

Kennis van werking antitumor-middel cisplatin kan therapie verbeteren

Genetisch-toxicologisch onderzoek is erop gericht een methode te ontwikkelen waarmee kan worden ingeschat hoe kankerpatiënten op een kuur met het chemische medicijn cisplatin zullen reageren. Voorkomen van onnodig lijden en verbeterde individuele behandelingsmethoden liggen hopelijk in het verschiet.

Ron Korevaar

Het Medisch Biologisch Laboratorium (MBL/TNO) in Rijswijk bepaalt met een zeer gevoelige detectiemethode de DNA-veranderingen die worden veroorzaakt door behandeling met cisplatin, een veel toegepast antitumor-middel. Onderzoek elders heeft uitgewezen dat gelijke tumorsoorten en gelijke doses medicijnen niet automatisch leiden tot dezelfde genezingsresultaten. Afhankelijk van factoren zoals de effectiviteit van het celherstelmechanisme, reageert elke patiënt anders. Het meest recente succes op de lange weg die het onderzoek nog te gaan heeft, komt voort uit patiëntenonderzoeken die het MBL in samenwerking met het Academisch Ziekenhuis Leiden heeft uitgevoerd. Er werd een overeenkomst aangehouden tussen de resultaten van in-vitro behandeling van bloed van patiënten en de in-vivo-effecten in het bloed van dezelfde patiënten die met cisplatin worden behandeld. Deze correlatie rechtvaardigt voortzetting van het onderzoek dat al sinds 1979 wordt gesubsidieerd door het Koningin Wilhelmina Fonds.

Genetisch-toxicologen van het MBL bestuderen de veranderingen die in het erfelijk materiaal DNA plaatsvinden onder invloed van cisplatin. Meer kennis van het werkingsmechanisme kan tot klinische toepassingen leiden. Behandelingsmethoden zullen optimaal kunnen worden aangepast aan de individuele patiënt indien men erin slaagt, vast te stellen of en welke hogere of lagere dosis cytostaticum een positiever effect zal hebben op de kankerbestrijding. Een minstens zo belangrijke klinische toepassing is het vinden van een methode waarmee een zinloze toepassing van de stof cisplatin kan worden voorkomen. Zo'n methode zal wellicht bestaan uit routinematig laboratoriumonderzoek op basis waarvan kan worden voorspeld of een bepaalde kuur wel zinvol zal zijn. Daarvoor dient te

worden onderzocht hoe het celmechanisme van de patiënt in-vitro (in de reageerbuis) op cisplatin reageert. Zo zal in de toekomst hopelijk veel lijden kunnen worden voorkomen.

Chemotherapeutische kuren zijn behandelingsmethoden voor kankerpatiënten, waarbij wordt gewerkt met chemische medicijnen. Zulke 'cytostatica' belemmeren de celgroei en hebben meer dan op de gewone lichaamcellen een effect op kankercellen. De kuren staan echter bekend om de veelsoortige en onaangename lichamelijke bijverschijnselen die ze veroorzaken. De bijwerkingen variëren van verlies van eetlust en misselijkheid tot diarree en haaruitval maar verdwijnen enige tijd na de behandeling. Cytostatica zijn in elk geval agressieve middelen die meestal in combinatie met elkaar, samen met een bepaalde soort bestraling, hormoontherapie of met immunotherapie worden ingezet in een poging de celwoeking tot staan te brengen.

