

## 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 wèl 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  $3 \times 10^5$  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, doxyrubicine, hydroxyurea, mafosfamide (een in vitro actieve analoge 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 stemcell 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  $3 \times 10^5$  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.