

Univerzita Karlova
Přírodovědecká fakulta

Studijní program: Biologie (B1501)

Studijní obor: BBI (1501R001)



Tereza Drozdová

**Průtoková cytometrie pro *in vitro* testy chemosenzitivity a rezistence nádorů
(CSRA)**

**Tumor *in vitro* chemosensitivity and resistance assays (CSRA) using flow
cytometry**

Typ závěrečné práce:

Bakalářská práce

Vedoucí práce:

RNDr. Karel Drbal, Ph.D.

Praha, 2019

Děkuji svému školiteli RNDr. Karlu Drbalovi, Ph.D. za ochotu, odborné konzultace a rady ohledně vypracování této bakalářské práce. Dále bych chtěla poděkovat své rodině a přátelům za jejich podporu a trpělivost.

Prohlašuji, že jsem tuto bakalářskou práci vypracovala sama podle níže uvedené literatury a na základě konzultací se svým školitelem.

Praha, 1. 1. 2019

.....

Tereza Drozdová

Seznam zkratek

ASCO	Americká společnost klinické onkologii	American Society of Clinical Oncology
ATP	adenosin trifosfát	Adenosine Triphosphate
BCBSA	asociace Blue Cross Blue Shield	Blue Cross and Blue Shield Association
CCS	kapilární klonovací systém	Capillary Cloning System
CD-DST	test citlivosti na léky zabudováním kultury do kolagenové gelové kapky	Collagen gel droplet-embedded culture-drug sensitivity test
CSRA	test chemosenzitivity a rezistence	Chemotherapy Sensitivity and Resistance assay
CTR	test rezistence na chemoterapeutika	Chemotherapy Resistance test
CTC	nádorové buňky cirkulující v krvi	Circulating tumor cells
DiSC	test pomocí diferenciálního barvení	Differential Staining Cytotoxicity assay
EC	účinná koncentrace	effective concentration
ED	účinná dávka	effective dose
EDRA	test extrémní lékové rezistence	Extreme Drug Resistance assay
FCCA	průtoková cytometrie pro CSRA	Flow Cytometry Chemosensitivity assay
FCM	průtoková cytometrie	flow cytometry
FNAB	biopsie tenkou jehlou	fine needle aspiration biopsy
HDRA	test lékové odpovědi na histokulturách	Histoculture Drug Response assay
HTCA	test lidských nádorových kolonií	Human Tumor Colony assay
IC	inhibiční koncentrace	inhibitory concentration
MTT	methyl thiazoyl-difeny-tetrazolium bromid	methyl thiazoyl-diphenyl-tetrazolium bromide
NCCN		National Comprehensive Cancer Network
PDX	xentransplantány odvozené od pacienta	Patient Derived Xenografts
ROC		Receiver Operating Characteristic
SDI	inhibice sukcinát dehydrogenázy	Succinate Dehydrogenase inhibition
SRCA	subrenální pouzdro	Subrenal Capsule assay
TEM	triethylen melamin	triethylene melamine
TIA	test inkorporace tymidinu	Thymidine Incorporation assay

Abstrakt

In vitro testy chemosenzitivity a rezistence („Chemosensitivity and resistance assay“ - CSRA) nádorů stanovují citlivost konkrétního nádoru k daným léčebným postupům v experimentálním uspořádání. Heterogenní populace nádorových buněk je *ex vivo* krátkodobě vystavená působení různých schválených léčiv a jejich kombinací. Následně je stanoven vliv jednotlivých léků na životnost konkrétních nádorových buněk, podle níž je možné zvolit přesnou kombinaci léčiv pro každého pacienta individuálně. Tento přístup je příkladem personalizované medicíny, která se zabývá přizpůsobení diagnostických postupů a léčby konkrétnímu pacientovi, a tím se snaží zamezit selhání léčby u pacientů, u kterých nefungují statisticky nejúčinnější léčebné postupy, založené na randomizovaných klinických testech.

Množství určování živých buněk pomocí průtokové cytometrie poskytuje velice přesnou statistiku pro multiparametrickou analýzu. Nezbytnou podmínkou je ovšem přítomnost disociovaných nádorových buněk v jednobuněčné suspenzi. Tím se tato metoda liší od klonovacích metod, kdy kolonie nádorových buněk rostou na agarových médiích, nebo od histokultur, které se vyznačují trojrozměrnou kultivací tkáně. Následně také můžeme rozřadit buňky podle jejich předem definovaných vlastností pro jejich další funkční testování.

Výhodou těchto testů je jejich rychlost a relativně nízké náklady, což umožňuje přizpůsobit léčbu jejich výsledkům ve velmi krátkém čase po odebrání nádoru. Využití průtokové cytometrie řeší i problémy ovlivňující variabilitu výsledků testů způsobené vysokou mutabilitou a heterogenitou nádorů jak v rámci populace, tak i u jednoho konkrétního pacienta, u kterého dochází k mikroevoluci nádoru v průběhu onemocnění. Heterogenita jednotlivých nádorů se mění v celém průběhu léčby.

Z provedených studií vyplývá, že určení rezistence nádoru vůči konkrétnímu léku lze provést až se 100% přesností. Citlivost nádoru lze stanovit už s poněkud nižší přesností, maximálně 80%. Přesto stále nejsou CSRA zavedené do běžné klinické praxe, protože podle onkologických asociací neexistují v prozkoumané literatuře jednoznačné důvody, proč podpořit zavedení CSRA do klinické praxe. Tato literatura ovšem nezahrnuje studie prováděné pomocí průtokové cytometrie. Řada amerických i evropských onkologů se k závěru onkologických asociací nepřiklání.

Klíčová slova

test *in vitro*, chemosenzitivita, rezistence nádorů, CSRA, průtoková cytometrie, nádor, heterogenita nádoru, mikroevoluce, testování *ex vivo*, personalizovaná medicína, klinické testy

Abstract

In vitro chemosensitivity and resistance assay determine the sensitivity of a specific tumor after a specific treatment administration in an experimental setup. A heterogeneous population of cancer cells is exposed to various approved anticancer drugs in short-term *ex vivo* and their combination thereof. The effect of each drug is then determined based on the viability of specific tumor cells allowing for individual patient treatment using a precise combination of drugs. This approach is an example of the personalized medicine principle, which is focusing on the adjustment of diagnostic procedures and treatment of a specific patient. Therefore, its goal is to avoid treatment failure in patients with poor response to the statistically most effective treatments based on randomized clinical trials.

The number of viable cells determined by the flow cytometry provides very accurate statistics for multiparametric analysis. A necessary prerequisite is the presence of dissociated cancer cells in a single cell suspension. This is different from cloning methods, where tumor colonies grow on agar media, or from histocultures, which are specific with its three-dimensional tissue cultivation. We can also sort cells from suspension based on their pre-defined attributes for their subsequent functional testing.

The advantage of CSRA assays is the speed and relatively low cost, which allows us to adjust the treatment according to the result in a very short period of time after tumor excision. The use of flow cytometry is beneficial in cases where problems arise due to CSRA reset variability caused by high tumor mutability and heterogeneity not only in the large cohort but also within a given patient where cancer microevolution occurs in the course of the disease. A heterogeneity of individual tumors is being constantly changed throughout the course of treatment.

Conducted studies prove that the cancer resistance detection against a specific anticancer drug can achieve 100% accuracy. Cancer sensitivity can be determined with rather lower accuracy at 80% maximum. According to oncological associations, CSRA tests are still not implemented in routine clinical practice, due to lack of supportive evidence in the metaanalysis of published data. However, this literature does not include flow cytometric studies. Despite the conclusions of oncological associations, many US- and EU- based oncologists do not fully agree.

Key words

in vitro assay, chemosensitivity, tumor resistance, CSRA, flow cytometry, tumor, tumor heterogeneity, microevolution, *ex vivo* testing, personalized medicine, clinical trial

Osnova

1.	Úvod	1
2.	Úvod do statistiky	5
2.1.	Statistické hypotézy a p -hodnota (signifikance testu)	5
2.2.	Test dobré shody (Chí-kvadrát test) a Fisherův exaktní test	5
2.3.	Střední hodnoty koncentrací	6
2.4.	Senzitivita, specifita a prediktivní hodnota a úspěšnost testu	6
2.5.	ROC křivka („Receiver Operating Characteristic“)	6
3.	Úvod do historie	7
3.1.	Počátky <i>in vitro</i> testů chemosenzitivity	7
3.2.	Počátky využití <i>in vitro</i> CSRA pro nádorovou tkáň	7
3.3.	Počátky průtokové cytometrie	10
3.4.	Počátky používání průtokové cytometrie pro testy chemosenzitivity a rezistence <i>in vitro</i> (CSRA)	10
4.	Přehled CSRA testů pro nádorová onemocnění	12
4.1.	Princip CSRA metody	12
4.2.	Využití CSRA testů	13
4.3.	Proč používat CSRA testy?	13
4.4.	Proč nepoužívat CSRA testy?	14
4.4.1.	Rozdílnost senzitivity určené <i>in vitro</i> a <i>in vivo</i>	14
4.4.2.	Nedostatečné výsledky a neobjektivnost CSRA studií	15
4.4.3.	Standardizace CSRA studií	15
4.5.	Metodické přístupy	16
4.5.1.	Metody prováděné <i>in vivo</i>	16
4.5.2.	Metody prováděné <i>ex vivo</i>	16
4.5.3.	Metody prováděné <i>in vitro</i>	16
5.	FCCA	20
5.1.	Metodika provedení chemosenzitivních testů pomocí průtokové cytometrie	20
5.1.1.	Postup	21
6.	Cytometrie	23
6.1.	Statická cytometrie	23
6.2.	Průtoková cytometrie	23
6.2.1.	Průtokový cytometr	23
6.2.2.	Princip metody	24
6.2.3.	Analýza dat	24

6.2.4.	Hmotnostní cytometrie	24
7.	Rešerše výsledků studií CSRA	25
7.1.	ASCO- rešerše studií vydaných mezi lety 1966 a 2010	25
7.2.	Rešerše studií mimo průtokovou cytometrii vydaných mezi lety 2010-2017	27
7.3.	Rešerše studií pomocí průtokové cytometrie vydaných mezi lety 2010-2017	31
8.	Závěr.....	34
9.	Seznam použité literatury	35

1. Úvod

Úspěch chemoterapeutické léčby je do značné míry ovlivněn řadou faktorů, jako je například stupeň pokročilosti onemocnění, histologický typ nádoru, jeho vaskularizace a heterogenita. Dále je ovlivněn rezistencí nádorových buněk vůči podávaným lékům, které často při kombinované léčbě patří do stejné kategorie. V dnešní době není konkrétní chemoterapeutická léčba založená na individuální odpovědi pacienta, ale na výsledcích randomizovaných klinických studií, které průměrují statisticky významný účinek léku na průměrného pacienta. Takové zobecňování výsledků klinických studií přirozeně vede k zanedbávání individuální odpovědi každého pacienta na léčbu, včetně klonální odlišnosti nádorů. Cílem provádění chemosenzitivních testů je proto snížit riziko neúčinné léčby, nežádoucích účinků a zlepšit výsledky léčby pomocí výběru vhodných léků v odpovídající dávce a případně i kombinaci, která bude zvolena přesně podle potřeb konkrétního pacienta, respektive specifického nádoru v čase a místě (Volm and Efferth, 2015).

Na počátku padesátých let začala vznikat nová vědní disciplína, farmakogenetika, která se zabývala pozorováním variabilních reakcí na léky a řešením jejich příčin. Komercializací tohoto výzkumu vznikl obor takzvané personalizované medicíny. Tento individuální přístup k léčbě každého pacienta by měl rozšířit tradiční přístupy k léčbě a klade si za cíl přizpůsobit léčbu pacientovi tak, aby zlepšil výběr léků a léčebných postupů, a tím zajistil co nejlepší reakci na podanou léčbu. Zároveň by měl minimalizovat škodlivé vedlejší účinky a snížit náklady za neúspěšnou léčbu. Každá léčba je ovlivněna mnoha faktory, jako jsou věk pacienta, jeho stravovací návyky a metabolismus, celkový zdravotní stav, životní styl, vliv prostředí, genetické a epigenetické faktory a zároveň prováděná terapie. Dále je třeba zohlednit vliv geografických a etnických odlišností mezi různými skupinami populace. Všechny tyto faktory ovlivňují reakci na léčbu a zapříčiňují velkou část variability reakcí na podané léky. Personalizovaná medicína zatím ale není součástí lékařské praxe. Zaměřuje se zejména na skupiny pacientů, kteří nereagují na podané léky, a pro které jsou tradiční lékařské postupy nefunkční (Vogenberg et al., 2010).

Díky chemosenzitivním testům *in vitro* lze částečně předpovědět reakci nádoru na podaná chemoterapeutika *in vivo*. Tato reakce se často vymyká statistickým datům z randomizovaných studií, podle kterých je v dnešní době volen vhodný lék. Podaná chemoterapeutika jsou vybírána podle toho, které léky jsou statisticky nejúčinnější pro konkrétní typ nádoru. Například rakovina močového měchýře a močových cest je standardně léčená kombinací gemcitabinu a cisplatinu, nebo cisplatinu a adriamycinu. Gemcitabin a cisplatinu se také používají k léčbě rakoviny děložního čípku, nemalobuněčného karcinomu plic, vaječnicků nebo slinivky, u které se někdy cisplatinu nahrazuje oxaliplatinou. Karboplatina v kombinaci s taxolem se používá převážně k léčbě rakoviny vaječnicků a nemalobuněčného karcinomu plic. Malobuněčný karcinom plic se léčí kombinací doxorubicin hydrochloridu, etoposidu a topotecanu. Na rakovinu prostaty se nejčastěji používá docetaxel

v kombinaci s cisplatinou a fluorouracilem. Rakovina tlustého střeva a konečníku bývá léčená kombinací fluorouracilu a leucovorin kalcia, ke které je ještě někdy přidávána oxaliplatina, nebo irinotecan hydrochlorid. Karcinom prsu se léčí převážně adriamycinem v kombinaci s cyklofosfamidem, ke které se v některých případech přidává paclitaxel nebo fluorouracil (National Cancer Institute, 2018).

Tyto kombinace se podávají nejčastěji proti uvedeným typům nádorů. Jenže stejný histologický typ nádoru může vykazovat širokou škálu odpovědí na podané léky. Je dokázáno, že rezistence nádoru vůči léku nesouvisí s typem nádoru. To vyplývá z různě vysoké heterogenity nádoru, jak v rámci populace, tak i v rámci jedince (Salmon et al., 1978). Proto by bylo vhodné přistupovat ke každému pacientovi individuálně a volit účinné léky právě na základě CSRA testů.

Podle studií publikovaných za posledních 40 let a výsledků testů více než 15 tisíc pacientů s nádorovým onemocněním je jednoznačně prokazatelné, že s 80-100% úspěšností lze předpovědět rezistenci vůči lékům. Citlivost nádoru na daný lék je možné předpovědět pouze s 50-80% úspěšností (Volm and Efferth, 2015). Hlavním důvodem rozdílnosti výše zmíněných úspěšností je rozdílnost chování nádorových buněk v podmínkách *in vitro* oproti podmínkám *in vivo*.

Predikce citlivosti nádorových buněk k lékům je tím složitější, čím vyšší heterogenitu nádor vykazuje. Pokud je určitá část nádoru citlivá na konkrétní lék, jiná část nádoru může být k tomuto léku zcela rezistentní. Heterogenita nádoru se určuje různými metodami v závislosti na tom, z jakého hlediska je zkoumaná. Morfologická heterogenita je také zjišťovaná *ex vivo* pomocí 3D nádorových kultur. Molekuly DNA jsou označeny pomocí analogů nukleotidů a poté jsou pomocí fluorescenčních mikroskopů pozorovány změny v syntéze a replikaci DNA. Heterogenita fenotypu je určena pomocí imunobarvení, což se využívá pro prediktivní testy a určení léčby. Velmi důležitou metodou je také sekvenování jednotlivých buněk z hlediska genomu, transkriptomu a epigenomu. Pomocí sekvence transkriptomu lze určit rozdílné subpopulace nádorových buněk v nádoru. Díky sekvenování může být určena genetická diverzita, která má vliv na rezistenci vůči lékům. Další metodou určování heterogenity vhodnou pro objasnění lékové rezistence je analýza proteomu pomocí Western blotu (Qian et al., 2017).