Bij toeval ontdekt

Het cisplatin-onderzoek voert begon in de jaren zestig. Tijdens zijn onderzoek naar de invloed van elektrische stroom op E-coli bacteriën ontdekte de Amerikaanse onderzoeker Rosenberg in 1965 bij toeval dat de combinatie van een platina-elektrode geplaatst in een oplossing van ammonium chloride ertoe leidde dat de bacteriën niet meer deelden. Dat bracht hem op de idee dat er wellicht een stof gevormd zou kunnen zijn waar een antitumor-werking van zou kunnen uitgaan. Cisplatin, voluit de stof cis-diamminedichloroplatinum en afgekort cis-DDP, bleek verantwoordelijk voor dit effect. Deze stof bestaat uit hele kleine anorganische moleculen. Het bestaat uit een platina-atoom waaraan twee chlorides en twee aminogroepen vastzitten. In zijn pure vorm toegediend is cisplatin erg giftig voor de nieren, het beenmerg en het zenuwstelsel. In combinatie met de toevoeging van andere stoffen, een hoge zoutconcentratie en regelmatige nierspoeeling zijn er



Dr. ir. Anne Marie Fichtinger (foto's Victor Scheffer)

echter wel toepassingsmogelijkheden. Bij kankerpatiënten wordt cisplatin via een infuus direct in de bloedbaan gebracht waarna het zich vrij snel bindt aan diverse bestanddelen van bloed en weefsel en ook aan het DNA van de tumorcellen. De stof die zich niet bindt wordt via de nieren in urine afgescheiden. De reden dat cisplatin een anti-tumorwerking heeft, is dat deze toxische stof zich bindt aan het erfelijk materiaal, het DNA. De door cisplatin veroorzaakte DNA-adducten/modificaties leiden ertoe dat bepaalde tumorcellen door vergiftiging afsterven.

Nu is het helaas niet zo dat het cytostaticum zich alleen bindt met het DNA van kankercellen. In principe bindt het met alle cellen met dit verschil dat het vooral op kankercellen een dodelijke werking heeft. De toedienperiode is hierbij van groot belang. Gaf men vroeger beperkte hoeveelheden cytostatica gedurende langere tijd, tegenwoordig werkt men veelal met een methode waarbij de patiënt een relatief grote hoeveelheid krijgt toegevoerd hetgeen wordt gevolgd door een langere rustperiode. Op deze wijze brengt men aan de kankercellen beslis-

sende schade toe en geeft men de gezonde cellen, die door hun grotere weerstand slechts beperkte schade hebben opgelopen, de tijd zich te herstellen.

Succes bij testis- en ovariumkanker

Totnutoe is er in de kankerresearch geen enkel middel gevonden dat alle soorten tumoren bestrijdt. Cisplatin doodt dus evenmin alle tumoren. Wel is de combinatie van cisplatin met andere chemotherapeutische middelen (de stof wordt vrijwel nooit alleen toegepast) zoals bijvoorbeeld adriamycine, bleomycine en vinblastine bijzonder effectief tegen testis(zaadbal)kanker. Van de patiënten met testistumoren die met cisplatin worden behandeld geneest 80 tot 90 procent. Dit percentage steekt erg gunstig af tegen de behandelingsresultaten bij andere vormen van kanker. In veel gevallen is daarbij geen sprake van een volledige genezing maar meer van het tijdelijk tot staan brengen van de tumorgroei. Ook bij de behandeling van ovarium(eierstok)kanker worden zeer positieve resultaten bereikt. Bij 60-70 procent van de behandelde vrouwen wordt cisplatin succesvol toegepast. Het percentage dat volledig geneest ligt echter lager. Cisplatina-therapie werkt in aanzienlijk mindere mate ook bij vormen van hoofd- en nekkanker en een vorm van niet-kleincellige longkanker. Uit onderzoek zijn er voorts aanwijzingen dat de stof zich veel minder bindt met bijvoorbeeld het DNA van de hersencellen. Behalve met DNA reageert cisplatin ook met RNA en eiwitten. Voor het hier beschreven onderzoek is dit echter minder relevant.

Sinds 1980 werkt de biochemicus mevr.dr.ir. Anne Marie J. Fichtinger-Schepman aan het cisplatin-onderzoek. Aanvankelijk maakte zij als postdoctoraal onderzoeker deel uit van de groep van prof.dr. J. Reedijk, hoogleraar anorganische chemie aan de Rijksuniversiteit Leiden. Deze groep werkte samen met het MBL waarnaar mevr. Fichtinger in 1983 overstapte. Als hoofd van de Werkgroep Cisplatin voerde zij hier het onderzoek uit in samenwerking met MBL-collega dr.ir. P.H.M. Lohman, die onlangs voor een hoogleraarschap overstapte naar de RU Leiden.

