D.D., Neuenfeldt, B., Mills, G.B. & Clark, G.M. (1984) Predictive value of trypan blue exclusion viability measures for colony formation in a human tumor cloning assay. *Cancer Drug Delivery*, 1, 95.

- Dexter, D.L., Sprent, E.N., Fligiel, Z. et al (1981) Heterogeneity of cancer cells from a single human colon carcinoma. *Amer. J. Med.*, 71, 949.
- Dihner, J.J. & Nakeff, A. (1983) Development of an in vitro clonogenic assay for the R 3327 rat prostatic adenocarcinoma permits comparison of the proliferative potential of the R 3327, R 3327A and R 3327 AT tumors. *Prostate*, 4, 289.
- Easty, D.M., Easty, G.C., Carter, R.L., Monaghan, P. & Butler, L.J. (1981) Ten human carcinoma cell lines derived from squamous carcinomas of the head and neck. *Br. J. Cancer*, 43, 772.
- Engelholm, S.A., Spang-Thomsen, M., Br  nner, N., N  hr, I. & Vindel  v, L.L. (1985) Disaggregation of human solid tumours by combined mechanical and enzymatic methods. *Br. J. Cancer*, 51, 93.
- Fiebig, H.H. & Lohr, G.W. (1984) Wachstum Menschlicher malignome in der thymus-aplastischen nacktaus. *Med. Welt*, 35, 52.
- Fiebig, H.H., Schuchhardt, C., Henss, H., Fiedler, L. & Lohr, G.W. (1984) Comparison of tumor response in nude mice and in the patient. *Behring Inst. Mitt.*, 74, 343.
- Fodstad, O., Aass, N. & Phil, A. (1980). Assessment of tumor growth and response to chemotherapy of human melanomas in athymic nude mice. *Br. J. Cancer (suppl.IV)*, 41, 146.
- Frei III, E. (1982). The national cancer chemotherapy program. *Science*, 217, 600.
- Freshney, R.I., Paul, J. & Kane, J.M. (1975) Assay of anticancer drugs in tissue culture; conditions effecting their ability to incorporate 3-H-leucine after drug treatment. *Br. J. Cancer*, 31, 89.
- Friedman, H.S., Schold, S.G., Muhlbaier, L.H., Bj  rns  n, T.D. & Bigner, D.D. (1984) In vitro versus in vivo correlation of chemosensitivity of human medulloblastoma. *Cancer Res.*, 44, 5145.
- Giovannella, B.C., Steklyn, J.S., Williams, L.J., Lee, S.S., & Shephard, R.C. (1979) Heterotransplantation of human cancers into nude mice. *Cancer*, 42, 2269.
- Goldenberg, D.M. & Witte, S. (1967) Chemotherapy of 2 morphologically similar human tumors growing in the golden hamster. *Eur. J. Cancer*, 3, 95.
- Grabstein, G. & Cohen, J. (1965) Collagenase: Effect on the morphogenesis of embryonic salivary epithelium in vitro. *Science*, 150, 626.
- Greene, H.S.M. (1952) The significance of the heterologous transplantability of human cancer. *Cancer*, 5, 24.
- Group for sensitivity testing of tumors (KSST) (1981) In vitro short-term test to determine the resistance of human tumors to chemotherapy. *Cancer*, 48, 2127.
- Hakansson, L. & Trop  , C. (1974) On the presence within tumours of clones that differ in sensitivity to cytostatic drugs. *Acta Path. Microbiol. Scand.*, 82, 35.
- Hamburger, A.V. & Salmon, S.E. (1977) Primary bioassay of human tumor stem cells. *Science*, 197, 461.