Citlivost buněk k podaným lékům se určuje na základě detekce změn kinetiky proliferace nádorových buněk, odchylek buněčného cyklu nebo snížené životnosti buněk projevující se ztrátou integrity plazmatické membrány. Konkrétním projevem je například akumulace senzitivních buněk v určité fázi buněčného cyklu (G2+M, S), změny funkce některých proteinů nebo změny barvitelnosti buněk.

První zmínky o měření úbytku živých buněk po jejich vystavení cytotoxickým látkám laboratorními *ex vivo* testy jsou více než sto let staré. Pochází z roku 1917, kdy Pappenheimer využil tropanovou modř k detekci neživých lymfocytů po tom, co vystavil čerstvé lymfocyty brzlíku toxickým látkám (Pappenheimer, 1917). Tato detekce funguje na principu neschopnosti mrtvých

buněk vypumpovat barvivo ven z buněk pomocí ABC transportérů. O metodě *in vitro* testů lidských nádorových buněk pomocí průtokové cytometrie („flow cytometry“ – FCM) se začalo mluvit až v roce 1978, kdy byla zkoumaná ploidie a proliferační vlastnosti lidských pevných nádorů pomocí cytometrie (Barlogie et al., 1978; Engelholm et al., 1983).

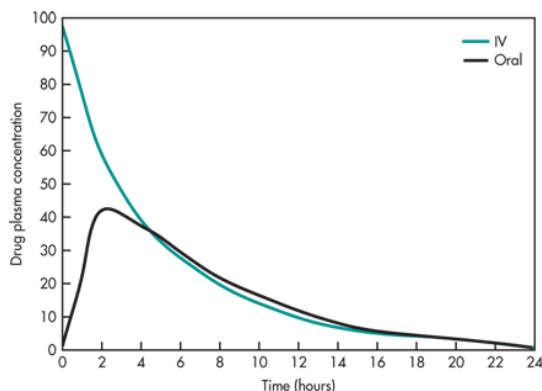
Průtoková cytometrie je předurčená k studiím, jako je právě CSRA, a je i hojně využívána v klinické praxi převážně v oboru imunologie a hematologie. Pro CSRA testy je ale dlouhodobě ignorovaná, a proto není k dispozici dostatečné množství studií na toto téma.

Cytometrie jako taková je proces, při kterém jsou měřené fyzikální nebo chemické vlastnosti jednotlivých buněk o zhruba stejné velikosti v rozmezí 1-30 mikrometrů. V průtokové cytometrii protékají buňky v suspenzi skrz celou průtokovou cytometru, kde se měří vlastnosti buněk pomocí detekce rozptylu světla a fluorescence při průchodu částice laserovým paprskem. Jednotlivé buňky lze následně i tříditi podle předem zvolených charakteristik. Pomocí cytometrie můžeme určit životnost buněk, jejich velikost, počet, tvar, strukturu buňky, schopnost proliferace, změnu fenotypu, fázi buněčného cyklu, celkové množství DNA, RNA i proteinů, nebo zda se v ní nachází určité specifické proteiny či jak interagují jednotlivé buněčné komponenty. Dnešní komerční průtokové cytometry měří rychlostí až 50 000 buněk za vteřinu (Shapiro, 2005).

Experimentální provádění CSRA testů je metoda, díky které je možné aplikovat výsledky individuálních testů rezistence nebo citlivosti nádorových buněk na schválené vybrané léky, na *in vivo* léčbu pacientů s nádorovým onemocněním, konkrétně na určení vhodných chemoterapeutik nebo jejich kombinací pro nádorové onemocnění určitého pacienta (Medenica and Powell, 1995). Testy chemosenzitivity by ideálně měly sloužit k určení unikátní kombinace účinných chemoterapeutik na základě individuální *in vitro* analýzy konkrétního nádoru (Garozzo et al., 1989). Vzhledem k vnitřní nádorové heterogenitě je vhodné určit unikátní kombinaci léků přesně podle charakteru konkrétního nádoru (Anchang et al., 2018). Teoreticky by měly CSRA testy umožnit klinickým lékařům vybrat tu nejúčinnější terapii a ovlivnit způsob léčby pacienta hned na jejím počátku.

Dle výsledků chemosenzitivních testů by měla být zvolena vhodná kombinace léků, u kterých byla prokázána nejvyšší účinnost. Tyto léky by pak měly být podávány pacientovi v rámci kombinované léčby (Medenica and Powell, 1995).

Následující graf (Shargel and Yu, 2015) zobrazuje koncentraci dostupného léku v těle pacienta v průběhu času podle způsobu podání léku. Jedná se o takzvanou biodostupnost („bioavailability“), která určuje aktuální část dávky podaného léku, která se v daném čase vyskytuje v oběhovém systému pacienta. Biodostupnost je u nitrožilně podaných léků 100%. U orálně podaných léků je biodostupnost nižší kvůli neúplné absorpci a liší se individuálně mezi jednotlivými pacienty podle jejich metabolismu.



Obr. 1.: Biodostupnost léku podaného orálně (Oral) a intravenózně (IV) v těle pacienta v průběhu času. (Shargel and Yu, 2015)

Existuje mnoho metod, kterými lze provádět CSRA testy. Jedním typem je klonovací metoda (např. „human tumor colony assay“ - HTCA), při které se nechávají nádorové buňky růst na agarovém médiu ve formě kolonií. Poté se porovnává velikost kolonií v kontrolních, cytostatikem neovlivněných kulturách, s velikostí kolonií v kulturách ovlivněných. Nevýhodou této metody je potřeba velkého množství nádorových elementů. Naopak metody neklonovací jsou založeny na principu zjišťování poměru mrtvých a živých buněk ve vzorku. Detekce je většinou založena na poškození membránové integrity buněk, které přišly do kontaktu s cytostatikem, nebo na změně jejich metabolismu (např. „methyl thiazoyl-diphenyl-tetrazolium bromide“ - MTT). Dalším typem jsou histokultury, jejichž výhodou je možnost zachovat přirozenou 3D architekturu kultury a tím zachovat i její proliferační aktivitu. Tkáně jsou totiž pěstované v trojrozměrných kulturách, které napodobují extracelulární matrix a tím se více blíží *in vivo* podmínkám (Chumchalová and Kovařík, 2000). Další možností je provádět testy v *ex vivo* prostředí. Například PDX („patient derived xenografts“) využívají imunodeficientní myši jako modelového organismu podrobeného léčbě. Využívají se k vytvoření vhodného prostředí pro růst, sledování a hodnocení léčby rakoviny (Lai et al., 2017).

CSRA testy na principu průtokové cytometrie se provádí ze suspenze mechanicky nebo enzymaticky disociovaných nádorových buněk. Ta je po dobu 24 - 48 hodin inkubována s léky, které mají cytostatické účinky. Tyto léky, které se podávají v koncentracích pohybujících se mezi 0,1 až 20 $\mu\text{g/ml}$ (Dendy et al., 1970), vyvolávají změny životnosti a odchylky buněčného cyklu, které jsou monitorované počítačovou analýzou dat průtokové cytometrie (Chumchalová and Kovařík, 2000; Galderisi et al., 2009).

Americká společnost klinické onkologie („American Society of Clinical Oncology“ - ASCO), která pravidelně provádí analýzy výzkumů CSRA, stále nedoporučuje využívat CSRA pro léčbu pacientů s rakovinou mimo klinické studie, protože nebyl prokázáný signifikantní rozdíl mezi úspěšností standardní léčby a léčby zvolené pomocí CSRA testů (Burstein et al., 2011). CSRA se tedy v klinické praxi běžně nepoužívají. Existuje ale několik soukromých laboratoří, které provádějí testy CSRA na zakázku. V některých státech se CSRA testy používají pouze v momentě, kdy existuje více možností standardní léčby.

Doktor Ian Cree, který je ředitelem výzkumného onkologického centra nemocnice Queen Alexandra v Portsmouth v UK, provedl prospektivní randomizovanou klinickou studii, ve které porovnával výsledky léčby pomocí chemoterapie vybrané lékařem s výsledky léčby zvolené pomocí testu ATP bioluminiscence („Adenosine Triphosphate bioluminiscence“) u pacientek s karcinomem vaječnicků. Tuto studii předložil na setkání ASCO v roce 2005 na Floridě. Výsledky potvrdily vyšší účinek léčby řízené dle výsledků CSRA. Gregory D Pawelski ve svém článku vydaném téhož roku uvádí, že v lékařské literatuře existuje více než 40 publikací, které popisují vzájemné vztahy mezi výsledky CSRA testů a výsledky klinické léčby u více než 2 000 pacientů. Podle něj jsou ve všech těchto studiích patrné lepší výsledky léčby u pacientů, kteří byli léčeni podle výsledku CSRA testu. Tito pacienti vykazovali vyšší míru odpovědi na léčbu a delší dobu přežití. Naopak pacienti, kteří byli léčeni pomocí léků, které se v CSRA testech jeví jako rezistentní, vykazovali nižší míru odpovědi, než zbytek skupiny (Pawelski, 2005). Většina prozkoumaných studií v této bakalářské práci prokazuje větší úspěšnost léčby za pomoci CSRA testů.

2. Úvod do statistiky

2.1. Statistické hypotézy a p -hodnota (signifikance testu)

Při statistickém vyhodnocování pokusu obvykle testujeme nějakou nulovou hypotézu H_0 , která je přesným opakem toho, co chceme dokázat, a kterou chceme následně zamítnout. Tento postup se používá, protože shoda dat s hypotézou ještě nepotvrzuje platnost hypotézy. V případě, že se data s hypotézou neshodují, lze hypotézu s jistotou zamítnout. Pokud tedy chceme zjistit, zda spolu nějaká data koreluje, bude znít nulová hypotéza takto: Výsledná data spolu nekoreluje. Poté si určíme hladinu významnosti testu, na které chceme H_0 testovat. Jedná se vlastně o nejvyšší p -hodnotu („ p -value“), na které hypotézu zamítáme. Běžně se používá 0,05, což je pravděpodobnost 5 %, že nulovou hypotézu zamítneme, i když platí. Hodnota p je hodnota signifikance testu, neboli je to hodnota pravděpodobnosti, že je nulová hypotéza pravdivá. Pokud tedy v testu vyjde hodnota $p = 0,05$ %, znamená to, že existuje 5% pravděpodobnost, že je H_0 pravdivá. V případě, že je p -hodnota nižší než hladina významnosti, pak nulovou hypotézu zamítáme a platí alternativní hypotéza H_1 , která je opakem H_0 , v tomto případě: Výsledná data spolu koreluje. (Wasserstein et al., 2016)

2.2. Test dobré shody (Chí-kvadrát test) a Fisherův exaktní test

Oba tyto statistické testy slouží k testování nezávislosti pomocí kontingenčních tabulek. Chí-kvadrát test hodnotí shodu očekávaných a skutečných hodnot měřených veličin a ověřuje, jestli mají náhodné veličiny předem dané rozdělení pravděpodobnosti. Fisherův exaktní test se používá ke srovnání dvou rozptylů a užívá se v případě nízkých očekávaných četností (Fisher, 1922; Fisher, 1954).

2.3. Střední hodnoty koncentrací

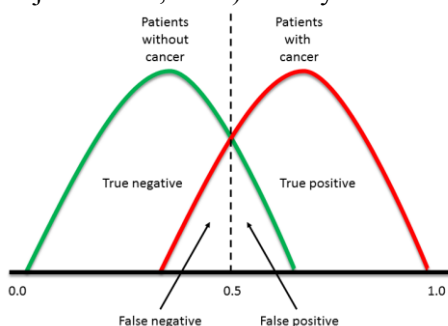
Při určování vhodné dávky chemoterapeutik se pomocí grafů vyhodnocuje takzvaná střední účinná a inhibiční koncentrace *in vitro*. Křivka pro účinnou koncentraci (EC-, „effective concentration“) zobrazuje závislost účinnosti léku na zvyšující se dávce a jedná se o funkci rostoucí. Hodnota EC50 je koncentrace léčiva, která poskytuje polovinu maximální odpovědi. Křivka pro inhibiční koncentraci (IC-, „inhibitory concentration“) zobrazuje míru inhibice odpovědi na lék se zvyšující se dávkou a jedná se o funkci klesající. Hodnota střední inhibiční koncentrace IC50 je vlastně koncentrace inhibitoru, při které je odezva snížena o polovinu. Jedná se o koncentraci potřebnou *in vitro* k dosažení 50% maximální odpovědi. Střední hodnota účinné dávky (ED-, „effective dose“) ED50 se udává, pokud změníme podávanou dávku léku, ale neznáme jeho efektivní koncentraci. Jedná se o dávku podávanou pacientům, při které dosáhneme požadovaných klinických výsledků v 50 % případů (GraphPad, 2018).

2.4. Senzitivita, specifita a prediktivní hodnota a úspěšnost testu

Všechny tyto charakteristiky testu spolu vzájemně souvisí a dají se od sebe navzájem odvodit. Senzitivita testu vyjadřuje podíl skutečně pozitivních pozorování vůči 100 % (skutečně pozitivní pozorování s falešně negativními). Specifita testu vyjadřuje podíl skutečně negativních pozorování vůči 100 % (skutečně negativní pozorování s falešně pozitivními). Prediktivní hodnota testu je míra pravděpodobnosti, že je výsledek skutečně pozitivní, pokud ho test jako pozitivní vyhodnotil (pozitivní prediktivní hodnota), nebo že je výsledek skutečně negativní, pokud ho test vyhodnotil jako negativní (negativní prediktivní hodnota). Úspěšnost testu určuje celkový poměr správných rozhodnutí (Phillips et al., 1983).

2.5. ROC křivka („Receiver Operating Characteristic“)

ROC křivka je křivka popisující vztah mezi specifitou a senzitivitou testu. Při hodnocení jakéhokoliv testu je vždy nastaven určitý parametr, podle kterého určujeme jeho výsledky. Pokud například hodnotíme citlivost a rezistenci pacientů, vyneseme křivky znázorňující distribuci pacientů citlivých a rezistentních na testovaný lék v závislosti na zvoleném parametru. Tyto dvě křivky se vždy v distribuci zvoleného parametru částečně překrývají. Zvolené separační kritérium v daném parametru, které jsme určili pro rozdělení dvou populací a vyhodnocení testu, bude vždy určitou část populace klasifikovat špatně jako falešně pozitivní nebo falešně negativní. Podle toho, jak budeme měnit separační kritérium, bude se i měnit poměr falešně pozitivních a falešně negativních pozorování (Hajian-Tilaki, 2013). Překryv těchto křivek je znázorněn na modelovém grafu níže.



Obr. 2.: Modelová ROC křivka. (Hallinan, 2014)

3. Úvod do historie

3.1. Počátky *in vitro* testů chemosenzitivity

První náznaky testování citlivosti buněk *in vitro* pocházejí z počátku 20. století. V roce 1917 provedl Pappenheimer studii, ve které se snažil demonstrovat cytotoxické účinky různých látek na buňkách potkaního brzlíku a lymfocytech lidských tonzil (Pappenheimer, 1917).

Použil k tomu velmi rychlou a jednoduchou metodu, kdy přidal barvivo tropanovou modř k buněčným kulturám. Toto barvivo se používá k selektivnímu barvení mrtvých tkání. Mrtvé buňky budou mít výrazně modře obarvené jádro trypanovou modří, což lze dobře pozorovat pod mikroskopem. Zatímco živé buňky jsou schopné toto barvivo vypumpovat ven pomocí ABC transportérů a budou je tedy pozorovat jako neobarvené. Difúze tropanové modři do buňky a její následné obarvení tedy slouží jako kritérium určující poranění buněk projevující se jako ztráta integrity plazmatické membrány. Díky tomu lze kvantitativně studovat vliv různých látek na zde studované lymfocyty (Pappenheimer, 1917).