De eerste jaren van het onderzoek werden besteed aan het opzetten van een methode om in principe alles wat er gebeurt in het DNA te kunnen detecteren. Dat betekende het identificeren en meten van alle soorten adducten die onder invloed van cisplatin optreden. De onderzoekers gingen daarbij als volgt te werk. Ze behandelden gezuiverd DNA dat afkomstig was van zaalsperma met cisplatin. Om dit DNA te kunnen bestuderen werd het erfelijk materiaal met behulp van enzymen in kleine stukjes gebroken. Deze deeltjes werden gescheiden op grond van ladingsverschillen. Scheiding in fracties gebeurde op een zgn. chromatografiekolom waardoor de bouwstenen van het DNA waaraan geen platina gebonden

is, kon worden gescheiden van de brokstukjes die wel platina gebonden hebben. De afbraakprodukten die platina bevatten, kunnen worden aangetoond door middel van atomaire absorptie spectroscopie (AAS). Dit levert een aantal pieken op, waaruit kan worden afgeleid waar het platina zich in het DNA bevindt.

Uit het onderzoek dat het TNO-instituut samen met de Rijksuniversiteit Leiden uitvoerde, bleek al in 1982 dat het therapeutisch cisplatin zich vooral bindt aan de base guanine, één van de vier bouwstenen van het DNA. Met het vervolmaken van deze technieken werd drie jaar later aangetoond dat cisplatin zich op vier manieren bindt met twee van de vier basen in DNA. Die tweede base is adenine. Het hoofddadduct heet voluit di-nucleotide Pt-GG, hetgeen neerkomt op platina gebonden aan twee guanines (zie de tekening van de verschillende verbindingen waarin de letter G staat voor guanine). In volgorde van de mate waarin cisplatin zich bindt, zien de drie andere verbindingen er als volgt uit: Pt-AG, G-Pt-G en Pt-G. Elke binding met de basen cytosine en thymine ontbreekt dus. In 1985 werd het onderzoek naar de plaatsen waar DNA-modificatie optreedt afgerond.

Specifieke antilichamen

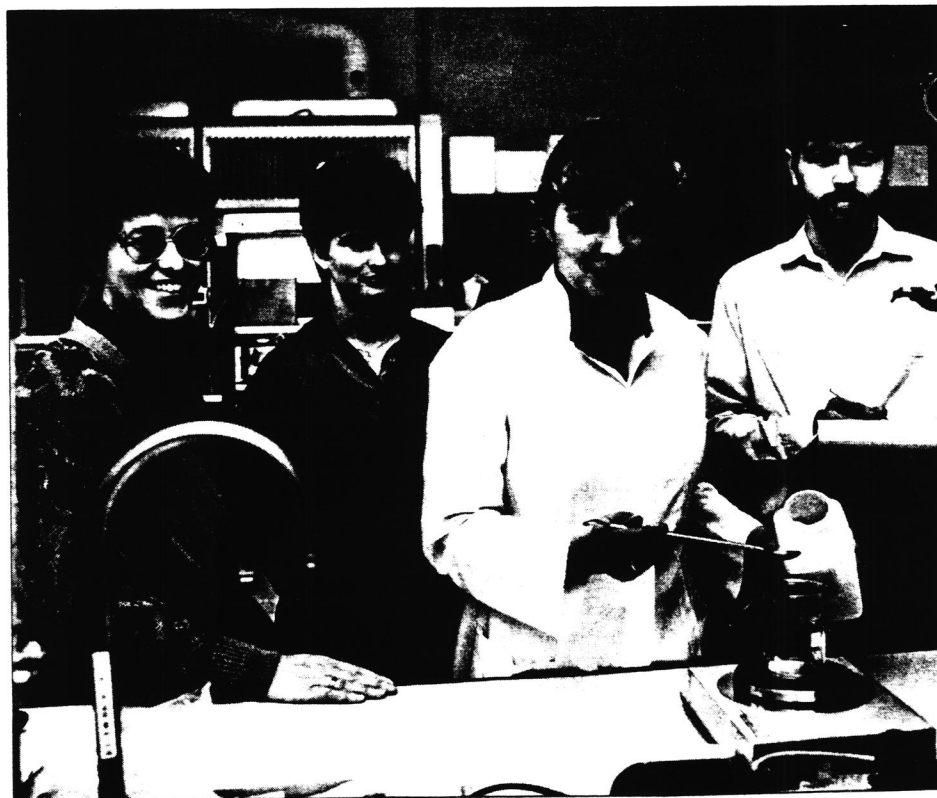
Bij het onderzoek aan het DNA in oplossing werd met de AAS-techniek al een indruk gekregen van de plaatsen waar en