- Hamburger, A.V., Salmon, S.E., Kim, M.B. et al (1978) Direct cloning of human ovarian carcinoma cells in agar. *Cancer Res.*, 38, 3438.
- Hamburger, A.V., White, C.P. & Tencer, K. (1982a). Effect of enzymatic disaggregation on proliferation of human tumor cells in soft agar. *J.N.C.I.*, 68, 945.
- Hamburger, A.V. & White, C.P. (1982b) Interaction between macrophages and human tumor clonogenic cells. *Stem cells*, 1, 209.
- Heinerman E.C.M., Braakhuis, B.J.M., Boerrigter, G.H. & Snow, G.B. (1985) Successful in vitro growth of human head and neck cancer after transplantation in nude mice. *Arch. Otorhinolaryngol.*, 241, 252.
- Hilgard, P. & Brock, N. (1984) The key role for the cytostatic activity and selectivity of cyclophosphamide. *Invest. New Drugs*, 2, 131.
- Hodges, C.M., Livingstone, D.C. & Franks, L.M. (1973) The localization of trypsin in cultured mammalian cells. *J. Cell Sci.*, 12, 887.
- Houghton, J.A. & Taylor, D.M. (1978) Growth characteristics of human colorectal tumours during serial passage in immune deprived mice. *Br. J. Cancer*, 37, 213.
- Hrynuk, W.M. & Bertino, J.R. (1969) Treatment of leukemia with large doses of methotrexate and folinic acid: Clinical-biochemical correlates. *J.Clin. Invest.*, 48, 2140.
- Hurpel, J.D. & Yount, L.J. (1965) Selection of anticancer drugs for palliation using tissue culture sensitivity studies. *Am. J. Surg.*, 109, 39.
- Inaba, M., Tashiro, T., Kobayashi, T. et al. (1984) Responsiveness of human tumour xenografts to chemotherapy with special reference to the clinical dose. In Immune deficient animals, Sorbat, B. (ed). p. 421. Karger: Basel.
- Ishii, S., Yanawaki, S., Saki, T. et al (1983) Characteristics of human soft tissue sarcomas in xenografts and in vitro. *Clin. Orthopaedics & Related Res.*, 173, 251.
- Johns, M.E. (1982) The clonal assay of head and neck tumor cells: results and clinical correlations. *Laryngoscope*, 92, suppl. 28, 1.
- Johns, M.E. & Mills, S.E. (1983) Cloning efficiency. A possible prognostic indicator in squamous cell carcinoma of the head and neck. *Cancer*, 52, 1401.
- Kern, D.H., Campbell, M.A., Cochran, A.J., Burk, M.W. & Morton, D.L. (1982) Cloning of human solid tumors in soft agar. *Int. J. Cancer*, 30, 725.
- Kirkels, V.J., Pelgrim, O.E., Hoogenboom et al (1983) Pattern of tumor colony development over time in soft-agar culture. *Int. J. Cancer*, 33, 399.
- Kopper, L., Steel, G.G. (1975). The therapeutic response of three human tumor lines maintained in immune suppressed mice. *Cancer Res.*, 35, 2704.
- Leibovici, J. (1984) Serial passage of tumors in mice in the study of tumor progression and testing of anti-neoplastic drugs. *Cancer Res.*, 44, 1981.
- Lickin, J.N., Cane, K.A. & Baikie, A.G. (1974) In vitro drug selection in anti-neoplastic chemotherapy. *Eur. J. Cancer*, 10, 809.
- Looney, W.B., Mayo, A.A., Allen, P.M., Morrow, J.Y. & Morris, H.P. (1973) A mathematical evaluation of tumour growth curves in rapid, intermediate and slow growing rat hepatomas. *Br. J. Cancer*, 27, 341.