Výsledky studie byly vztaženy pouze na lymfocyty potkaního brzlíku. Pappenheimer zkoušel ovlivňovat životnost lymfocytů nejrůznějšími látkami. Studoval vliv pH a teploty, přidání cholesterolu nebo hemoglobinu na životnost buněk, reakci buněk na nedostatek kyslíku, či ochranný vliv vaječného albuminu (Pappenheimer, 1917).

V pozdních třicátých letech minulého století byla vyvinuta první procedura cytologické diagnostiky rakoviny, která využívala konvenční transmisní světelnou mikroskopii s kombinací směsí kyselých a zásaditých barev. George Papanicolaou vyvinul první z několika těchto barevných směsí a použil je pro studium estrálního cyklu primátů. Nejprve pozoroval změny zbarvení buněk odebraných pomocí stěrů z genitálního traktu samic. Později tuto metodu aplikoval na lidské buňky a zjistil, že se maligní buňky z cervikálních stěrů dají takto odlišit od zdravých. Studie od Papanicolaou a Traut z roku 1941 potvrdila význam této diagnostiky cervikálního karcinomu, což podmínilo počátek vývoje automatizovaných přístrojů. Během čtyřicátých let se tato metoda značně rozvíjela. Patologové se učili rozlišovat zdravé buňky od maligních pomocí PAP barvení, které se používá dodnes (Shapiro, 2005). V dnešní době je toto barvení jedno z nejvyužívanějších barvení v cytopatologii a používá se například při vyšetření stěrů z děložního čípku. Jedná se o polychromatickou barvu, která v sobě obsahuje pět různých barviv, které odlišně barví různé buněčné komponenty- kyselá barva barví zásadité buněčné komponenty a naopak (Team 2016).

3.2. Počátky využití *in vitro* CSRA pro nádorovou tkáň

Testy CSRA pro nádorovou tkáň využili poprvé lékaři M. M. Black a F. D. Speer, kteří v roce 1953 testovali vliv jednotlivých chemoterapeutik (uretan a triethylen melamin) nebo jejich kombinací na dehydrogenázovou aktivitu lidské nádorové tkáně (Black et al., 1953). Sukcinát dehydrogenáza je

enzym, který v cyklu kyseliny citronové produkuje ATP. Její aktivita tedy koreluje s životností buňky, podle které je možné určit senzitivitu. Pomocí redukce tetrazoliových solí na barevný formazan lze detekovat aktivitu mitochondriální dehydrogenázy. Podle intenzity zbarvení lze určit míru metabolické aktivity buňky (Kimura et al., 1992). Zjistili, že velkou biochemickou variabilitu ve své nádorové tkáni vykazují i jednotliví pacienti se stejným typem nádoru. Prokázali také určitou korelaci mezi klinicky pozorovanou citlivostí nádorové tkáně na dané chemoterapeutikum a působením stejného chemoterapeutika při *in vitro* pozorování (Black et al., 1953).

Následujícího roku vydali další publikaci zabývající se výzkumem nové metody, která by řešila rozdíly citlivosti nádorů k jednotlivým lékům. Uvedli, že nádory reagují na léčbu různým způsobem, ať se jedná o různé typy nádorů či o jednotlivé nádory stejného typu. Histologicky identické nádory se mohou lišit ve svých odpovědích na léčbu, dokonce mohou bez jakékoliv znatelné změny histologické struktury změnit svou citlivost na lék, na který původně citlivý byl. Dále se věnovali účinku dalších léků. Jednalo se o aminopterin, podávaný jak jednotlivě, tak v kombinaci s urethanem a triethylen melaminem („triethylene melamine“ – TEM).

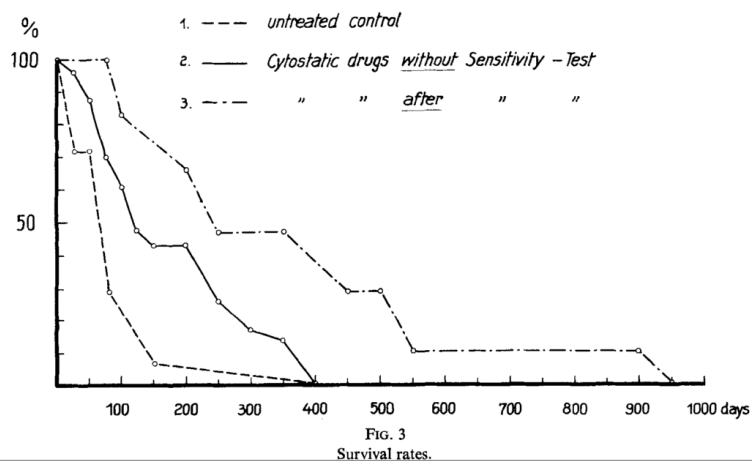
Dehydrogenázová aktivita nádorových buněk ve vzorkách byla určena pomocí tetrazoliových solí. Tento pokus byl prováděn pro určení stupně korelace mezi působením různých chemoterapeutik na *in vitro* dehydrogenázovou aktivitu a jejich klinických terapeutických vlastností. Podle výsledků nebylo možné korelovat intenzitu endogenní dehydrogenázové aktivity s typem nádoru, jeho mikroskopickým vzhledem, klinickým chováním ani s odpovědí nádoru na léčbu. Byla ale prokázána pozitivní korelace mezi působením chemoterapie na různé nádorové tkáně v průběhu *in vitro* testů pomocí inhibice sukcinát dehydrogenázy („succinate dehydrogenase inhibition“ – SDI) a jejími klinickými účinky (Black and Speer, 1954).

V roce 1957 provedl J. C. Wright se svým týmem výzkum vztahu mezi výsledky chemoterapeutické léčby pacientů s nádory a *in vitro* testy na tkáňových kulturách. Každý vzorek nádoru byl kultivován na tkáňové kultuře a testován proti tomu terapeutiku, kterým byl léčen pacient, jemuž byl vzorek odebrán. Jako léčebná dávka byla použita nejnižší dávka způsobující inhibici růstu myších srdcí na fibroblastových kulturách. Ze 40 případů vykazovalo 26 případů korelaci obou výsledků. U 10 případů nebyla korelace prokázána, další 4 případy byly sporné. Podle Wrighta by tato metoda mohla sloužit k výběru nejúčinnějšího chemoterapeutika pro daný nádor u konkrétního pacienta (Wright et al., 1957).

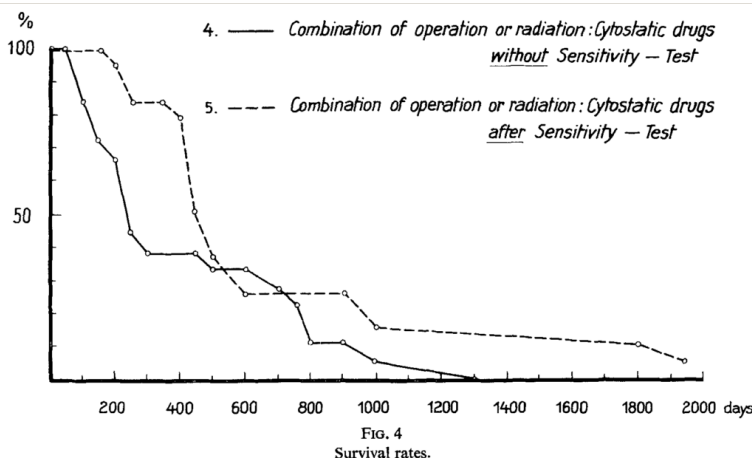
O prospěšnosti chemosenzitivních testů se ve své studii zmínili i H. Limburg a U. Heckmann v roce 1968. Studie se týkala převážně účinnosti chemoterapie pro pacientky s rakovinou vaječníků. V závěru svého výzkumu uvedli, že nemohou doporučit konkrétní chemoterapeutikum pro jednotlivé typy nádorů, jelikož žádné z nich nelze obecně označit jako nejefektivnější. Ve studii bylo testováno 40 pacientek, přičemž u 25 pacientek byly použity *in vitro* chemosenzitivní testy pomocí laktát dehydrogenázové aktivity a u zbylých 15 pacientů byla zvolena standardní léčba. Průměrná doba

přežití po chemoterapeutické léčbě volené *in vitro* testy se zvýšila z 283 dní (u pacientů léčených standardně volenou chemoterapií) na 527 dní (Limburg and Heckmann, 1968).

Následující grafy zobrazují Kaplan-Meierovy křivky přežití, které porovnávají dobu přežití pacientů po léčbě cytostatiky vybranými na základě CSRA testů s cytostatiky standardními. V dalším grafu je zobrazena doba přežití pacientů, kteří byli kromě cytostatik (s/bez CSRA) léčeni ještě chirurgickou nebo radiologickou léčbou.



Obr. 3.: Kaplan-Meierova křivka přežití I.
(Limburg a Heckmann 1968)



Obr. 4.: Kaplan-Meierova křivka přežití II.
(Limburg and Heckmann, 1968)

Limburg a Heckmann ze získaných výsledků doporučují pokračovat v testování citlivosti nádorů (Limburg and Heckmann, 1968).

H. L. Holmes a M. Little vydali v roce 1974 studii, ve které prováděli *in vitro* CSRA mikrotesty tkáňových kultur 13 pacientům s nádorovým onemocněním. Výsledky těchto testů ukazovaly, že v 8 případech by nádor nereagoval na léčbu podanými chemoterapeutiky, avšak u jednoho z těchto osmi případů byla klinická odpověď pozorována. Ve zbylých 5 případech by nádor podle výsledků měl reagovat na léčbu podanými léky, což se také následně potvrdilo. I touto studií byla potvrzena vysoká korelace mezi *in vitro* testy a klinickou odpovědí (Holmes and Little, 1974).

Už ne tak pozitivní byly výsledky studie R. J. Berryho, A. H. Lainga a J. Wellse z roku 1975, kdy kultivovali 97 vzorků lidských nádorů různého typu, aby poté mohli předpovědět jejich citlivost

na chemoterapii. Pouze 26 vzorků bylo schopných růst po dobu 7 dnů na kultivačním médiu. Podrobné studie subkultur pěstovaných *in vitro* ukázaly, že se během růstu objevují velké změny v chemosenzitivitě, a to už v druhých subkulturách. Takže testy by měly být prováděny z čerstvých explantátů nebo prvních subkultur. Na konci této studie tedy nebyla nalezena žádná významná korelace mezi klinickým chováním nádoru a výsledky jeho senzitivity zjišťované *in vitro*. Důvodem byl zřejmě malý počet vzorků, které byly schopny na kulturách růst a následně provádění testů i na kulturách po druhém pasážování, které významně změnily vlastnosti vzhledem ke vzorkům *in vivo* (Berry et al., 1975).

3.3. Počátky průtokové cytometrie

Průtoková cytometrie je vhodnou metodou pro CSRA testy, protože umožňuje samostatné testování jednotlivých buněk. Tím je možné získat kompletní přehled o buňkách v nádoru a jeho heterogenitě. Úplné počátky smýšlení o průtokové cytometrii se píší do začátku 20. stol. (Shapiro, 2005). Poprvé byla průtoková cytometrie popsána v roce 1934 Moldavanem, kde představil koncept počítání buněk (konkrétně červených krvinek) a popsal proudění vzorku kapilárou a vyhodnocení excitace fotoelektrickým senzorem (Moldavan, 1934).

V padesátých letech byla vyvinuta alternativní metoda založena na skutečnosti, že buňky jsou obklopeny lipidickou membránou, a tím pádem jsou špatnými vodiči elektrického proudu, na rozdíl od fyziologického roztoku. Wallace Coulter vynalezl zařízení, ve kterém buňky procházejí jednotlivě malým otvorem mezi dvěma komorami naplněnými fyziologickým roztokem. Princip počítání a měření velikosti buněk byl založený na vzrůstu elektrické impedance otvoru při průchodu buňky v poměru k jejímu objemu (Coulter, 1956). Crosland-Taylor zase poprvé použil princip laminárního toku, kde kapalina proudí v rovnoběžných vrstvách, mezi kterými nevzniká žádné narušení (Crosland-Taylor, 1953).

Na počátku šedesátých let se k měřenému rozptylu světla začala měřit ještě fluorescence po přidání fluorescenčního barviva do vzorku. První komerční průtokový cytometr byl zaveden na počátku let sedmdesátých (Hallermann et al., 1964; Ornstein and Ansley, 1974).

3.4. Počátky používání průtokové cytometrie pro testy chemosenzitivity a rezistence *in vitro* (CSRA)

Průtoková cytometrie se pro *in vitro* testy nádorové tkáně začala využívat v roce 1978. Toho roku byla provedena studie zjišťující vztah mezi ploidií a proliferačními schopnostmi lidských buněk s nádorovým onemocněním pomocí průtokové cytometrie. Ze studií vyplývá, že výskyt karyotypových abnormalit není u nádorů náhodný. Obsah buněčné DNA je určujícím znakem pro fáze buněčného cyklu a ploidiu buňky. Pro stanovení obsahu DNA a určení ploidiu byla využita průtoková cytometrie. Výhodou této metody je, že není omezována proliferačním stavem buněčné populace, jelikož umožňuje provádět výzkum na buňkách v interfázi buněčného cyklu. Oproti mikroskopické

analýze obsahu DNA, která je pracná a časově náročná, je průtoková cytometrie velice rychlá a přesná. A navíc umožňuje vyhodnocení mnoha po sobě následujících buněk najednou. Ze 78 pozorování mělo 76 vzorků nádorů různého typu aneuploidní obsah DNA. Ploidie byla zkoumána pomocí smíchání vzorků nádorových buněk s granulocyty, které se ukázaly jako vhodný referenční standard pro určení ploidie lidských pevných nádorů pomocí průtokové cytometrie. Většina pacientů s pevnými nádory vykazovala hyperdiploidní abnormality bez ohledu na to, v jakém místě se nádor nacházel. Nebyla ale prokázána žádná korelace mezi ploidií a proliferačními vlastnostmi buněk (Barlogie et al., 1978).

V roce 1982 byla použita průtoková cytometrie pro sledování léčby malobuněčného karcinomu plic. Pomocí sekvenční analýzy nádoru s opakovaným odběrem vzorku byly pozorovány změny buněčné kinetiky vyvolané chemoterapeutickou léčbou, aby mohl být upraven léčebný postup a zlepšily se tak výsledky léčby. Odběr vzorku a úprava léčebného režimu probíhali každých 4-7 týdnů. Na léčbu upravenou podle výsledků průtokové cytometrie reagovali všichni pacienti (Vindelov, Hansen, 1982).

V dubnu roku 1983 byla testována citlivost nádorových buněk na chemoterapii pomocí průtokové cytometrie *in vitro*. Byly izolované buňky ze třech nádorů Ascites Ehrlich, což je nádorová kultura kultivovaná *in vivo*. Jedná se o nediferenciovaný, hyperdiploidní karcinom, původně z myší, který nese podobné znaky s lidskými nádory a je pro něj charakteristická rychlá proliferace (Barakat et al., 2015). V této studii byl jeden nádor citlivý na adriamycin a další dva nádory, které na adriamycin citlivé nebyly. Všechny vzorky byly inkubované na agaru a poté k nim byl přidán adriamycin, který měl vyvolat odchylky buněčného cyklu u citlivého nádoru. Tyto odchylky byly monitorované pomocí průtokové cytometrie. Adriamycin opravdu způsobil odchylky buněčného cyklu u citlivého nádoru. Tyto změny buněčného cyklu vyvolané léky jsou závislé na dávce podaného léku. Dále bylo prokázáno, že míra citlivosti nádorů na léky závisí na koncentraci dávky léků (Engelholm et al., 1983).