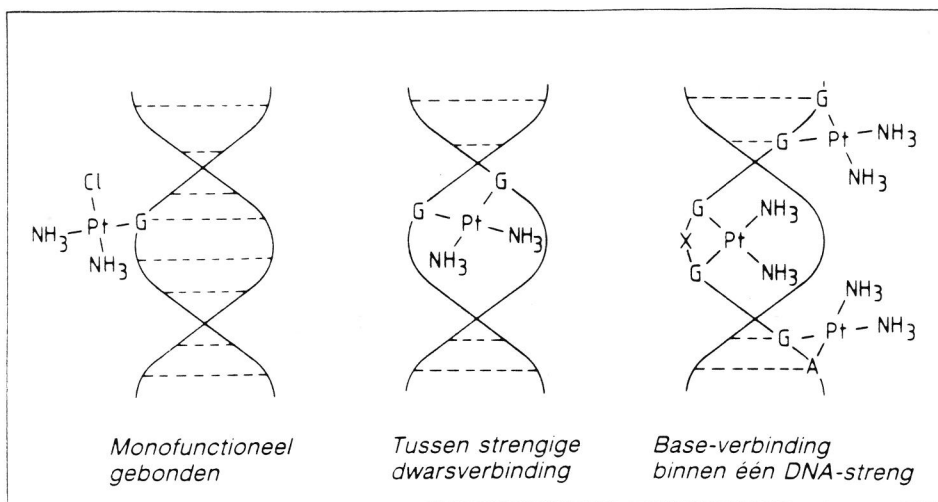
de mate waarin in het DNA adductvorming optreedt. De volgende stap in het onderzoek was het ontwikkelen van een methode om in de witte bloedcellen van patiënten nauwkeurig de aanwezigheid van de vier soorten en de hoeveelheid DNA-adducten te kunnen meten die onder invloed van cisplatin ontstaan. Voor deze kwantitatieve meting van het gemiddeld DNA is de AAS-meting te ongevoelig. Eveneens bij TNO in konijnen opgewekte specifieke antilichamen zijn daar wel toe in staat. Zo werden drie antisera geproduceerd die samen de eerder in-vitro in DNA gevonden vier platina-adductsoorten met grote gevoeligheid kunnen herkennen, ook in celmateriaal waarin ze in-vivo zijn ontstaan. Het Medisch Biologisch Laboratorium is hiermee het enige onderzoeksinstituut ter wereld dat met een zo gevoelige detectiemethode uiterst minieme hoeveelheden van alle vier de cisplatin-adducten aan DNA op kan opsporen en meten. De bereikte detectiegevoeligheid is 500 tot 1000 maal groter dan met AAS.

