

**SENSITIVITY TO
METHOTREXATE AND NOVEL ANTIFOLATES
IN HUMAN SQUAMOUS CARCINOMA CELL LINES
OF THE HEAD AND NECK**

**DE GEVOELIGHEID VOOR METHOTREXAAT EN NIEUWE ANTIFOLATEN
IN HUMANE PLAVEISELCEL CARCINOOM-CELLIJNEN
UIT HET HOOFD-HALS GEBIED**
(met een samenvatting in het Nederlands)

PROEFSCHRIFT

ter verkrijging van de graad van doctor aan de
Rijksuniversiteit te Utrecht op gezag van de Rector
Magnificus, Prof. Dr. J.A. van Ginkel, ingevolge het
besluit van het College van Dekanen in het openbaar
te verdedigen op woensdag 11 december 1991 des
voormiddags te 10.30 uur

door

BERNARDUS FRANCISCUS AUGUSTINUS MARIA VAN DER LAAN

geboren op 23 mei 1959 te Laren, N.H.

SAMENVATTING

In dit proefschrift wordt een onderzoek besproken naar de mechanismen van cellulaire resistentie tegen het antifolaat methotrexaat (MTX) en naar de gevoeligheid voor nieuwe antifolaten in humane plaveiselcelcarcinoom-cellijnen uit het hoofd-halsgebied (HNSCC). De bedoeling van dit onderzoek was om: (1) de rol van cellulair membraantransport bij MTX cytotoxiciteit te belichten, (2) de mechanismen van verworven en/of natuurlijke resistentie tegen MTX te onderzoeken en (3) de gevoeligheid van HNSCC cellijnen voor nieuwe antifolaten te bestuderen.

Met dit doel werden zeven humane plaveiselcelcarcinoom-cellijnen bestudeerd, die oorspronkelijk afkomstig waren uit verschillende tumoren in het hoofd-halsgebied. Een belangrijk uitgangspunt in deze *in vitro* onderzoeken was om een meer klinische situatie na te bootsen door: (a) HNSCC cellijnen langzaam aan te laten passen aan een groeimedium met een lage folaatconcentratie, die de fysiologische plasma concentratie benadert, (b) HNSCC cellijnen bloot te stellen aan een gepulseerde toediening van MTX, in plaats van aan een continue aanwezigheid van MTX, in het groeimedium.

In hoofdstuk 2 wordt een overzicht gegeven van de literatuur omtrent de mogelijke routes van membraantransport van MTX, de intracellulaire stofwisseling van MTX en de verschillende mechanismen van cellulaire resistentie tegen MTX. Vervolgens worden membraantransport en intracellulaire stofwisseling besproken van enkele nieuwe antifolaten die gebruikt zijn in dit onderzoek. Nieuwe antifolaten zoals trimetrexaat (TMQ) en 10-EdAM blokkeren, net als MTX, het enzym dihydrofolaat reductase (DHFR), maar ICI-198,583 en DDATHF blokkeren andere sleutel-enzymen binnen de folaatstofwisseling.

In hoofdstuk 3 worden membraantransport karakteristieken bestudeerd van MTX in een HNSCC cellijn die langzaam aan gewend is te groeien in een kweekmedium met nanomolair gereduceerde-folaatconcentraties. Gewoonlijk worden proeven voor MTX membraantransport uitgevoerd in standaard groeimedia die 2-10 μM foliumzuur bevatten, gereduceerde folaatconcentraties in plasma daarentegen variëren tussen de 5-50 nM. De "laag-folaat" HNSCC cellijn liet een tienvoudige toename van (anti)-folaat transport via het gereduceerde folaat/MTX transportsysteem zien, hetgeen hoofdzakelijk veroorzaakt werd door een efficiënter transport en in mindere mate (15-20%) door een toename van de hoeveelheid transporteiwit.

In hoofdstuk 4 worden de mechanismen beschreven van verworven resistentie tegen MTX in een HNSCC cellijn wanneer die is blootgesteld aan verschillende MTX behandelingschema's. In cellen die gekweekt werden in een continu toenemende MTX concentratie (11B-MTX-C cellen) werd de resistentie tegen MTX 91 maal zo groot, de kruisresistentie tegen TMQ en 10 EdAM werd 30-respectievelijk 49 maal zo groot. De DHFR activiteit in 11B-MTX-C cellen was 63 maal toegenomen, terwijl er tevens een afname in [3H]-MTX transport en de folylpolyglutamaat synthase (FPGS) activiteit optrad van (respectievelijk 2.5- en 3.8

maal). Bij 2 nieuwe antifolaten, die andere doel-enzymen hebben dan DHFR, werd een lichte kruisresistentie waargenomen tegen ICI-198,583, maar de 11B-MTX-C cellen bleven volledig gevoelig voor DDATHF.

Als cellen resistent werden gemaakt door gepulseerde MTX toediening (11B-MTX-P cellen), bleken zij 46 maal resistent tegen MTX en 47 maal kruisresistent tegen ICI-198,583 bij kortdurende toediening van deze middelen, maar lieten slechts een kleine verandering in de MTX-gevoeligheid zien bij langdurige toediening. De resistente 11B-MTX-P cellen werden gekarakteriseerd door een afname in FPGS activiteit (5.6 maal) ten opzichte van de moedercellijn.

Hoofdstuk 5 beschrijft het voorkomen van natuurlijke resistentie tegen MTX in drie van de zeven HNSCC cellijnen, wanneer de duur van de MTX toediening wordt beperkt tot 24 uur (in plaats van 168 uur). Het mechanisme van de natuurlijke resistentie was gerelateerd aan een drievoudige verlaging van de intracellulaire FPGS activiteit. De drie cellijnen met een natuurlijke resistentie tegen MTX behielden echter de gevoeligheid voor één of meer van de drie nieuwe antifolaten (10-EdAM, ICI-198,583 en DDATHF) bij kortdurende toediening van deze middelen.

In hoofdstuk 6 worden de meetresultaten belicht van de activiteit van FPGS gemeten in een HNSCC cellijn. Twee verschillende meetmethoden worden vergeleken, een bestaande methode met DE-52 anion uitwisseling chromatografie en een nieuwe methode met een Sep-Pack C₁₈ patroon, die berust op omgekeerde fase chromatografie. Er werd een goede correlatie geconstateerd tussen de twee methoden, waarbij de Sep-Pack C₁₈ test het voordeel heeft, dat de analysetijd minder dan 5 minuten duurt, dit in tegenstelling tot de DE-52 procedure die ongeveer 2 uur in beslag neemt.

Tot slot worden in hoofdstuk 7 de klinische en pré-klinische aspecten van de gevoeligheid vóór en de resistentie tegen antifolaten in HNSCC besproken. Om in de toekomst de effectiviteit van chemotherapie bij de behandeling van patiënten met HNSCC te kunnen vergroten, worden enige suggesties gedaan voor vervolgstudies naar cellulaire resistentievorming tegen antifolaten *in vivo*.