O tři roky později publikovala stejná výzkumná skupina výzkum, ve kterém se zabývala určením chemosenzitivity lidského malobuněčného karcinomu plic *in vitro*. Chemosenzitivita byla určena pomocí průtokové cytometrie na základě detekce změn buněčného cyklu vyvolaných léky. Už v minulé studii tuto metodu popsali jako vhodnou pro odhadování chemosenzitivity lidských nádorů. Na rozdíl od klonovací metody, která byla v té době používána pro optimalizaci léčby nádorových onemocnění, jsou CSRA pomocí průtokové cytometrie daleko rychlejší a spolehlivější. Při provádění FCCA („Flow Cytometry Chemosensitivity assay“) není potřeba čekat, až buňky narostou na médiu a výsledek není ovlivněn neschopností buněk na živném médiu růst (Engelholm et al. 1986).

Ve své studii se zabývali tím, jak vypovídá změna buněčného cyklu o chemosenzitivitě nádoru k podanému léku. Použili tři nádory, přičemž každý měl jinou citlivost na podané chemoterapeutikum (zde konkrétně melfalan). Nádory byly nejprve enzymaticky a mechanicky

disociované do jednobuněčné suspenze a poté inkubované s různými dávkami léku. Následně byly přendané na agar a pomocí průtokové cytometrie byla určena změna buněčného cyklu. Jeden ze tří nádorů, který byl rezistentní na melfalan, nevykazoval žádné změny buněčného cyklu po podání léku. U zbylých dvou citlivých nádorů na melfalan se projevila akumulace buněk v S-fázi v závislosti na podané dávce léku. Odchytky od buněčného cyklu testovaných nádorů korelovaly se senzitivitou *in vivo*. Podle výsledků této studie výzkumná skupina označila tuto metodu jako vhodnou pro testování citlivosti lidských pevných nádorů (Engelholm et al. 1986).

4. Přehled CSRA testů pro nádorová onemocnění

Testy chemosenzitivity a rezistence nádorů umožňují výběr vhodného chemoterapeutika na základě citlivosti konkrétního nádoru určené *in vitro*, podle níž lze vyhodnotit, zda je růst nádoru inhibován podaným lékem nebo skupinou léků, či jestli podaný lék neovlivňuje růst nádorových buněk. Díky tomu je možné individuálně přizpůsobit léčbu a výběr účinných léků konkrétnímu pacientovi (Schrag et al., 2004).

4.1. Princip CSRA metody

CSRA je *in vitro* laboratorní analýza buněk vzorku odebraného z primárního nádoru nebo z metastazujícího nádoru, jejímž cílem je poskytnutí prediktivní informace o chemosenzitivitě nebo rezistenci nádorových buněk vůči různým chemoterapeutickým přípravkům (Burstein et al., 2011). CSRA lze provádět různými metodami (viz další podkapitola), avšak princip testu je vždy stejný.

Nejprve je odebrán vzorek pacientova nádoru. Po úspěšné izolaci jsou buňky kultivované v kultuře *in vitro*, aby byla zachována jejich životnost i mimo pacientovo tělo. Následně jsou buňky rozdělené do několika vzorků, ke kterým jsou přidána různá chemoterapeutika v různých koncentracích pohybujících se v řádu 0,1-20 $\mu\text{g/ml}$ (Dendy et al., 1970) a jeden vzorek se zachovává jako negativní kontrola, ke které se výsledky testů nakonec vztahují. Po inkubaci léků s cytostatikem je určen počet živých buněk ve vzorku, který je následně porovnán s počtem živých buněk v negativní kontrole. Rozdíl těchto dvou hodnot určuje citlivost, případně rezistenci nádorových buněk k podanému cytostatiku. Senzitivitu lze také určit pozorováním změny buněčného cyklu nádorových buněk po podání léku (Barlogie et al., 1978). Je nutné testovat vzorky co nejdříve po odebrání a kultivaci, jelikož nádorové buňky bývají heterogenní a v čase značně proměnlivé. Je prokázáno, že má význam provádět testy chemosenzitivity buď na čerstvě odebraných vzorcích, anebo jejich prvních subkulturách, které narostou na médiu po prvním pasážování. Pasážování se provádí v momentě, kdy buňky pokryjí cca 70-80 % povrchu kultury. K tomu dochází přibližně za 3-5 dní. Druhé subkultury už vykazují značnou změnu chemosenzitivity (Berry et al., 1975).

4.2. Využití CSRA testů

Ačkoli by většina onkologů upřednostňovala přizpůsobení léčby a volby chemoterapeutik individuálním potřebám pacienta, nejsou chemosenzitivní testy zařazeny do celkové klinické péče, protože dosavadní studie nepodpořily zařazení této technologie mimo klinický výzkum (Galvan, 2018). Důvodem je především nedostatek prospektivních studií a malé množství vzorků testovaných v jednotlivých studiích. Studie jsou většinou prováděny na principu porovnání pacientů, kteří byli léčeni chemoterapií zvolenou podle CSRA testů, s pacienty, kteří byli léčeni podle standardní léčby. Nelze ale porovnat, do jaké míry by byla léčba konkrétního pacienta úspěšnější, pokud by byla volena podle CSRA testů namísto standardně volené léčby. Dalším problémem je určení jasné definice toho, kdy se jedná o úspěšnou léčbu. Výsledky léčby jsou měřeny v letech přežití po léčbě bez návratu nemoci, v letech přežití do relapsu onemocnění a dále je určovaná celková doba přežití. Pacienti jsou sledováni maximálně po dobu 60 měsíců od zahájení léčby, další měsíce už se do statistik nezařazují (Galvan, 2018).

4.3. Proč používat CSRA testy?

Vznik a léčba nádorového onemocnění jsou vždy ovlivněny velkým množstvím faktorů. Pokud má být léčba úspěšná, je potřeba zhodnotit a uvážit všechny tyto faktory souhrnně. V dnešní době je využívána systémová chemoterapie nádorových onemocnění, kdy se pro léčbu využívají statisticky nejúspěšnější léčebná schémata vyhodnocená klinickými studiemi (Amur et al., 2010).

Nejlepší volba chemoterapie má být tedy ta statisticky nejúspěšnější. Každý pacient má však individuální genotyp i fenotyp somatických buněk i buněk nádoru. Mezi pacienty je vysoká genetická variabilita v léčivo-metabolizujících enzymech, transportních systémech nebo ve výskytu mutací v populaci. To způsobuje rozdílnou reaktivitu nádorů na cytostatika. Nehledě na to, že při systémové terapii již neexistuje standardní postup jak pokračovat v léčbě, pokud je primární i sekundární léčba neúspěšná (Amur et al., 2010; Hatok et al., 2009).

Heterogenita nádorů stejného histologického typu v populaci je značně vysoká a způsobuje selhání standardní léčby. Nádory obvykle vykazují vysokou heterogenitu i v rámci jednoho jedince, jak v čase, tak i v prostoru. Každý nádor je tvořený heterogenními populacemi buněk. Tyto jednotlivé populace jsou molekulárně i geneticky odlišné, což znamená, že mají odlišné i určité molekulární vlastnosti. Například různé části nádoru mohou mít rozdílnou náchylnost k apoptóze nebo proliferační aktivitu. Lišit se také mohou ve schopnosti tvořit metastatické buňky či v citlivosti k terapii. S vysokou heterogenitou nádoru vzrůstá tedy i jeho odolnost vůči standardní léčbě. Z tohoto důvodu musí být proveden odběr vzorků z více míst, které musí být následně vyhodnoceny pomocí CSRA testů, abychom mohli získat celkový profil chemosenzitivity a rezistence nádoru (Dagogo-Jack and Shaw, 2018; Meacham and Morrison, 2013; Medenica and Powell, 1995).

Podle Roberta Holloway M. D. je způsob výběru léčby na základě experimentálního CSRA testu velice přínosný v situacích, kdy neexistuje standardizovaná léčba (Jenks, 2012). Při relativně vysokém procentu přesnosti výsledků, které potvrzují mnohé studie, je nespornou výhodou CSRA jejich rychlost, kdy je možné znát výsledky testů už za 2-4 dny, a jejich relativní nízkonákladovost.

Zavedením CSRA testů do běžné klinické praxe bychom mohli zvýšit účinnost nádorové terapie s minimálním zatížením pacienta, jelikož jsme schopni z výsledků těchto testů určit citlivost a rezistenci nádorových buněk vůči cytostatikům v celém průběhu onemocnění. Charakter nádoru a jeho citlivost se s postupem času či změnou jeho lokace mění. Díky těmto testům můžeme pro léčbu vybrat kombinaci nejúčinnějších cytostatik a zabránit tak vystavení pacienta cytostatikům neúčinným (Michalová et al., 2008).

Velkou výhodou CSRA testů je vysoká pravděpodobnost určení rezistence nádoru k podaným cytostatikům. Rezistenci lze podle některých studií určit s 80-100% úspěšností (Volv and Efferth, 2015). Na rozdíl od senzitivity nádoru se výsledky *in vitro* shodují s chováním buněk *in vivo*. Pokud tedy určíme rezistenci *in vitro*, dá se předpokládat stejná rezistence *in vivo*.

4.4. Proč nepoužívat CSRA testy?

4.4.1. Rozdílnost senzitivity určené *in vitro* a *in vivo*

Citlivost nádorových buněk na podaný lék určená testováním *in vitro* neodpovídá zcela citlivosti, kterou ke stejným lékům vykazují buňky *in vivo*. Pomocí CSRA nelze citlivost nádoru vůči chemoterapeutikům určit se 100% pravděpodobností (Volv and Efferth, 2015). Nádorové onemocnění je komplexní děj zahrnující proliferaci buněk, apoptózu či reakci buněk imunitního systému pacienta a jeho léčbu nelze omezit pouze na buněčnou nebo populační úroveň. U nádorových buněk v nefyziologickém prostředí může docházet ke změně morfologie, růstových faktorů či genové exprese (Taláč et al. 2000).

Důvodem je především to, že nejsme schopni v laboratorních podmínkách nasimulovat přesné podmínky prostředí, ve kterém jsou buňky v pacientově těle. Pokud buňky kultivujeme *in vitro*, nejsou v kontaktu s okolními buňkami, neovlivňují je metabolické procesy a nenacházejí se ve fyziologickém prostředí, což způsobuje, že se chovají jinak, než v podmínkách *in vivo* (Taláč et al., 2000). Nádorové buňky v pevných nádorech *in vivo* jsou v hypoxickém stavu, který způsobuje rezistenci vůči chemoterapeutické léčbě. Stejně buňky *in vitro* rezistentní být nemusejí. Chemoterapeutika většinou fungují proti rychle proliferujícím látkám. S hypoxií je však spojený i nedostatek glukózy. Hypoxie a hypoglykémie pro buňku znamenají zastavení nebo zpomalení buněčného cyklu, což je způsobeno specifickými proteiny, které jsou indukovány za hypoxických podmínek. Tím pádem na hypoxické buňky *in vivo* nefungují chemoterapeutické léky (J. M. Brown 1999). Stejně tak jako hyperglykémie způsobuje zvýšenou rezistenci nádorových buněk (Litchfield et al., 2015). Dalšími důvody, proč hypoxie způsobuje rezistenci nádoru na léky, jsou rozdíly koncentračních a pH gradientů a produkce

stresových hypoxických proteinů (Brown, 1999). Léky, které se v podmínkách *in vitro* jeví jako účinné, nemusí fungovat v lidském těle. Může to také způsobit špatná vstřebatelnost léků, která nelze zjistit v *in vitro* podmínkách, nebo to může být způsobeno degradací léků prostřednictvím různých metabolických reakcí (Lynne, 2018).

4.4.2. Nedostatečné výsledky a neobjektivnost CSRA studií

V publikovaných studiích o CSRA není dostatek informací o tom, do jaké míry ovlivňují výsledky CSRA testů výběr chemoterapeutického přípravku pro léčbu. Je důležité posoudit, jak často provedení CSRA znamená pro pacienta rozdílný výběr vhodných chemoterapeutik, oproti situaci, kdy by CSRA proveden nebyl. Často je kombinace léků doporučených na základě výsledků CSRA stejná, jako je kombinace léků, která by byla vybrána bez provádění testů. Výsledky CSRA v 80-90 % (Huang et al., 2007) vychází v souladu s doporučením standardní klinické léčby, jelikož právě ta je statisticky nejspěšnější. V tomto případě je CSRA výhodná pouze v momentě, kdy je potřeba se rozhodnout pro jednu z více možností standardní léčby. Z tohoto důvodu nejsou CSRA testy považované za dostatečně přínosné (Cortazar and Johnson, 1999; Schrag et al., 2004). Dostupné studie také mnohdy nemají správnou vypovídající hodnotu, protože jsou ovlivněné různými faktory. Setkáváme se s problémy, jako je např. neschopnost nádorových vzorků růst na živném médiu, předčasné úmrtí pacientů před dokončením studie, omezování výběru pacientů pro studie podle zvolených kritérií a podobně. Studie bývají ovlivněny nenáhodným výběrem pacientů, u kterých bude využita metoda CSRA. Tito pacienti musí mít nádory, které mohou být odebrané biopsií, punkcí nebo jinými metodami, čímž se výběr stává nenáhodným a ovlivňuje tak objektivitu testů (Schrag et al., 2004).

4.4.3. Standardizace CSRA studií

Zakladatelka neziskové organizace pro pacientky s rakovinou vaječníků Laura Shawver tvrdí, že klinické CSRA testy by měly být více standardizované, jelikož každá laboratoř může používat odlišnou metodu testování (Jenks, 2012). Pokud nejsou studie správně standardizované, nelze podle nich jednoznačně určit, zda je nový způsob léčby výhodnější, než ten původní. Problémem těchto studií je jejich nedůkladná příprava. Chyby většinou začínají už v samotném návrhu studie, kdy bývá špatně zvolený srovnávací parametr. Nedostačující bývá také velikost testovacího souboru, tedy počet pacientů účastnících se studie. To bývá způsobené nábořem malého množství pacientů do studie, nebo i vyřazováním starých nemocných nebo jinak zdravotně indisponovaných pacientů. Srovnávání malých testovaných skupin jsou statisticky nevýznamná. Nehledě na to, že zdravotní indispozice pacientů je v klinické praxi velmi častá, a proto by i tento vliv měl být zahrnutý do studií. Dále často dochází k předběžnému ukončování studií na základě průběžných analýz, při kterých jsou odhaleny neočekávané nežádoucí účinky nebo naopak dochází k výraznému zlepšení kvality života pacienta. Takto předčasně ukončené studie ale nemají žádnou vypovídající hodnotu (Novotný and Petruželka, 2005).

4.5. Metodické přístupy

4.5.1. Metody prováděné *in vivo*

In vivo CSRA spočívají v určování chemosenzitivitu pomocí modelových zvířat nesoucích vzorek lidského nádoru, xenoimplantátu („patient derived xenografts“ – PDX). Jako zvířecí model se nejčastěji využívá imunodeficitní myš. Nádorové buňky se do myši zavádí buď intravenózně nebo pomocí fragmentu zavedeného do tuku mléčné žlázy či subrenální kapsule. Dále se využívá intraperitoneální, intrahepatická nebo intrakardiální injekce. V průběhu léčby je sledovaný růst nádoru, jeho umístění, objem a průměr (Price, 1996). Myším jsou podávány různé léky. Následně, podle jejich reakcí na podané léky, je vybrán vhodný terapeutický režim pro konkrétního pacienta. Využití *in vivo* CSRA testů eliminuje změny chování buněk pěstovaných v *in vitro* kulturách (Lai et al., 2017). Jejich nevýhodou je však velká časová náročnost, kdy je možné dostat výsledky až za 1 až 4 měsíce (Morton and Houghton, 2007). SRCA („Subrenal capsule assay“) funguje na principu vložení lidských nádorových buněk do subrenálního pouzdra myši, v níž samotné testování probíhá (Stratton, 1987). Výhodou metody je, že implantáty zachovávají hlavní genetické a histologické charakteristiky původního nádoru a zůstávají stabilní i po několika pasážováních (Hidalgo et al., 2014).