Kwantitatief onderzoek

Nadat de afgelopen jaren de benodigde methoden en antilichamen zijn ontwikkeld, is nu voor de onderzoekers het moment gekomen om zich te richten op het eigenlijke doel van het onderzoek: nagaan of en in hoeverre de mate van cisplatin-adductvorming aan het DNA van witte bloedcellen een maat kan vormen voor de wijze waarop een tumor op deze chemotherapie zal reageren. Anne Marie Fichtinger: 'Omdat de anti-tumorwerking berust op de reactie met het DNA willen we gaan kijken hoeveel van die verschil-

Het 'platinateam', v.l.n.r. dr. ir. Anne Marie Fichtinger-Schepman, Helma van Dijk-Knijnenburg, ing. Saskia Visser en Gijsbert van der Hout





lende adducten er worden gevormd. Daarnaast willen we opsporen hoeveel van die adducten er na behandeling blijven zitten om hun anti-tumorwerking uit te oefenen. Het is namelijk mogelijk dat het celmechanisme het DNA-adduct, dat in feite een DNA-beschadiging is, herstelt waarna het effect van de cisplatin behandeling natuurlijk gering is. Daarom willen we ook na langere periodes nog metingen doen aan het bloed van behandelde mensen. Maar ook de eventuele lange termijn effecten van achterblijvende adducten hebben onze interesse.

Erg nieuwsgierig zijn de onderzoekers ook naar het antwoord op de vraag, welke van de vier door cisplatin veroorzaakte DNA-adducten het belangrijkste is voor de tumorbestrijding. Daarnaast weet de onderzoekwereld nog steeds niet waarom cisplatin -dat met alle cellen in het lichaam op min of meer dezelfde wijze reageert- nu juist de tumorcellen doodt. Dr. Fichtinger: 'Een benadering is dat adductvorming vooral zijn invloed heeft op delende cellen. Rustende cellen en cellen die zich nauwelijks delen vormen wel adducten maar lijden daar niet onder. Cellen met een sterk delingsproces, waaronder kankercellen, komen juist in moeilijkheden bij het dupliceren. Daarom wordt beenmerg vaak door cytostatica aangetast. Beenmerg bevat veel snel delende cellen'. De TNO-onderzoeker vraagt zich verder af waarom cisplatin de ene vorm van kanker effectief bestrijdt en de andere vorm weer niet. 'Heeft dat wellicht te maken met de wijze waarop cisplatin wordt toegediend of heeft het te maken met de eigenschappen van die specifieke tumorcel?'

Een probleem apart vormt de resistentie tegen cisplatin die na verloop van tijd in tumoren kan optreden. In de praktijk blijkt dat behandelingskuren aanvankelijk zeer succesvol van start gaan maar na verloop van tijd mislukken door resistentie. 'Mijns inziens houdt dat verband met de wijze waarop de cel het platina in zijn DNA verwerkt. Naast meer inzicht in de wijze waarop die resistentie wordt veroorzaakt is het gelijktijdig nodig dat er stoffen

worden ontwikkeld die resistentie helpen voorkomen. Samen met het Rijksinstituut voor Volksgezondheid en Milieuhygiëne en de afdeling Oncologie van het Academisch Ziekenhuis Utrecht voeren wij proefdieronderzoek uit waarbij we ratten gebruiken die tumoren hebben die aanvankelijk gevoelig waren voor cisplatin-behandeling maar die later daartegen resistent werden. Tegelijkertijd voeren we in-vivo-onderzoek uit naar de per orgaan verschillende gevoeligheid voor cisplatin. Hier hebben we al heel wat verschillen gemeten.'