- Ludvig, H. & Fritz, E. (1981) Individualized chemotherapy in multiple myeloma by cytostatic drug sensitivity testing of colony-forming cells. *Anticancer Res.*, 1, 329.
- Mattern, J., Kaufmann, M., Ways, K. et al (1976) Clinical correlates of in vitro effect of adriamycin on advanced lung carcinoma. *Clin. Wochenschr.*, 54, 665.
- Mattern, J., Haag, D. & Voigt, M. (1981b). Growth kinetics of human lung tumours in nude mice. *Exp. Cell Biol.*, 49, 34.
- Mattox, D.E. & Von Hoff, D.D. (1980a). In vitro stem cell assay in head and neck squamous carcinoma. *Am. J. Surg.*, 140, 527.
- Mattox, D.E. & Von Hoff, D.D. (1980b) Culture of human head and neck cancer stem cells using soft agar. *Arch. Otolaryngol.*, 106, 672.
- Mattox, D.E., Von Hoff, D.D. & Harris, L.L. (1983) Human tumor cloning assay in advanced head and neck cancer. Prospective correlative trial. *Arch. Otolaryngol.*, 109, 724.
- Mattox, D.E., Von Hoff, D.D., Clark, G.M. & Aufdemorte, T.B. (1984) Factors that influence growth of head and neck squamous carcinoma in the soft agar cloning assay. *Cancer*, 53, 1736.
- McGuire, V.L., Horvitz, K.B., Pearson, O.H. & Segaloff, A. (1977) Current status of estrogen and progesterone receptors in breast cancer. *Cancer*, 33, 2934.
- Meyskens, F.L., Thomson, S.P., Hickie, R.A. & Sipes, N.J. (1983) Potential biological explanation of stimulation of colony growth in semi-solid agar by cytotoxic agents. *Br. J. Cancer*, 48, 863.
- Miller, B.E., Miller, F.R. & Heppner, G.H. (1981) Interactions between tumor subpopulations effecting their sensitivity to the antineoplastic agents cyclophosphamide and methotrexate. *Cancer Res.*, 41, 4378.
- Moore, A.E., Sabackevsky, L. & Wallace Toolan, H. (1955) Culture characteristics of 4 permanent lines of human cancer cells. *Cancer Res.*, 15, 598.
- Nowak, K., Peckham, M.J. & Steel, G.G. (1978) Variation in response of xenografts of colo-rectal carcinoma to chemotherapy. *Br. J. Cancer*, 37, 576.
- Ogawa, M., Bergsagel, D.E. & McCulloch, E.A. (1973). Chemotherapy of mouse myeloma: quantitative cell culture predictive of response in vivo. *Blood*, 41, 7.
- Olsson, L., Sorensen, H.R. & Behnke, O. (1984) Intratumoral phenotypic diversity of cloned human lung tumor cell lines and consequences for analysis with monoclonal antibodies. *Cancer*, 54, 1757.
- Osieka, R. (1984) Studies on drug resistance in a human melanoma xenograft system. *Cancer Treat. Rev.*, 11 (suppl.4), 85.
- Pantelouris, E.M. & Flisch, P.A. (1972) Estimation of PFC and serum haemolysis response to SRBC in nude mice. *Immunol.*, 22, 159.
- Pappenheimer, A.M. (1917) Experimental studies upon lymphocytes. I. The reaction of individual patient's tumor to chemotherapy. *Am. J. Med.*, 70, 1027.
- Pavelic, Z.P., Slocum, H.K., Rustum, Y.M., Creaven, P.J., Karakousis, C. & Tahita, H. (1980) Colony growth in soft agar of human melanoma, sarcoma & lung carcinoma cells disaggregated by mechanical and enzymatic methods. *Cancer Res.*, 40, 2160.