4.5.2. Metody prováděné *ex vivo*

„Circulating tumor cells“ - CTCs

Jedná se o metodu, při které jsou izolované nádorové buňky, které jsou přítomné v periferní krvi pacientů s pevnými nádory. Tyto buňky jsou kultivované *ex vivo* a následně pozorujeme, jak se mění citlivost buněk vůči lékům u jednotlivých pacientů. Podle genotypu a funkční charakteristiky buněk je volena vhodná léčba. Výhodou této metody je možnost sledovat mutační procesy primárního nádoru. Nevýhodou je naopak náročnost samotné izolace živých buněk (Yu et al., 2014).

4.5.3. Metody prováděné *in vitro*

Metody prováděné *in vitro* se oproti metodám *in vivo* liší v mnoha faktorech. Metody *in vitro* jsou znatelně rychlejší, výsledky lze získat někdy i za pár hodin. Dále nejsou tolik náročné na materiál a na modelové organismy a dají se vyhodnocovat podle různých parametrů. Nevýhodou ale může být nedostatečná absorpce léčiva nebo distribuce léčiva do nádoru neodpovídající *in vivo* podmínkám způsobená ztrátou vaskularizace nebo jejím poškozením, detoxikace léků metabolickými dráhami, či odlišný růst nádorů *in vitro* a *in vivo* (Clarke, 1996).

4.5.3.1. Klonovací a proliferační testy

Klonovací metody jsou založeny na principu kultivace nádorových buněk na živném médiu s různými cytostatiky. Po několika týdnech jsou porovnány počty buněk v testovaných vzorcích s počty buněk v kontrolních vzorcích a podle rozdílu těchto dvou čísel je určena senzitivita, případně rezistence nádoru k testovanému léku. Nevýhodou těchto metod je potřeba nádorových buněk

v jednobuněčné suspenzi. K zajištění vypovídající hodnoty testu a možnosti testování různých léků v různých koncentracích je potřeba velké množství buněk, které musí být schopné růst na agarovém médiu.

„Human tumor colony assay“ (HTCA), „Capillary cloning systém“ (CCS), „Thymidine incorporation assay“ (TIA), „Diferential staining cytotoxicity assay“ (DiSC)

Všechny tyto metody fungují na stejném principu. Kultivace buněk s různými léky *in vitro* trvá 2-3 týdny. TIA testy vykazují korelaci *in vitro* s *in vivo* odpověďmi v 88 % pro rezistenci nádorů a ve 44 % pro senzitivitu (Tanigawa et al. 1993). Klinické korelace mezi *in vitro* chemosenzitivitou a *in vivo* reakcí na léčbu je HTCA úspěšná v 71 % pro určení senzitivity a v 91 % pro určení rezistence (Salmon, 1984; Tanigawa et al., 1993). Nevýhodou těchto testů je jejich časová náročnost. Často také dochází k vyhodnocení falešně pozitivních výsledků, protože je citlivost buněk posuzována podle inhibice růstu. Ta ovšem nemusí být způsobena jen cytostatiky a nemusí znamenat smrt buňky. Metoda DiSC se liší od předchozích metod v době inkubace i ve vyhodnocení senzitivity. Při testování touto metodou jsou buňky inkubované jen po dobu 4-6 dní. Potom je přidána barva fastgreen, která barví jen mrtvé buňky. Citlivost je určena podle poměru mrtvých buněk k celkovému počtu buněk. Tento test je výrazně kratší než předchozí a může být využit pro většinu nádorů, ale je pracný a vyhodnocování testů může být subjektivní (Weisenthal et al., 1983).

„Collagen gel droplet-embedded culture-drug sensitivity“ test (CD-DST)

Suspenze nádorových buněk je přidána k neutralizovanému roztoku kolagenu, ze kterého vzniknou gelové kapičky. V každé kapce je přibližně $3 \cdot 10^3$ buněk. Po sedmidenní inkubaci s léky se kolonie nádorových buněk v kapkách kolagenového gelu barví neutrálním červeným roztokem po dobu 2 hodin. Živé buňky jsou kvantifikované obrazovou analýzou, ze které je určena proliferace buněk v kapce ošetřené konkrétním lékem (Tanioka et al., 2010). Byla prokázána 80% klinická korelace při určování senzitivity nádorů a 100% korelace při určování rezistence nádorů (Kobayashi et al., 1997). Tato metoda má vysokou úspěšnost, vyžaduje malý počet buněk, eliminuje kontaminaci pomocí fibroblastů, zachovává původní růstové charakteristiky, umožňuje vyhodnocení pomocí fyziologických koncentrací léčiv (Tozuka et al., 2013), je velmi jednoduchá a relativně rychlá (Kobayashi, 2005).

4.5.3.2. Metody založené na detekci metabolické aktivity buněk – jednobuněčné kultury

„Methyl thiazoyl-diphenyl-tetrazolium bromide“ (MTT), WST-1, „Succinate dehydrogenase inhibition“ (SDI), Trypanová modř

Jedná se o kolorimetrický test měřící metabolickou aktivitu buněk v kultuře, životnost buněk a cytotoxicitu. Buněčná suspenze nádorových buněk je kultivována s různými chemoterapeutiky po dobu čtyř dní. Poté je přidán methyl thiazolyl-difenyyl-tetrazolium bromid nebo WST-1, což jsou tetrazoliové soli, díky kterým lze detekovat aktivitu mitochondriální dehydrogenázy. Metabolicky aktivní buňky přemění ve vodě rozpustnou tetrazoliovou sůl na ve vodě nerozpustný fialový

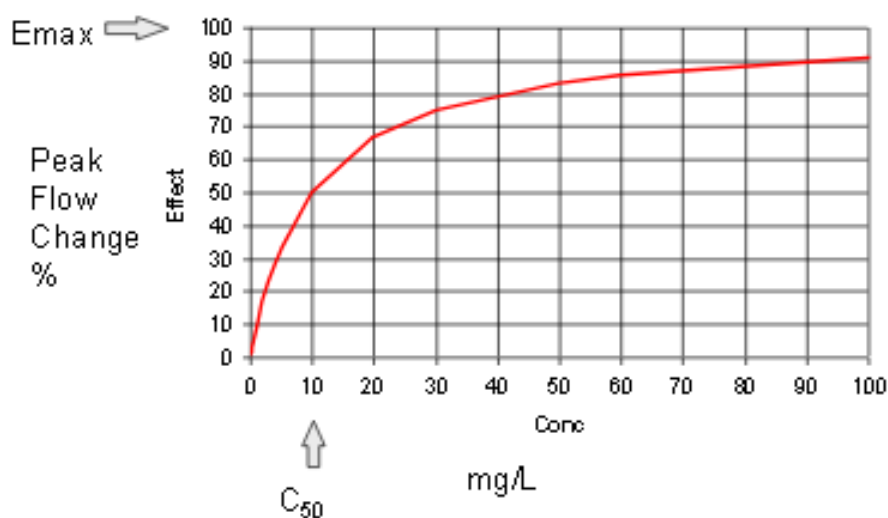
formazan (Ahmadian et al., 2009; Kimura et al., 1992). Po přidání tropanové modři jsou mrtvé buňky obarvené sytě modrou barvou. Živé buňky nemohou být obarvené, protože vylučují ze své cytoplasmy barvivo pomocí ABC transportérů (Allison and Ridolpho, 1980; Strober, 2001). Podle intenzity zbarvení je možné vizuálně či pomocí spektrofotometrie určit životnost buněk podle míry metabolické aktivity buňky, a tím i citlivost nádoru k podaným lékům (Ahmadian et al., 2009; Kimura et al., 1992).

Bioluminescence adenosin trifosfátu (ATP)

Tento test využívá k určení životných buněk množství ATP ve vzorku lyzovaných buněk ošetřených chemoterapeutiky. Toto množství je změřené přidáním luciferinu. Nízká koncentrace ATP se projevuje nízkou luminiscencí. V dnešní době není však příliš využívána kvůli své nepřesnosti. Velkým problémem je degradace ATP buněčnými ATPázami po lyzování buňky (Yu et al., 2017).

„ChemoFX Assay“

Tento test je založen na růstu a krátkodobé primární kultivaci epiteliálních buněk získaných resekci pevných nádorů. Část nádoru odebraného pacientovi je mechanicky disociovaná a kultivovaná v kultivačních baňkách, dokud nepokryjí téměř celé dno nádoby. Poté jsou primární kultury naočkované do mikrotitračních destiček a vystavované rostoucím dávkám vybraných chemoterapeutik. Následně je určený počet živých buněk pomocí automatizovaného cell-counteru. Výsledné počty buněk v ošetřených vzorcích se porovnají s počty živých buněk v neošetřených kontrolních vzorcích. Na základě výsledků se pro každý vzorek vytvoří křivka závislosti účinku každého chemoterapeutika na dávce. Nakonec je u každého podaného léku určena odpověď nádoru na podanou léčbu (Brower et al., 2008; Ochs et al., 2005).



Obr. 5.: Křivka závislosti účinku na dávce. (Holford, 2018)

„Extreme drug resistance assay“ (EDRA)

Buňky jsou vystavené extrémně vysokým dávkám chemoterapeutik, tzn. větším, než je maximální tolerovaná dávka po dobu 5 dnů. Výsledky bývají klinikům dostupné po 5 až 10 dnech. Test slouží k určení pouze rezistence *in vitro*, nikoli senzitivity. Rezistence koreluje s odpovědí *in vivo* v 99,2 % (Joo et al., 2009).

4.5.3.3. Metody založené na detekci metabolické aktivity buněk- 3D kultury

„Histoculture drug response assay“ (HDRA)

HDRA využívá trojrozměrné fragmenty rakovinných tkání všech typů pevných nádorů. Díky tomu lze vyhodnocovat buněčnou odpověď na léky v podmínkách podobných *in vivo*, jelikož buňky udržují intercelulární kontakt. Čerstvě odebrané chirurgické vzorky se nařežou na 1-2 mm³ kusy a nanosou se na želatinovou kulturu napuštěnou kultivačním médiem obsahujícím testované léčivo. Poté se nechají inkubovat po dobu 7 dní a následně je určena životnost pomocí MTT testu. Z tohoto důvodu lze považovat míru úspěšné predikce za vysokou (92,1% korelace mezi klinickou odpovědí a výsledkem testu (Furukawa et al., 1995)) (Hoffman and Vescio, 2018; Ohie et al., 2005).

„Fluorescent cytoprint assay“ - FCA

Vzorky nádoru, které jsou rozřezány na kousky, jsou udržované v kolagenu v průběhu vystavení chemoterapeutickým lékům. Po inkubaci je přidána fluorescenční barva. Buňky jsou následně vizualizované pomocí otisku (Meitner, 1991).

4.5.3.4. Metody na molekulární úrovni

Tyto testy fungují na úrovni detekce exprese genů nebo proteinů ovlivňujících citlivost či rezistenci buněk vůči lékům. Měřená je především exprese p-glykoproteinů, která se snižuje se zvyšující se koncentrací léku v buňkách, dále změny buněčných proteinů, změny v expresi molekul podílejících se na opravě DNA, aktivace onkogenů, exprese růstových faktorů, regulátorů apoptózy a kontrolních bodů buněčného cyklu. Mezi hlavní metody patří FCCA, Western blotting, imunohistochemie, indukce apoptózy pomocí testu DNA difúze, TUNEL assay a PARP assay (Blumenthal and Goldenberg, 2007).

„Flow cytometric chemosensitivity assay“ (FCCA)

FCCA testy se provádí na buňkách v suspenzi, kterým je po inkubaci s léčivem měřena kinetika buněčného cyklu, a tím pádem i jejich životnost (Kubota et al., 1992).

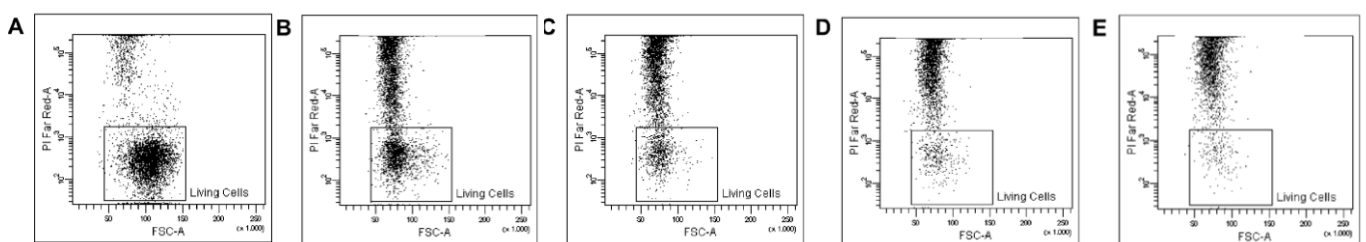
5. FCCA

5.1. Metodika provedení chemosenzitivních testů pomocí průtokové cytometrie

Ze vzorku nádoru odebraného pacientovi je připravená buněčná suspenze pomocí mechanické nebo enzymatické disociace tkáně (Schinköthe, 2008), ve které je poté určený počet životaschopných buněk pomocí průtokové cytometrie. Suspenze se potom naředí tak, aby obsahovala počet životaschopných buněk na požadované úrovni. Následně je rozdělena na požadovaný počet vzorků, který se rovná počtu testovaných léčiv a jejich kombinací plus dva vzorky na negativní a pozitivní kontrolu. Do každého vzorku je přidáný lék, na který chceme znát buněčnou odpověď. Negativní kontrola obsahuje pouze buněčnou suspenzi a slouží jako kontrola správné kultivace. V pozitivní kontrole je buněčná suspenze a cytotoxická látka. Všechny tyto vzorky včetně obou kontrol jsou poté inkubované (Medenica and Powell, 1995).

Potom se obsah zkumavek obarví DNA interkalačními barvami, které obarví DNA mrtvých buněk. Průtokovým cytometrem lze určit počet mrtvých či životaschopných buněk, což vypovídá o účinku cytostatik na buňky a jejich senzitivitě. Chemosenzitivita nádorových buněk vůči testovaným lékům je potom určena porovnáním životnosti buněk ve vzorku s daným lékem vůči vzorku negativní kontroly. Lze tak získat přesnou odpověď o chemosenzitivitě či rezistenci nádorových buněk vůči chemoterapeutikům během 48-96 hodin od doby, kdy byl vzorek nádoru odebraný pacientovi (Medenica and Powell, 1995).

Následující bodové diagramy (B-E) znázorňují úbytek živých buněk během čtyřdenní kultivace nádorových buněk s fludarabinem. Živé buňky jsou ohraničené čtvercem. Buňky kultivované po dobu 4 dní bez chemoterapeutika (negativní kontrola) jsou zobrazené na diagramu A.



Obr. 6.: Bodové diagramy cytometrické analýzy. (Schinköthe, 2008)

Při použití automatizované průtokové cytometrie může být vyhodnocené několik stovek až tisíců léků a jejich kombinací. Umožňuje také, oproti jiným CSRA, zkrátit dobu inkubace s cytotoxickými léky a tím zajišťuje zachování vlastností buněk, které se s prodlužující dobou mimo lidské tělo začínají ztrácet (Ballesteros, 2010). Buňky *in vitro* se přizpůsobují novým podmínkám, protože ztrácí kontakt s extracelulární matrix. Ta přitom ovlivňuje řadu aspektů jako je homeostáza, morfogeneze, diferenciací kmenových buněk, vývoj a průběh onemocnění (Abdeen et al., 2016). Díky krátké době inkubace je také možné vyhodnotit testy ještě před zahájením léčby (Ballesteros, 2010).

5.1.1. Postup

Pro tento test lze použít vzorky z jakéhokoliv typu nádoru. Lze ho provádět na pevných nádorech získaných chirurgickým zákrokem nebo biopsií, z ascitické tekutiny, aspirátu kostní dřene, pleurální tekutiny a podobně (Hofmann et al., 1984). Dále je možné využít tzv. tekutou biopsii („fine needle aspiration biopsy“ – FNAB) Tím je možné rozpoznat nádorové onemocnění v časných fázích a sledovat léčebnou odpověď po celou dobu léčby. Její výhodou je, že je daleko šetrnější, než jiné druhy odběrových metod, dále umožňuje komplexnější přístup k léčbě, protože nám dává možnost získat informace o charakteru celého heterogenního nádoru (Kubackzová et al., 2017).