In-vivo-onderzoek

Met de expertise en detectiemethoden voorhanden is het MBL in de zomer van 1985 gestart met in-vivo-onderzoek. In samenwerking met prof.dr. A.T. Oostrom, hoogleraar aan het universiteitsziekenhuis van Antwerpen, die toen verbonden was aan de afdeling Klinische Oncologie van de Rijksuniversiteit Leiden, zijn aan bloedmonsters van kankerpatiënten metingen verricht naar adductvorming in het DNA van de witte bloedcellen. Omstreeks diezelfde periode publiceerde in de Verenigde Staten een groep onderzoekers onder leiding van de aan het National Institute of Health verbonden arts, dr. M.C. Poirier, zijn bevindingen op dit gebied. De Amerikanen kwamen tot conclusie dat hoe meer adducten men op de ochtend van de vijfde en laatste behandelingsdag van de kuur in het bloed van de patiënt vindt, hoe groter de kans op een succesvolle behandeling is. Anne Marie Fichtinger die regelmatig contact heeft met de Amerikaanse onderzoeker, zegt hierover: 'Poirier was daarmee de eerste die dit verband legde. Als wetenschappelijke gegevens zijn die relaties erg bruikbaar, maar in de praktijk kun je er niet goed mee uit de voeten. Het gaat hier namelijk om metingen bij de behandeling van testiskanker en ovariumkanker. Dat zijn nu net de twee vormen van kanker die een heel goede respons hebben op een cisplatin behandeling. Een voorspellende test opzetten op basis van de behandeling waarvan je weet dat hij in zo'n tachtig tot negentig procent van de gevallen

succesvol is, vind ik niet zo zinvol. Een behandeling waarbij je bij negentig procent van de patiënten succes hebt daar ben je immers al erg blij mee! Wat wij bij het Medisch Biologisch Laboratorium daarom willen gaan doen, is het onderzoeken van de relatie tussen de hoeveelheid adducten in het bloed en de respons daarop van tumortypen dat maar voor twintig procent een goede respons geeft. Het wordt namelijk pas echt interessant als we de respons kunnen voorspellen van een cisplatin-behandeling waarbij slechts een enkele patiënt baat zal hebben.'

Met het patiëntenonderzoek heeft het MBL verleden jaar aangetoond dat een patiënt die in-vivo weinig of veel adducten vormt ook in-vitro weinig of veel adducten vormt. Het is van belang dat men zich realiseert dat nog niet is aangetoond dat een patiënt die weinig adducten vormt ook slecht reageert op een behandeling met cisplatin. De totnut toe onderzochte ovarium en testiskankerpatiënten hadden allen meetbare hoeveelheden adducten in hun bloed maar reageerden ook allemaal positief op de behandeling. Anne Marie Fichtinger: 'Dat is natuurlijk fijn voor de patiënten maar in zekere zin beroerd voor de onderzoeker. Het ontbreken van negatief reagerende patiënten maakt het bij voorbaat al onmogelijk een correlatie aan te tonen tussen een behandelingsresultaat en een eventuele lage adductvorming.'

Zoals aan het begin van dit artikel al even is aangestipt is het effect van een cisplatin-behandeling niet alleen per tumorsoort verschillend maar zijn er ook per individuele patiënt sterke verschillen. Dat blijkt uit de uiteenlopende resultaten behaald bij patiënten met dezelfde tumorsoorten die werden behandeld met dezelfde hoeveelheden cisplatin. Dr. Fichtinger: 'We mogen er best van uitgaan dat een tumorcel, ondanks het feit dat het een ontaarde cel is, best nog wel wat eigenschappen zal hebben die specifiek zijn voor die patiënt. Je hebt naar mijn mening zowel te maken met per individuele patiënt verschillende celherstelmechanismen als met individuele eigenschappen van een tumor. Die verschillen krijg je dan weerspiegeld in het respons op de behandeling dat je meet in het bloed. Individuele begeleiding bij de behandeling, daar moeten we naartoe. Een begeleiding die leidt tot een optimalisering of het afzien van de behandeling met chemotherapie. Optimalisatie betekent zoeken naar de meest geschikte dosis en toedieningsschema en de gewenste combinatie met andere stoffen of bestraling. Tot het niet toepassen van de behandeling dient te worden besloten daar waar op basis van een voorspelbaar uitblijven van een positieve respons al bij voorbaat kan worden vastgesteld dat zo'n belastende behandeling zinloos is.'