- Pickard, R.G., Cobb, L.M. & Steel, G.G. (1975) The growth kinetics of xenografts of human colorectal tumours in immune deprived mice. *Br. J. Cancer*, 31, 36.
- Povlsen, C.O. & Rygaard, J. (1971) Heterotransplantation of human adenocarcinomas of the colon and rectum to the mouse mutant Nude. A study of 9 consecutive transplantations. *Acta Pathol. Microbiol. Scand.*, 79, 159.
- Povlsen, C.O. & Jacobson, G.K. (1975) Chemotherapy of human malignant melanoma transplanted in the nude mice. *Cancer Res.*, 35, 2790.
- Puck, T.T. & Marcus, P.I. (1955) A rapid method of viable cell titration and clone production with Hela cells in tissue culture: the use of X-irradiated cells to supply conditioning factors. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 41, 432.
- Rasey, J.S. & Nelson, N.J. (1980) Response of an in vivo-in vitro tumour to X-rays and cytotoxic drugs: effect of tumour disaggregation methods on cell survival. *Br. J. Cancer*, 41, suppl. IV, 217.
- Richmond, H.G. & Billington, R.W. (1981) Chemotherapy sensitivity testing in human tumors. *J. Clin. Pathol.*, 34, 343.
- Roper, P.R. & Drevinko, B. (1976) Comparison of in vitro methods to determine drug-induced cell lethality. *Cancer Res.*, 36, 2182.
- Rozencweig, M., Von Hoff, D.D., Abele, R. & Muggia, F.M. (1979) Cisplatin. In: *Cancer Chemotherapy*, Pinedo, H.M. (ed.) p. 107. Elsevier: New York.
- Rupniak, A.T. & Hill, B.T. (1980) The poor cloning ability in agar of human tumour cells from biopsies of primary tumours. *Cell Biol. Int. Rep.*, 4, 479.
- Rygaard, J. & Povlsen, C.O. (1969) Heterotransplantation of a human malignant tumour to nude mice. *Acta Pathol. Microbiol. Scand. Sect. A.*, 77, 758.
- Salmon, S.E., Hamburger, A.B., Soehalen, B., Durie, B.G.M., Alberts, D.S. & Moon, T.E. (1978) Quantitation of differential sensitivity of human tumor stem cells to anticancer drugs. *N. Engl. J. Med.*, 298, 1321.
- Salmon, S.E. (1980) Applications of the human tumor stem cell assay to new drug evaluation and screening. *Cloning of human tumor stem cells*, New York, Alan R. Liss, Inc., 291.
- Salmon, S.E., Durie, B.G.M., Young, L., Liu, R.M., Trown, P.W. & Stebbing, M. (1983) Effects of cloned human leucocyte interferons in the human tumor stem cell assay. *J. Clin. Oncol.*, 1, 217.
- Salmon, S.E. (1984) Human tumor colony assay and chemosensitivity testing. *Cancer Treat. Rep.*, 68, 117.
- Sandbach, J., Von Hoff, D.D. & Clark, G. (1982) Direct cloning of human breast cancer in soft agar culture. *Cancer*, 50, 1315.
- Sarosdy, N.F., Lamm, D.L., Radwin, H.M. & Von Hoff, D.D. (1982) Clonogenic assay and in vitro chemosensitivity testing of human urologic malignancies. *Cancer*, 50, 1332.
- Schiff, L.J. & Shugar, M.A. (1984) Growth of human head and neck squamous cell carcinoma stem cells in agarose. *Cancer*, 53, 286.
- Schlag, P. & Schreml, W. (1982) Heterogeneity in growth pattern and drug sensitivity of primary tumor and metastases in the human tumor colony-forming assay. *Cancer Res.*, 42, 4068.
- Selby, P.J., Courtenay, V.D., McElwain, T.J., Peckham, M.J. & Steel, G.G. (1980) Colony growth and clonogenic cell survival in human melanoma xenografts treated with chemotherapy. *Br. J. Cancer*, 42, 438.
- Selby, P.J., Buick, R.M. & Tannock, J. (1983) A critical appraisal of the human tumor stem cell assay. *N. Eng. J. Med.*, 308, 129.
- Sharkey, F.E. & Fogh, J. (1984) Considerations in the use of the nude mice for cancer research. *Cancer Metastasis Rev.*, 3, 341.
- Sharkey, F.E., Spicer, J.H. & Fogh, J. (1985) Changes in histological differentiation of human tumors transplanted to athymic nude mice: a morphometric study. *Expl. Cell Biol.*, 53, 100.
- Shoemaker, R.H., Wolpert-De Philipps, M.K., Kern, D.H. et al. (1985) Application of a human tumor colony forming assay to new drug screening. *Cancer Res.*, 45, 2145.
- Shoemaker, R.H. (1986) New approaches to antitumor drug screening: the human tumor colony forming assay. *Cancer Treat. Rep.*, 70, 9.
- Shorthouse, A.J., Smyth, J.F., Steel, G.G., Ellison, M., Mills, J. & Peckham, M.J. (1980) The human tumour xenograft, a valid model in experimental chemotherapy? *Br. J. Surg.*, 67, 715.
- Shorthouse, A.J., Jones, J.M., Steel, G.G. & Peckham, M.J. (1982) Experimental combination and single agent chemotherapy in human lung-tumour xenografts. *Br. J. Cancer*, 46, 35.