Po odebrání se nádor umístí do transportního média. Pevné nádory se nejprve mechanicky nebo enzymaticky disociují. Po disociaci nádoru se malé kousky umístí do homogenizéru. Ke vzorkům se přidá 5 ml transportního média a ty se poté homogenizují. Supernatant se odpipetuje a buňky jsou suspendovány v kultivačním médiu. Tím je nádorová tkáň převedena na jednobuněčnou suspenzi. Buněčná suspenze by měla obsahovat 10^5 - 10^6 buněk v 1 ml. Vzorek o objemu 1 ml by měl obsahovat 0,15-0,2 ml buněčné suspenze (Huang et al., 2007). Poté se do jedné čisté zkumavky přidá dobře promíchaná buněčná suspenze se 0,4% barvivem Trypan Blue (případně MTT) a kultivačním médiem v poměru 1:2:7. Vše se promíchá a vloží do cytometru. Tím se zjistí procento živých buněk v suspenzi, která se následně naředí podle toho, na jaký podíl živých buněk jsou léky připraveny. Procento životaschopných buněk se určí jako poměr životaschopných buněk k celkovému počtu buněk $\times 100\%$ (Medenica and Powell, 1995).

Pokud je v přítomném vzorku koncentrace větší, než na jakou jsou léky připravené, měla by být suspenze naředěna kultivačním médiem na požadovanou koncentraci. Pokud je ve vzorku koncentrace životaschopných buněk nižší než požadovaná koncentrace, je potřeba naředit podávané léky tak, aby odpovídali buněčné koncentraci. Léky se podávají v koncentracích 0,01 $\mu\text{g/ml}$ - 1 mg/ml . Toto ředění se provádí přidáním většího množství buněčné suspenze. Do zkumavek se přidává 1 ml buněčné suspenze pro každou řádovou hodnotu, menší než je požadovaná hodnota (Medenica and Powell, 1995).

Do sterilních mikrotitračních destiček se napipetuje buněčná suspenze a kultivační médium v poměru 2:8. To bude sloužit jako negativní kontrola. Další sterilní mikrotitrační destičky jsou označené pro jednotlivá léčiva, která budou při testování použita. Poslední je označená jako pozitivní kontrola, která obsahuje cytotoxické činidlo (např. toxalbumin) nebo sůl, která zabíjí buňky změnou osmotického tlaku (Schinköthe, 2008), kultivační médium a buněčnou suspenzi v poměru 1:7:2. Jednotlivé mikrotitrační destičky se naplní roztokem léčiva, kultivačním médiem a buněčnou suspenzí v témže poměru. Všechny vzorky jsou následně inkubované po dobu 48 hod při 37°C s 5% CO₂ (Medenica and Powell, 1995).

Po inkubaci jsou zkumavky centrifugované při vysokých otáčkách po dobu 3 min. Supernatant je odpipetován a pelet je následně suspendován. Do každého vzorku s léčivem a kontrolního vzorku s fluorescenčními protilátkami je přidáno interkalační barvivo - například propidiumjodid, DAPI, DRAQ7, 7-AAD nebo TO-PRO-3. Tyto interkalační barvy obarví DNA těch buněk, u kterých došlo k porušení integrity membrány, to znamená u mrtvých buněk. Asi 10 min po přidání barviva mohou být všechny zkumavky proměřeny na průtokovém cytometru a následně je určena životnost buněk ve vzorcích. (Davies, 2015).

Vzorky jsou změřené průtokovým cytometrem. Nejprve je vygenerovaný bodový diagram ze vzorku negativní kontroly, podle kterého jsou upravené kontrolní body tak, aby pozice hlavní buněčné populace byla ve středu diagramu. Poté jsou přidávána data z každého vzorku obsahujícího léčivo. Každý vzorek obsahující léčivo je porovnán s negativní kontrolou. Na analýzu procentuální životnosti buněk v jednotlivých vzorcích se použije software pro analýzu průtokové cytometrie. Naměřené hodnoty se následně sepíší do tabulky (Schinköthe, 2008).

Pokud je mrtvých buněk více než 75 %, lze buňky označit jako vysoce citlivé k danému léku. Jestliže se počet mrtvých buněk pohybuje někde mezi 75-30 %, považujeme to za střední citlivost nádorových buněk k léku. Nízká citlivost se uvádí, pokud se procento mrtvých buněk pohybuje mezi 15-30 %. Pokud je mrtvých buněk méně než 15 %, mluvíme již o rezistenci buněk k danému léku (Medenica and Powell, 1995).

Podle výsledků FCCA je volen v klinických výzkumech léčebný režim testovaného pacienta. Je nutné používat v *in vitro* testech takové koncentrace, které jsou dosažitelné v dávkách *in vivo* v klinické praxi. U každého léku je uvedena hodnota C_{max} , která určuje maximální koncentraci léku v plazmě. Je to údaj o nejvyšší koncentraci, které může být pacient vystaven během léčby a zároveň je považována za nejvyšší koncentraci léčiva, která může být použita během *in vitro* studií. Terapeutického účinku bývá dosaženo i po podání nižší koncentrace než je C_{max} . Pokud jsou pro testování použité vyšší koncentrace, zvyšuje se pravděpodobnost ovlivnění výsledků testů nežádoucími účinky léku. Výsledky také může ovlivnit snížení koncentrace dostupných léků způsobené vazbou léčiva na proteiny. Léky se podávají v koncentračním rozmezí od 1,5 ng/ml - 1mg/ml (Liston a Davis 2017). Obecně jsou vybírány ty léky, na které byla prokázána nejvyšší senzitivita buněk. Obvykle se neuplatňuje více než deset léků, z čehož čtyři z nich bývají modifikátory buněčné odpovědi, z nichž jeden obvykle bývá hormon. Po výběru nejúčinnějších léků musí být však upravená jejich dávka tak, aby celková toxicita režimu nebyla příliš vysoká (Medenica a Powell 1995).

6. Cytometrie

6.1. Statická cytometrie

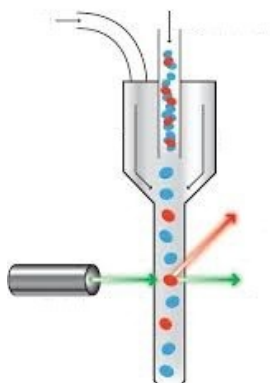
Statická cytometrie vyhodnocuje vlastnosti buněk pomocí konfokálních mikroskopů. Buňky jsou tedy statické a nejsou unášeny proudem tekutiny, jako je tomu u průtokové cytometrie. Mezi statické cytometrické metody patří například mikroskopie spojená s počítačovou analýzou obrazu, laserová rastrovací mikroskopie či mikrodenzitometrie (Shapiro, 2005). Oproti průtokové cytometrii je však u obrazové cytometrie možnost trojrozměrného zobrazení dat. Může být tedy použita k analýze složitějších vzorků (Kuksin et al., 2016).

6.2. Průtoková cytometrie

V průtokové cytometrii protékají buňky v suspenzi jednotlivých částic skrz průtokový cytometr, který zaznamenává vlastnosti buněk podle předem zvolených charakteristik pomocí mechanických nebo elektrických prostředků. Tato metoda nachází uplatnění v onkologii, imunologii, hematologii a farmakologii. Výhodami průtokové cytometrie jsou její přesnost, rychlost, dobrá reprodukovatelnost výsledků a citlivost metody. Dále je to robustnost testu, neboli schopnost metody zůstat neovlivněna malými změnami, či její velice silná statistika. Umožňuje nám analyzovat velké množství materiálu za poměrně krátkou dobu a v případě potřeby je možné si buňky roztrždit dle vybraných vlastností. Velkou nevýhodou této metody naopak je nutnost separace buněk, což vede ke ztrátě buněčné integrity a jejich některých vlastností. Nedávné trendy v tomto oboru zahrnují jednobuněčnou spektroskopii, jednobuněčnou hmotnostní spektroskopii či vývoj buněčných třídačů (Mattanovich and Borth, 2006; Shapiro, 2005; Strate and Longdin, 2017).

6.2.1. Průtokový cytometr

V průtokovém cytometru je buněčná suspenze unášena proudem unášecí tekutiny, která vytváří laminární proudění umožňující buňkám procházet jednotlivě přes měřící bod. V tomto bodě se dostávají buňky do kontaktu s paprskem monochromatického světla. Světlo je emitováno do všech směrů a přes optiku je nasměrováno na řadu filtrů a dichroických zrcadel, která oddělují jednotlivé vlnové délky světla. Světelné signály jsou detekované pomocí fotonásobičů nebo fotodiod a digitalizované pro počítačovou analýzu (Brown and Wittwer, 2000).



Obr. 7.: Schéma průtokového cytometru (Langhansová, 2011)

6.2.2. Princip metody

Do průtokového cytometru je vložena suspenze vytvořená z heterogenní směsi buněk obarvených fluorescenčními barvami. Tyto barvy se na buňky váží, nebo interkalují s různými buněčnými složkami. Vzorek buněčné suspenze prochází fluidním systémem cytometru a následně je vháněn do kyvety, kterou protékají jednotlivé buňky postupně. Buňky následně procházejí světelným systémem, kde je několik dotazovacích bodů, ve kterých postupně procházejí několika laserovými paprsky.

Každý parametr je detekovaný jako délka a profil světelného pulzu v délce několika málo mikrosekund. Fluorescenčně značené buňky po průchodu světelným zdrojem emitují fluorochromy. Při použití více fluorochromů o stejné excitační vlnové délce a odlišných emisních vlnových délkách je možné měřit současně více buněčných vlastností. Jednotlivé parametry jsou zachycené pomocí detektorů optického a elektronického systému, který je konvertuje na elektrické signály. Tyto signály vyhodnocené detektorem jsou ukládány počítačově řízeným systémem pro každou jednotlivou buňku zvlášť a korelovány s morfologií a fyziologií jednotlivých buněk, expresí genů či fází buněčného cyklu, ve které se daná buňka nachází. Rozptyl světla v různých úhlech rozlišuje rozdíly ve velikosti a vnitřní složitosti buňky, emitované světlo identifikuje povrch a obsah cytoplazmy buňky. Podle předem nastavených parametrů jsou určovány počty buněk v jednotlivých skupinách. (Brown and Wittwer, 2000; Ibrahim and Engh, 2007; Mattanovich and Borth, 2006; Radcliff and Jaroszeski, 1998)

6.2.3. Analýza dat

Data získaná pomocí průtokové cytometrie mají grafický a statistický charakter. Nejčastěji jsou pro vizualizaci dat používané jednorozměrné histogramy nebo dvourozměrné bodové grafy. Histogramy nabízejí velmi jednoduchý a přehledný způsob interpretace dat, ze kterého lze vyčíst průměr fluorescence, distribuční statistiky či procento pozitivně exprimujících částic oproti kontrolnímu vzorku. Navíc je možno histogramy navzájem překrývat, aby byly dobře patrné kvalitativní a kvantitativní rozdíly ve více vzorcích. Dvouparametrické grafy jsou složitější na interpretaci, je ale možné z nich vyčíst více informací (Radcliff and Jaroszeski, 1998).

6.2.4. Hmotnostní cytometrie

Jedná se o analytickou metodu, která se využívá k získávání multiparametrických dat o jednotlivých buňkách a ke stanovení elementárního složení vzorku. Princip metody spočívá v ionizaci vzorku a následného měření hmotností vzniklých iontů. V této metodě se používají protilátky značené ionizovanými atomy kovů vzácných zemin. Vyhodnocují se stabilní izotopové značky připojené k protilátkám za použití chelatačních činidel. Analýza probíhá pomocí hmotnostní spektrometrie s průletovým analyzátozem. Naměřená data jsou převedena do standardního formátu průtokové cytometrie a lze tedy využít standardní analytické platformy. Tato metoda umožňuje měření 50-135 parametrů na buňku, a to tím, že umožňuje současné použití více stabilních izotopů kovů

a hmotnostní spektrometr má vynikající rozlišení mezi jednotlivými detekčními kanály. Při použití běžných fluorescenčně značených protilátek vzniká omezení způsobené překryvem spekter fluorescenčních značek (Bandura et al., 2009; Ornatsky et al., 2010). Hmotnostní cytometrie také umožňuje přímé sledování vlivu cytotoxických léků (Behbehani et al., 2015).

7. Rešerše výsledků studií CSRA

7.1. ASCO- rešerše studií vydaných mezi lety 1966 a 2010

Podle studií publikovaných za posledních 40 let a výsledků testů více než 15000 pacientů s nádorovým onemocněním je jednoznačně prokazatelné, že pomocí CSRA testů lze s 80-100% úspěšností předpovědět resistenci vůči lékům. Citlivost nádoru na daný lék je možné předpovědět pouze s 50-80% úspěšností. Bylo také dokázáno, že rezistence nádoru vůči léku nesouvisí s typem nádoru (Volm and Efferth, 2015). I přesto však CSRA testy nebyly zařazeny do běžné klinické praxe.

Americká společnost klinické onkologie prováděla přezkoumání studií v letech 2004 a 2011. Tyto rešerše sloužily jako technologické hodnocení CSRA s cílem definovat roli těchto testů v běžné klinické praxi. ASCO spolupracovala s centrem vyhodnocování technologií v BCBSA („Blue Cross and Blue Shield Association“), kde bylo již dříve provedeno systematické prozkoumání tohoto tématu. ASCO tedy využila přístupu k tomuto systematickému přehledu pro vývoj technologického hodnocení. Byla vytvořena nezávislá kritéria výběru studií, které byly do posudku zařazené. Studie musely srovnávat výsledky u pacientů, u nichž byla chemoterapie vybraná podle doporučení vydaných na základě literatury z klinických studií, s pacienty, u kterých byla chemoterapie zvolená na základě výsledků CSRA. Dále studie musely obsahovat výsledky minimálně 20 pacientů na skupinu. Do rešerše nebyly zahrnuté analýzy, které pouze porovnávají výsledky CSRA testů s klinickými výsledky (Burstein et al., 2011; Schrag et al., 2004).

V roce 2004 bylo nezávisle přezkoumáno 1139 studií publikovaných mezi léty 1966 a 2004. Pouze 17 abstraktů splňovalo výše uvedená kritéria pro zařazení do posudku. Po přezkoumání úplného obsahu těchto studií bylo vybráno 11 článků. Dalších 20 článků získala ASCO od firem prodávajících chemoterapeutika, avšak pouze 1 splnil kritéria pro zařazení do posudku. ASCO tedy přezkoumalo pouze 12 studií publikovaných v průběhu 38 let. Tyto rešerše zahrnovaly testy pomocí SRCA, HTCA, CCS, DiSC, MTT, ATP a EDR (Schrag et al., 2004).

Dvě studie byly založeny na HTCA testech. V první studii reagovalo na léčbu pomocí CSRA jen 25 % pacientů. Ze zbytku pacientů léčených standardní léčbou reagovalo na léčbu pouze 14 %. V mnoha případech nemohly být nádory zkoumané, protože nebyly schopné růst na živném médiu. Ve druhé studii reagovalo na léčbu pomocí CSRA 28 % pacientů. Na standardní léčbu pouhých 11 %. U této studie je dále uvedeno, že nesrovnávala přímo terapii určenou CSRA se standardní terapií.

Ve studii pomocí CCS reagovalo na léčbu 21 % pacientů, kteří byli léčeni pomocí CSRA testů. Na standardní léčbu reagovala pouze 3 % pacientů. I přes velký rozdíl výsledků odpovědi na léčbu zde nebyl žádný rozdíl v přežití pacientů (Schrag et al., 2004).