- Singletary, S.E., Umbach, G.E., Spitzer, G. et al. (1985) The human tumor stem cell assay revisited. *Int. J. Cell Cloning*, 3, 116.
- Slocum, H.K., Pavelic, Z.P. & Rustum, Y.M. (1980) An enzymatic method for the disaggregation of human solid tumors for studies of clonogenicity and biochemical determinants of drug action. In: *Cloning of human tumor stem cells*. New York: Alan R. Liss, 339.
- Sokal, R.R. & Rohlf, F.J. (1969) *Biometry*. p. 175. Freeman & Co.: San Francisco.
- Solesvik, O.V., Rofstad, E.K. & Brustad, E.H. (1985) Vascular structure of the C3H mammary carcinoma, the B16 melanoma and the Lewis lung carcinoma in syngeneic, conventional mice and congenitally athymic mice. *Eur. J. Cancer Clin. Oncol.*, 21, 499.
- Staquet, M.J., Byar, D.P., Green, S.B. & Rozencsweig, M. (1983) Clinical predictivity of transplantable tumor systems in the selection of new drugs for solid tumors: Rational for a three-stage strategy. *Cancer Treat. Rep.*, 67, 753.
- Steel, G.G. (1977) *Growth kinetics of tumors*. Oxford: Clarendon Press, 217.
- Steel, G.G., Courtenay, V.D. & Peckham, M.J. (1983) The response to chemotherapy of variety of human tumour xenografts. *Br. J. Cancer*, 47, 1.
- Stephens, T.C. & Peacock, J.H. (1982) Clonal variation in the sensitivity of B16 melanoma to m-Amsa. *Br. J. Cancer*, 45, 821.
- Sweeney, F.L., Pot-Deprun, J., Poupon, M. & Shouroulinkov, I. (1982) Heterogeneity of the growth and metastatic behaviour of cloned cell lines derived from a primary rhabdomyosarcoma. *Cancer Res.*, 42, 3776.
- Taetle, R., Koessler, A.K. & Howell, S.B. (1981) In vitro growth and drug sensitivity of tumor colony-forming units from human tumor xenografts. *Cancer Res.*, 41, 1856.
- Taetle, R., Howell, S.B., Giuliani, F.C., Koziol, J. & Koessler, A.K. (1982) Comparison of the activity of doxorubicin analogues using colony-forming assays and human xenografts. *Cancer*, 50, 1455.
- Taylor IV, S.G. (1983) Head and neck cancer. *Cancer chemotherapy 1983*. Ed. H.M. Pinedo et B.A. Chabner.
- Till, J.E. & McCulloch, E.A. (1961) A direct measurement of the radiation sensitivity of normal mouse bone marrow. *Radiat. Res.*, 14, 213.
- Tveit, K.M., Fodstad, O., Olsness, S. & Pihl, A. (1980) In vitro sensitivity of human melanoma xenografts to cytotoxic drugs. Correlation with in vivo chemosensitivity. *Int. J. Cancer*, 26, 717.
- Tveit, K.M., Endresen, L., Rugstad, H.E., Fodstad, O. & Pihl, A. (1981) Comparison of two soft-agar methods for assaying chemosensitivity of human tumours in vitro: malignant melanomas. *Br. J. Cancer*, 44, 539.
- Tveit, K.M., Fodstad, O., Lotsberg, J., Vaage, S. & Pihl, A. (1982) Colony growth and chemosensitivity in vitro of human melanoma biopsies. Relationship to clinical parameters. *Int. J. Cancer*, 29, 533.
- Twentyman, P.R. (1978) Sensitivity to 1,3-bis(2-Chloroethyl)-1-nitrosourea and 1-(2-chloroethyl)-3-(4-methylhexyl)-1-nitrosourea of the EMT 6 tumor in vivo as determined by both tumor volume response and in vitro plating assay. *Cancer Res.*, 38, 2395.
- Twentyman, P.R. (1985) Predictive chemosensitivity testing. *Br. J. Cancer*, 51, 295.
- Umbach, G.E., Spitzer, G., Ajani, J.A. et al. (1984) Factors determining methotrexate cytotoxicity in human bone marrow progenitor cells: Implications for in vitro drug testing of human tumors. In: *Human tumor cloning*, Salmon, S.E. & Trent, J.H. (eds.) p. 443. Grune & Stratton Inc.: Orlando.
- Valeriote, F. & van Putten, L. (1975) Proliferation depended cytotoxicity of anticancer agents: A review. *Cancer Res.*, 35, 2619.
- Venditti, J.M. (1983) The national cancer institute antitumor drug discovery program. Current and future perspectives: A commentary. *Cancer Treat. Rep.*, 67, 765.
- Voelcker, G., Wagner, T., Vientzek, C. & Hohorst, H.J. (1984) Pharmacokinetics of activated cyclophosphamide and therapeutic efficacies. *Cancer*, 54, 1179.
- Volm, M., Wavss, K., Kaufmann, M. & Mattern, J. (1979) Pretherapeutic detection of tumour resistance and the results of tumour chemotherapy. *Eur. J. Cancer*, 15, 983.
- Von Hoff, D.D., Harris, G.J., Johnson, G. & Glaubiger, D. (1980a) Initial experience with the human tumor stem cell assay: potential and problems. In: *Cloning of human tumor stem cells*, New York, Alan R. Liss, 113.
- Von Hoff, D.D. & Weisenthal, L. (1980b) In vitro methods to predict for patient response to chemotherapy. In: *Advances in pharmacology and chemotherapy*, 17,