Pomocí DiSC byly provedeny 4 vybrané studie. V první studii mělo odpověď na léčbu 25% pacientů léčených pomocí CSRA. Jen 7 % z pacientů léčených standardně mělo odpověď na léčbu. Ne všichni pacienti, kteří se úspěšně podrobili těmto testům, dostali léčbu podle jejich výsledků. Ve druhé studii mělo reakci na léčbu pomocí CSRA 36 % pacientů. Není zde ale porovnání k standardně léčené skupině. Ve třetí studii reagovalo na léčbu pomocí CSRA 16 % pacientů. Na standardní léčbu reagovalo pouze 11 % pacientů. I v této studii byly problémy s růstem velkého počtu nádorů na kulturách. Čtvrtá studie už přinášela lepší výsledky. Celých 100 % pacientů reagovalo na standardní léčbu i na léčbu pomocí CSRA. Lepší přežití měli však pacienti léčení pomocí CSRA (Schrag et al., 2004).

Ve studii CSRA pomocí MTT reagovalo na léčbu 77 % pacientů, na standardní léčbu jen 39 %. Studie pomocí ATP testů udává úspěšnou léčbu pomocí CSRA v 64 % případů a pomocí standardní léčby v 37 %. Podobné výsledky má i test EDR, ten je úspěšný pro CSRA v 56 % a pro standardní léčbu ve 28 %. Více vyrovnané výsledky jsou ve studii pomocí SRCA. Úspěšná léčba pro CSRA byla zaznamenána v 62 % a pro standardní léčbu v 59 % (Schrag et al., 2004).

V roce 2011 byly shromážděny nové publikace vydané mezi 1. prosincem 2003 a 31. květnem 2010, a dále byly přidány další studie, metaanalýzy a recenze. Celkem bylo vyhledáno 12 611 článků, z čehož pouze 21 článků splňovalo předem stanovená kritéria (stejná, jako v roce 2004) pro zahrnutí článku do přezkoumání, k čemuž bylo přidáno 5 náhodných kontrolních studií. Po přezkoumání této literatury splňovalo tyto kritéria pouze 5 studií (Burstein et al., 2011).

Výsledky studie provedené za pomocí ATP testu prokázaly úplnou odezvu u 40,5% pacientek s recidivujícím karcinomem vaječníků, zatímco ve skupině standardně léčených pacientek dosáhlo úplné nebo částečné odezvy 31,5% (Cree et al., 2007).

Další studie analyzuje výsledky 353 pacientů s rakovinou žaludku. Pacienti léčení pomocí MTT testů měli 47,5% míru přežití, u standardně léčených pacientů byla míra přežití 45,1 % (Wu et al., n.d.).

Jiná studie zase hodnotí výsledky 78 pacientů, kdy míra přežití pacientů léčených standardní léčbou byla 71,8%, ze skupiny léčené s ohledem na EDR testy přežilo 84,5% pacientů (Joo et al., 2009).

Do rešerše byla zařazená i studie pomocí testu ChemoFX, avšak její výsledky nebyly porovnané s jinými výsledky chemoterapeutické odezvy ani s klinickým standardem.

I přes značné rozdíly v úspěšnosti léčby, podle ASCO přezkoumání literatury nevyhodnotilo výsledky studií chemosenzitivity a rezistence jako dostatečné, na jejichž základě by se měla CSRA využívat v onkologické praxi.

Společnost ASCO vydala na základě provedené rešerše doporučení pro využívání CSRA, která jsou následující: „Využití CSRA pro výběr vhodných terapeutik jednotlivých pacientů se nedoporučuje mimo klinické studie. Onkologové by měli volit chemoterapeutickou léčbu na základě publikovaných klinických studií, pacientova zdravotního stavu a léčebných priorit. Výběr chemoterapeutik na základě výsledků testů není na základě současných studií opodstatněný.“ I nadále však doporučuje pracovat na klinických testech těchto technologií a shledává v CSRA potenciální význam (Schrag et al., 2004; Burstein et al., 2011).

Ke stejnému závěru dospěla i NCCN („National Comprehensive Cancer Network“). Podle ní také neexistuje dostatečný počet důkazů, které by vedly k nahrazení standardně volené chemoterapeutické léčby CSRA testy. Podle NCCN by neměly být testy prováděné s cílem volby vhodného chemoterapeutického režimu, a to z důvodu nedostatečně prokázaných účinků. Nicméně uvádí, že v některých členských státech se CSRA testy používají v případech, kdy existuje více možností standardní formy terapie (NCCN 2018).

7.2. Rešerše studií mimo průtokovou cytometrii vydaných mezi lety 2010-2017

Bylo přezkoumáno 10 studií publikovaných mezi lety 2010 a 2017. Byly použity různé typy chemosenzitivních testů, jako například ATP, HDRA, MTT, CTR, ChemoFX a CD-DST. Dvě třetiny těchto studií se zabývaly léčbou rakoviny vaječníků, zbytek se zabýval různými nádory, např. nádory mozku, nemalobuněčným karcinomem plic či nádory hlavy a krku. Šest těchto studií bylo provedených retrospektivně, to znamená, že byly porovnány výsledky CSRA testů a očekávaných reakcí na léčbu s klinickou odpovědí. Ve zbylých třech se jednalo buďto o kombinaci standardní a indukované léčby nebo o léčbu založenou na CSRA testech. Hned ze začátku je nutno podotknout, že všechny tyto studie vypovídají ve prospěch CSRA testů a všechny z nich potvrdily lepší výsledky léčby volené na základě těchto testů nebo pozitivní korelaci mezi výsledky testů a klinickým průběhem. Některé uvádějí, že by bylo užitečné využívat *in vitro* CSRA testy pro personalizovanou volbu chemoterapie.

V retrospektivních studiích byla hodnocená korelace mezi *in vitro* testem chemosenzitivity a klinickou citlivostí na léky. Většinou byly vzorky nádorů testované na citlivost či rezistenci na vybrané léky a následně bylo porovnáváno, jestli klinická odpověď na léčbu byla srovnatelná s očekávanou odpovědí podle výsledků CSRA.

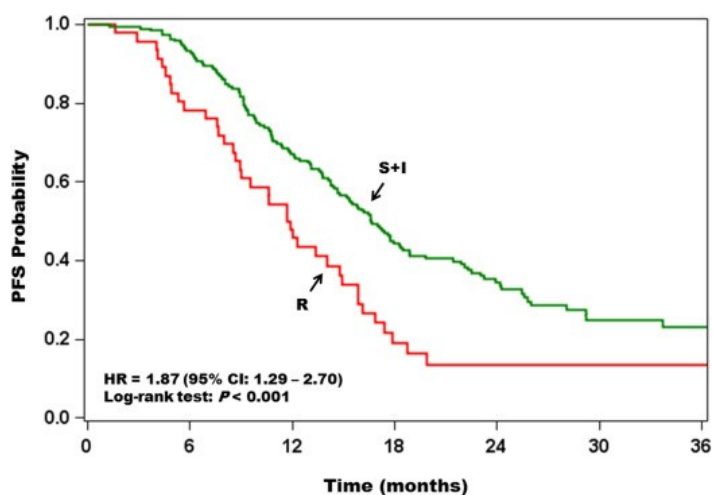
V první studii z roku 2010 bylo testováno 69 vzorků ATP testem chemosenzitivity. Podle výsledků byli pacienti rozřazeni do tří skupin podle míry citlivosti na podanou léčbu. Korelace mezi výsledky zjištěnými ATP testem chemosenzitivity a klinickými výsledky byla statisticky analyzovaná

Chí kvadrát testem. Citlivost ATP testů k předpovědi klinické chemosenzitivity recidivujícího epitelálního karcinomu vaječníků byla 87,5 %. Pacienti označení *in vitro* testy jako citliví měli významně delší dobu přežití, než pacienti, kteří se podle *in vitro* testů jeví jako rezistentní (Zhao et al., 2010).

O rok starší studie využila MTT testů pro testování 71 vzorků. Všechny pacientky byly léčeny pomocí standardní léčby. Častější výskyt recidivy byl prokázán u pacientek, u kterých byla *in vitro* zjištěna rezistence na jeden z podávaných léků (61,5% u karboplatiny a 66 % paklitaxelu) (Sedláková et al., 2011).

Jiná studie zase testovala 79 vzorků nádorů na 11 různých chemoterapeutických přípravků a následně analyzovala retrospektivně korelaci mezi chemosenzitivitou zjištěnou *in vitro* pomocí HDRA a klinickými odezvami pacientek. Pacientky léčené chemoterapeutikem, na které jim byla zjištěná vysoká citlivost, měly o 9 měsíců delší průměrnou dobu přežití než pacientky léčené podle standardní léčby lékem, na který jim vyšla rezistence (Lee et al., 2012).

Čtvrtá studie se zabývá predikcí rezistence epitelálního karcinomu vaječníků na platinu pomocí ChemoFX testu. Bylo testováno 276 pacientek v průměrném věku 61 let, které byly ve III. nebo IV. stádiu rakoviny vaječníků nebo vejcovodů. Všechny pacientky podstoupily chirurgickou léčbu a poté byly léčené pomocí léčebného režimu platina/paklitaxel. U 19,1 % pacientek byla zjištěna rezistence na karboplatinu a u 21,7 % pacientek byla zjištěna rezistence na paklitaxel. Pacientky, rezistentní na karboplatinu měly medián přežití bez progresse onemocnění 11,8 měsíců. Oproti tomu pacientky s citlivým nebo středně citlivým nádorem měly medián přežití bez progresse onemocnění 16,6 měsíce při $P < 0,001$. Tento rozdíl v přežití bez progresse onemocnění je zobrazen na následující Kaplan-Meierově křivce. Citlivé a středně citlivé pacientky jsou označené zeleně, rezistentní pacientky jsou označené červeně (Krivak et al., 2014).



Obr. 8.: Kaplan-Meierova křivka přežití bez progresse onemocnění. (Krivak et al., 2014)

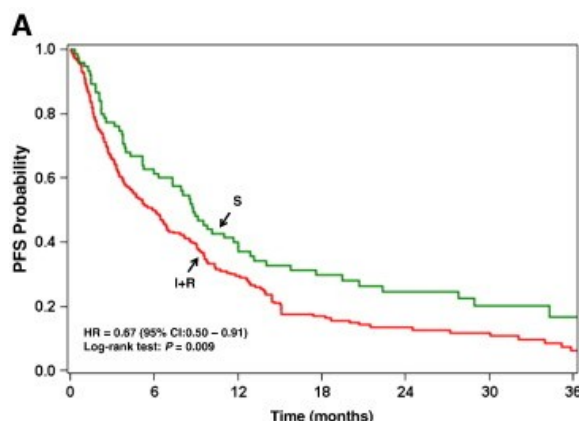
Nádory vykazující rezistenci na karboplatinu měly vyšší pravděpodobnost vzniku recidivy při standardní léčbě. Tyto nádory byly v 59 % citlivé nebo středně citlivé na minimálně jeden z pěti dalších, běžně užívaných léků, které byly také testovány. To potvrzuje užitečnost testu pro výběr vhodného chemoterapeutika mimo standardní režim. Při testování pouze 7 % pacientek bylo rezistentních na všech 7 testovaných léků (karboplatina, cisplatina, gemcitabin, doxorubicin, paklitaxel, docetaxel, topotekan). Z 93 % pacientů nevykazujících úplnou rezistenci na všechny testované léky bylo 35 % středně citlivých na nejméně jeden lék a 58 % bylo citlivých na alespoň jeden lék. Jen 5 % pacientek bylo citlivých na všechny látky. Citlivost k oběma podávaným lékům vykazovalo 75,5 % pacientek. Naopak rezistenci k oběma podaným lékům vykazovalo rezistenci 15,9 % pacientek. Zbytek pacientek byl rezistentní alespoň k jednomu podanému léku (5,9 % na karboplatinu a 2,7 % na paklitaxel) (Krivak et al., 2014).

Nejnovější studie z roku 2017 využívají testů CTR („chemotherapy resistance test“) a ChemoFX. V první z nich byl proveden test pro specifická chemoterapeutika na 52 pacientkách trpících rakovinou vaječnicků. Přesná predikce citlivosti byla provedena v 79 % případů, zatímco přesná predikce rezistence byla provedena ve 100 % případů (Kischkel et al., 2017).

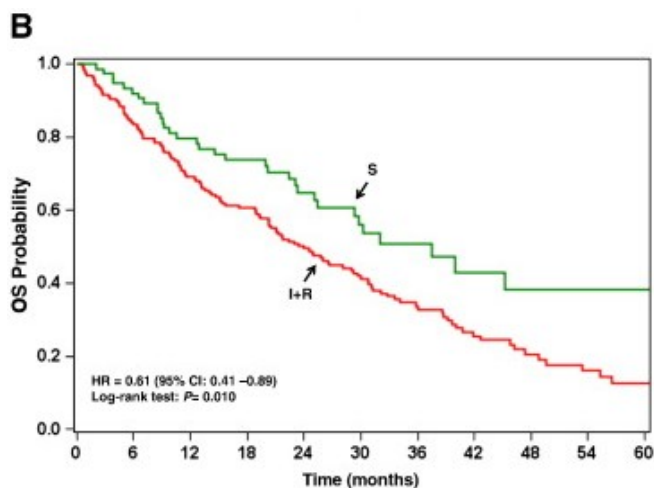
Další ze studií testovala 11 karcinomů hlavy a krku pomocí ChemoFX testu. Tři pacienti vykazovali dobrou odpověď na léčbu a šesti pacientům selhala chemoterapeutická léčba během šesti měsíců. Těmto šesti pacientům vyšel CSRA test na podané léky jako rezistentní (Jamal et al., 2017).

V roce 2013 se Rutherford a jeho výzkumná skupina snažili nezaujatě zhodnotit použití CSRA testů pro efektivní výběr léčby. Bylo odebráno 262 vzorků nádorů vaječnicků. Pacientky byly léčené pomocí standardní léčby zvolené onkologem, který neměl přístup k CSRA testům. Po prokázání progresu onemocnění teprve mohl lékař nahlédnout do výsledků CSRA testů, což se stalo u 32 % pacientek. Z 208 vzorků bylo 48 % nádorů buďto středně citlivých nebo rezistentních na všech 7 léků. Jen 10 % nádorů bylo citlivé na všechny léky (Rutherford et al., 2013).

Následující grafy zobrazují rozdíl v přežití bez progresu onemocnění a v celkové době přežití u pacientek léčených léky, na které byly podle CSRA citlivé (zelená křivka), oproti pacientkám léčeným léky, na které byly podle CSRA středně citlivé nebo rezistentní (červená křivka).



Obr. 9.: Doba přežití pacientů bez progresu onemocnění. (Rutherford et al., 2013)



Obr. 10.: Celková doba přežití pacientů. (Rutherford et al., 2013)

V následujících třech studiích byly CSRA testy použity pro volbu vhodné chemoterapie. Nejstarší studie se zabývá volbou chemoterapeutické léčby maligních gliomů pomocí HDR testů. Všem 33 pacientům byla vybrána nejcitlivější chemoterapeutická léčba z předem vybraných testovaných chemoterapeutik podle výsledků CSRA testů. Třináct z třiceti tří pacientů podstoupilo úplnou resekci nádoru. Z toho u dvanácti pacientů se neprojeví žádné známky nemoci a u jednoho pacienta byla odhalena progresse nemoci. Míra odpovědi u zbylých dvaceti pacientů, kteří měli zbytkové nádory, byla 55 %. Tři z nich vykazovali kompletní odpověď a osm odpověď částečnou. HDRA v aplikované léčbě prokázala 100% citlivost při zařazení více než jednoho citlivého léku (Gwak et al., 2011).

Další z nich si vzala za cíl určit účinnost ATP testu při volbě chemoterapie pro 113 pacientek s recidivujícím epiteliálním karcinomem ovarií. Z toho 56 pacientek bylo léčeno podle výsledku CSRA testů a 57 jich bylo léčeno standardně. V první skupině řízené CSRA se vyskytla celková odpověď ve 37 případech z 56, což odpovídá 66%. U druhé skupiny se vyskytla celková odpověď pouze ve 26 případech z 57, což odpovídá 46 % (Gao et al., 2013).