- Von Hoff, D.D., Casper, J., Bradley, E.C., Sandbach, J., Jones, D. & Makuck, R. (1981) Association between human tumor colonyforming assay results and response of an individual patient's tumor to chemotherapy. *Am. J. Med.*, 70, 1027.
- Von Hoff, D.D., Coltman, C.A. & Forseth, B. (1981) Activity of mitoxantrone in a human tumor cloning system. *Cancer Res.*, 41, 1853.
- Von Hoff, D.D., Chen, T., Clark, G.M. et al. (1982) Long-distance transportation of specimens for human tumor cloning. *Stem Cells*, 2, 122.
- Von Hoff, D.D., Clark, G.M., Stogdill, B.J. et al. (1983) Prospective clinical trial of a human tumor cloning system. *Cancer Res.*, 43, 1926.
- Von Hoff, D.D. (1983) "Send this patient's tumor for culture and sensitivity." *N. Engl. J. Med.*, 308, 154.
- Waker, N., Slocum, H.K., Rustum, Y.M., Matsui, S. & Sandberg, A.A. (1981) Chromosomes and causation of human cancer and leukemia. XLIV. A method for chromosome analysis of solid tumors. *Canc. Gen. Cytogenetics*, 3, 1.
- Warenus, H.M. & Bleehe, N.M. (1982) In vivo-in vitro clonogenic assays in a human tumour xenograft with a high plating efficiency. *Br. J. Cancer*, 46, 45.
- Weisenthal, L.M., Dill, F.L., Kurnick, N.B. & Lippman, M.E. (1983) Comparison of dye exclusion assays with a clonogenic assay in the determination of drug-induced cytotoxicity. *Cancer Res.*, 43, 258.
- Vennerberg, J. (1984) Changes in growth pattern of human squamous cell carcinomas of the head and neck during serial passage in nude mice. *Int. J. Cancer*, 33, 245.
- Wright, W.C., Cobb, J.P., Gunport, S.L., Safadi, D., Walker, D.G. & Colomb, F.M. (1962) Further investigation of the relation between the clinical and tissue culture response to chemotherapeutic agents on human cancer. *Cancer*, 15, 264.
- Wortis, H.H. (1971) Immunological responses of nude mice. *Clin. Exptl. Immunol.*, 8, 305.
- Wortis, H.H. (1974) Immunological studies of nude mice. *Contemp. Topic Immunobiol.*, 3, 243.
- Zirvi, K.A., Masui, H., Giuliani, F.C. & Kaplan, O. (1983) Correlation of drug sensitivity on human colon adenocarcinoma cells grown in soft agar and in athymic mice. *Int. J. Cancer*, 32, 45.

Curriculum vitae

De schrijver van dit proefschrift werd geboren op 22 januari 1957 te Rotterdam. In 1974 werd het Gymnasium 8 diploma behaald. Aansluitend studeerde hij Geneeskunde aan de Rijksuniversiteit te Utrecht (artsexamen 24 april 1981). Vervolgens was hij van 1981-1983 als wetenschappelijk medeverker verbonden aan de afdeling Keel-Neus-Oorheelkunde van het Academisch Ziekenhuis van de Vrije Universiteit te Amsterdam. In deze periode werd een aanvang gemaakt met het onderzoek dat uiteindelijk leidde tot dit proefschrift.

Van 1 juli 1983 tot 1 juli 1987 werd hij opgeleid tot KNO-arts in bovengenoemd ziekenhuis (opleider: Prof.Dr.G.B. Snow), alwaar hij thans als specialist werkzaam is.

Dankwoord

Het in dit proefschrift beschreven onderzoek werd uitgevoerd op het Laboratorium voor Tumorbiologie van de vakgroep Keel-Neus-Oorheelkunde van de Vrije Universiteit te Amsterdam. Graag maak ik van de gelegenheid gebruik een ieder te bedanken die heeft bijgedragen tot het stand komen van dit proefschrift. In het bijzonder wil ik noemen:

mijn promotor Prof.Dr.G.B. Snow. Zonder uw vertrouwen en optimale begeleiding was dit proefschrift niet tot stand gekomen.

Boudevijn Braakhuis en Gijs Boerrigter. De discussies met jullie waren zowel vaardevol als plezierig.

Jacques Roumen, Tinelines Pot en Marian Bagnay. Veel praktisch werk werd door jullie snel en accuraat uitgevoerd.

Olga von Freytag Drabbe, Gerrie Buys en Heleen Starink. Jullie hebben veel zorg en tijd besteed aan de totstandkoming van de uiteindelijke tekst.

de stafleden en (ex)arts-assistenten van de afdeling KNO. Jullie belangstelling en ondersteuning waren zeer welkom.

Financiële bijdragen voor het drukken van dit proefschrift werden
geleverd door Entermed B.V., Hoffmann-La Roche B.V. en Lederle
Nederland B.V., waarvoor mijn hartelijke dank.

STELLINGEN

behorend bij het proefschrift "De clonogene assay bij hoofd-halstumoren"

1. Enzymatische dissociatie methoden verdienen de voorkeur boven mechanische dissociatie methoden bij het in kweek brengen van solide tumoren in de clonogene assay.
2. De clonogene assay is ongeschikt als test ter bepaling van de gevoeligheid van tumoren voor cytostatica bij de individuele patiënt met een plaveiselcelcarcinoom in het hoofd-halsgebied.
3. Humane hoofd-halstumoren groeiend als xenografts in naakte muizen kunnen, in tegenstelling tot humane hoofd-halstumoren rechtstreeks van de patiënt, worden gebruikt om cytostatica in vitro op hun antitumorverking te onderzoeken.
4. De in vitro gevoeligheid voor cytostatica van humane hoofd-halstumor xenografts in de clonogene assay komt in grote lijnen overeen met de in vivo gevoeligheid van deze tumoren bij de naakte muis.
5. Het is nog steeds niet bevestigd dat zogenaamde differentiatie inducers in vivo cellen in solide tumoren kunnen laten uitrijpen.
6. Bij het onderzoek naar de ongevoeligheid van tumoren voor cytostatica dient meer aandacht besteed te worden aan de mogelijkheid dat cytostatica tumorcellen niet in voldoende mate kunnen bereiken.
7. Bij patiënten met een chronische serieuze otitis media kan in het middenoorslijmvlies een volwaardige MALT (Mucosa Associated Lymphoid Tissue) tot ontwikkeling komen.
8. MRI (Magnetic Resonance Imaging) kan CT-scan niet vervangen ter bepaling van de operabiliteit van patiënten met een tumor uitgaande van de neusbijholten.

9. De spraakverstaanbaarheidsdrempel in ruis verandert niet na stapedectomie.

10. Er zijn onvoldoende aanwijzingen om bij het ontstaan van mediale rhomboïde glossitis een belangrijke rol toe te kennen aan *Candida albicans*.

11. De commissie Dekker heeft over de gezondheidszorg even goed nagedacht als Philips over de commerciële mogelijkheden van het Video 2000 systeem.

12. Goede wijn behoeft geen krans, een "jonge klare" wel een kans.

13. Een zaal met klapstoelen garandeert nog geen applaus.

E.C.M. Heinerman

9 oktober 1987