Nejnovější z těchto tří studií se věnovala vlivu CD-DST testů určujících adjuvantní chemoterapii pacientů s nemalobuněčným karcinomem plic po úplné resekci nádoru. Do studie bylo zařazeno 39 pacientů, jejichž vzorky byly podrobeny tomuto testu. Část pacientů (n = 25) byla citlivá na testované léky a byli léčeni jedním nebo dvěma chemoterapeutiky, která byla indikována pomocí CD-DST jako účinná. Zbytek pacientů, kteří podle výsledků CSRA nebyli citliví k testovaným lékům, byli léčeni jinými chemoterapeutiky, která nebyla testovaná pomocí CSRA. Z první skupiny pacientů nemělo 32,3 % recidivu během následujících pěti let. Z druhé skupiny bylo bez recidivy po pěti letech pouze 14,3 % pacientů (Akazawa et al., 2017).

7.3. Rešerše studií pomocí průtokové cytometrie vydaných mezi lety 2010-2017

Průtoková cytometrie se ukázala jako vhodná metoda pro CSRA. Multiparametrická průtoková cytometrie je dostatečně citlivá, specifická a může spolehlivě detekovat nádorové buňky i na submikroskopické úrovni (Buccisano et al., 2012). Přesto je využití pro CSRA testy velmi ojedinelé a množství studií a dostupné literatury je značně omezené.

Yokosuka a jeho výzkumná skupina označili tuto metodu jako prospěšnou, protože dokáže vyloučit neúčinné léky pro jednotlivé pacienty trpící leukémií. Metoda pomocí průtokové cytometrie je pro leukemické vzorky spolehlivější, než např. MTT, která nedokáže rozlišit nádorové buňky od zdravých, a také není vhodná v případech, kdy je v kostní dřeni nebo krvi nízký počet nádorových buněk (Yokosuka et al., 2013).

Tato studie se zabývala určením apoptotického signálu buněk po podání 9 různých chemoterapeutik pomocí detekce změny transmembránového potenciálu mitochondrií, ke které dochází při apoptóze. Poté porovnávala výsledky těchto testů pro prednisolon s klinickou odpovědí 18 pacientů trpících akutní lymfoblastickou leukémií, aby vyhodnotila spolehlivost FCCA. Všichni pacienti byli léčeni prednisolonom, který je podle studií nejúčinnějším chemoterapeutikem pro tento typ leukémie. Výsledky těchto testů vykazovaly signifikantní korelaci s klinickou odpovědí ($p=0,005$). Průtoková cytometrie byla označena za spolehlivou metodu pro určení klinické odpovědi na chemoterapeutika. I tato studie tedy potvrdila spolehlivost této relativně jednoduché a levné metody a stejně jako mnohé další studie zmiňuje možnost její další aplikace do klinické praxe (Yokosuka et al., 2013).

Stejný názor má polská výzkumná skupina, která vydala v roce 2015 studii, ve které porovnávala citlivost vůči lékům *in vitro* s klinickou odpovědí u pacientů trpících chronickou lymfocytární leukémií. Tato skupina došla ke stejnému názoru, jako skupina předchozí. I jejich studie potvrdila, že tyto testy mohou být užitečné pro určování individuální léčby pacienta (Rogalińska et al., 2015).

Tato skupina hodnotila *in vitro* odpověď na základě pěti faktorů: životnost buněk, míra apoptózy, diferenciální skenovací kalorimetrie. Jedná se o relativně rychlou metodu zkoumající termální profil buňky. Poskytuje údaje o fyzikálních a energetických vlastnostech buněčných struktur. Dále byl použitý Western blotting (identifikace proteinů pomocí barvení protilátkami). Změny termálních profilů buněk se shodovaly s hromaděním apoptotických buněk a s poklesem životaschopných buněk. Naopak žádné významné změny nebyly pozorované, pokud byla buňka k léku rezistentní.

Studie se zúčastnilo 28 pacientů, kteří byli léčeni kombinací analogů purinu (kladribin a fludarabin) s mafosfamidem. Počet životných a apoptotických buněk byl určený pomocí průtokové cytometrie. Bez odpovědi na léčbu bylo 5 pacientů. Čtyřem z nich to předpověděly výsledky CSRA

testů, pátý pacient měl podle CSRA střední odpověď na léky. Jen u 3 pacientů s částečnou odpovědí se shodovaly výsledky *in vitro* a *in vivo*. U 6 pacientů vyšla v CSRA částečná citlivost, přitom se jejich nádory chovaly jako úplně citlivé k léčbě. Opačně tomu tak bylo také u 6 pacientů. Kompletní odpověď byla prokázána *in vivo* i *in vitro* u 8 pacientů. Jako statistická analýza byl použit Fisherův exaktní test. Byla prokázána významná korelace mezi *in vitro* testy a klinickou odpovědí pacientů ($p=0,017$). Z výsledků bylo patrné, že každý pacient má rozdílnou citlivost a reakci na podaný lék. Ani jeden výsledek testovaného pacienta nebyl shodný s kterýmkoliv jiným. Proto by tyto testy měly být použité pro personalizovanou medicínu (Rogalińska et al., 2015).

Predikce těchto testů by se podle jedné nedávné studie dala vylepšit testováním nádorové tkáně ve 3D strukturách. Jak již bylo popsáno a vysvětleno, disociací ztrácejí buňky kontakt s okolními buňkami a mohou se tak měnit jejich reakce i chování. Proto byla vyvinutá metoda, kdy jsou výhody průtokové cytometrie spojeny s mikrofluidikou, díky které lze lépe napodobit fyziologickou podstatu tkáně, a tím zlepšit prognostickou kapacitu testu. Testování nádorů je prováděno na lidských buňkách hepatocelulárního karcinomu, které jsou využité k vytvoření nádorových sféroidů. Ty jsou kultivované a inkubované s léky uvnitř mikrofluidního přístroje. Díky kultivaci buněk v 3D kultuře by mělo být možné lépe předpovědět reakci léku *in vivo* (Patra et al., 2016).

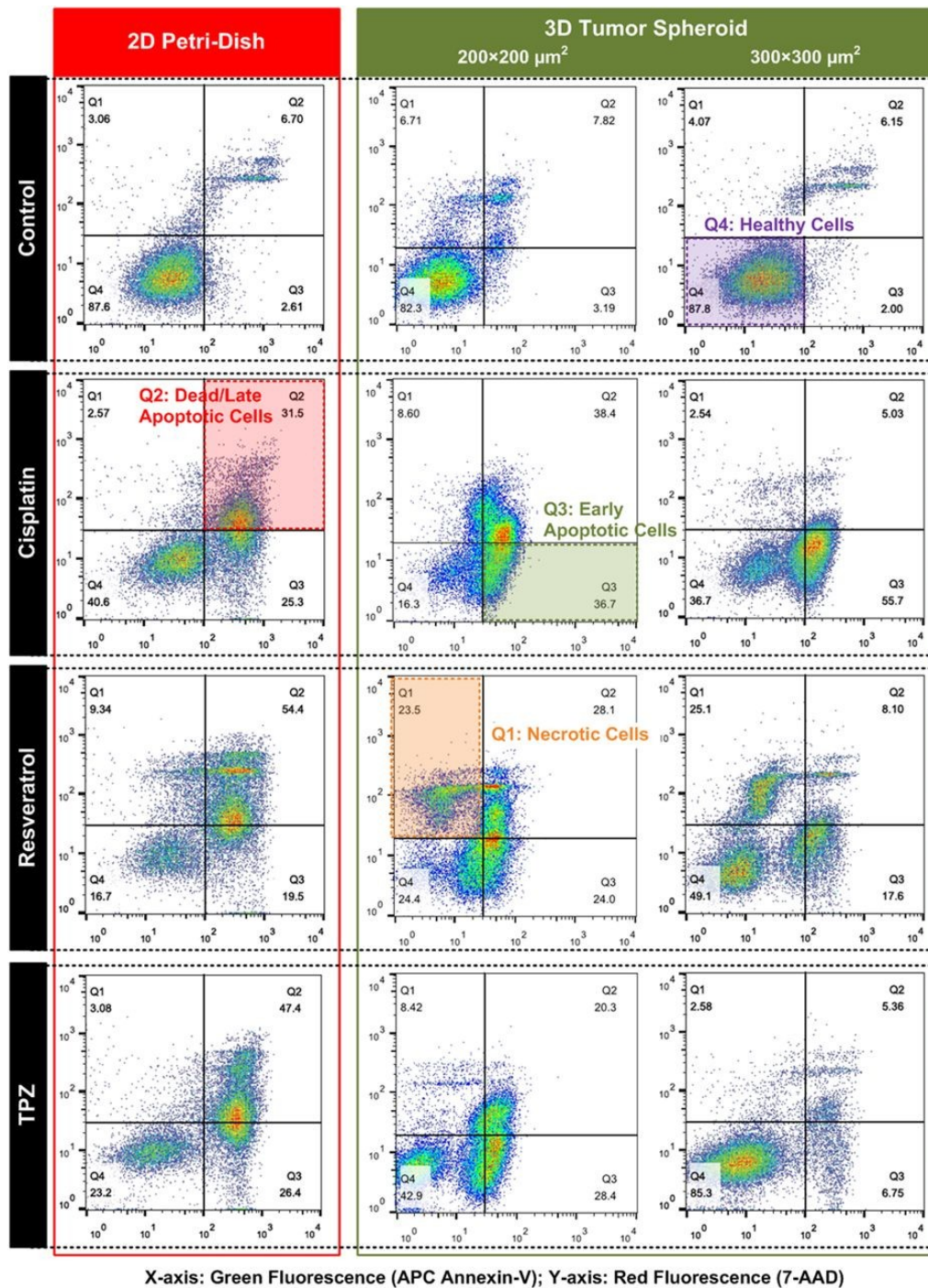
Sféroidy jsou nejprve kultivovány s léky po dobu 48 hodin. Aby mohla být prokázána funkčnost těchto testů, byly nádory kultivované se třemi druhy odlišně působících léků: cisplatinou, resveratrolem a tirapazaminem ve 2D i 3D kulturách. Po 3denní kultivaci přežilo zhruba 93 % buněk, kterým nebyly podané žádné léky. Sféroidy o průměru 130 μm se bez podání léčiv mírně zvětšily, cca o 6 μm v průměru. Sféroidy ošetřené tirapazaminem vyrostly v průměru o 1 μm . Sféroidy o průměru 212 μm se zvětšovaly už razantněji, o 6 μm , ale nebyly tak kompaktní jako kontrolní vzorky. Tato velikost už je hraniční pro testování reakce na léky a není spolehlivá pro hodnocení účinnosti léku.

Nejprve se testy provádějí na 2D kulturách pro srovnání. Sféroidy jsou testovány koncentracemi léků vyššími než IC_{50} , jelikož sféroidy obecně vykazují vyšší rezistenci. Poté jsou sféroidy jednoduše vyjmuté z přístroje a disociované na jednobuněčnou suspenzi, aby mohly být otestované průtokovou cytometrií (Patra et al., 2016).

Vzorky v 2D kulturách vykazovaly 32,5 % apoptotických buněk u cisplatinu, 54,4 % u resveratrolu a 47,4 % u tirapazaminu. U 3D kultur více buněk zůstává v časném apoptotickém stádiu a méně buněk je mrtvých. Resveratrol a tirapazamin mají nižší účinnost na 3D sféroidy. Zhruba polovina buněk (49,1 % a 85,3 %) zůstává zdravá po 48-hodinové inkubaci, což vypovídá o vyšší míře rezistence větších nádorových sféroidů na léky.

Tyto testy mají velký potenciál pro zlepšení predikce CSRA testů, avšak výsledky analýzy průtokové cytometrie ukazují velké rozdíly v počtu apoptotických a nekrotických buněk mezi 2D a 3D kulturami. Nicméně potvrzují funkčnost průtokové cytometrie v buněčné analýze (Patra et al., 2016).

Následující obrázek zobrazuje porovnání účinnosti testovaných léků pro jednotlivé 2D (levý sloupec) a 3D kultury v různých velikostech (prostřední a pravý sloupec). Diagramy jsou rozděleny do kvartilů, kdy Q1 zobrazuje nekrotické buňky, Q2 mrtvé/pozdně apoptotické buňky, Q3 časně apoptotické buňky a Q4 živé buňky.



Obr. 11.: Porovnání bodových diagramů průtokové cytometrie pro sféroidy a 2D kultury.(Patra et al., 2016)

8. Závěr

Podle Organizace ASCO a NCCN nebyly zjištěné žádné přesvědčivé důkazy o tom, že by se CSRA měly zařadit do běžné onkologické praxe. ASCO ale zároveň ve svých rešerších uvádí, že je důležité pracovat na jejich výzkumu z důvodu rostoucího počtu možných léků a jejich kombinací. Udává, že CSRA testy jsou výhodné pro pacienty s onemocněním v pokročilém stádiu s krátkým mediánem přežití, kdy pacienti nejsou schopni přijmout více než jednu kombinaci chemoterapeutik, a proto je důležitý správný výběr léků, které s nejvyšší pravděpodobností vyvolají správnou odpověď. Tímto tvrzením tedy potvrzuje užitečnost těchto testů.

Negativní výsledky metaanalýzy rešerší této organizace jsou způsobeny především nedostatkem literatury. Studie, které jsou dostupné, a které byly přezkoumané, disponují většinou malým množstvím vzorků a jsou tedy statisticky málo vypovídající. Počet vzorků je dále snižován problémy s kultivací tkáně. Dalším problémem je, že nelze porovnat, jak velký rozdíl by byl ve výsledcích léčby při nasazení standardní chemoterapie nebo při nasazení léčby podle CSRA. Proto je komplikované určit, kdy byl test úspěšný. Následně se zmiňuje o problému lišících se výsledků testů s ohledem na místo odběru vzorku či biopsie, či o čase, který by musel pacient čekat na výsledky a nemohl by začít s léčbou. Některé tyto problémy lze vyřešit volbou průtokové cytometrie jako metody testu. Ta je vhodná pro práci s heterogenním materiálem, protože testuje každou buňku zvlášť a má velice silnou statistiku. Dále je nízkonákladová a rychlá. Výsledky testů lze získat už za 48 hodin, což znamená, že je lékaři mohou znát ještě před zahájením léčby.

Dalším argumentem, který nepodporuje zavedení CSRA do běžné klinické praxe je otázka, jak často změni výsledek CSRA testů volbu chemoterapie? Tento typ informace není dostupný v publikované literatuře a ani není jednoduché ho získat. Je pravda, že výsledky CSRA testů se často shodují s doporučenou standardní léčbou. Vzhledem k tomu, že je standardní léčba ta statisticky nejúspěšnější, je jasné, že většina CSRA testů vyjde shodně s tímto doporučením. Toto tvrzení potvrzují i čísla publikované ve výše zmíněných rešerších. V jediné studii nebyl zaznamenaný rozdíl mezi CSRA testy indukovanou a standardní léčbou (odpověď na léky byla vždy 100%). V ostatních studiích byla prokázána větší úspěšnost CSRA indukované terapie o 3-38 %, což odpovídá statistické menšině, na kterou nepůsobí standardní léčba.

Všechny zmíněné studie potvrzují přínosnost CSRA testů a ve všech byla prokázána statisticky významná korelace s klinickými výsledky. Problémem zamezujícím zavedení CSRA testů do klinické běžné praxe není neúčinnost těchto testů, ale nedostatečné množství kvalitně provedených a standardizovaných studií, které by potvrdily jejich přínos pro zlepšení výsledků léčby pacientů s nádorovým onemocněním.

9. Seznam použité literatury

- Abdeen, Lee, Kilian, 2016. Capturing extracellular matrix properties in vitro: Microengineering materials to decipher cell and tissue level processes. *Exp. Biol. Med.* 241, 930–938. <https://doi.org/10.1177/1535370216644532>
- Ahmadian, Barar, Saei, Fakhree, Omid, 2009. Cellular Toxicity of Nanogenomedicine in MCF-7 Cell Line: MTT assay. *J. Vis. Exp. JoVE.* 26, <https://doi.org/10.3791/1191>
- Akazawa, Higashiyama, Nishino, Uchida, Kumagai, Inoue, Fujiwara, Tokunaga, Okami, Imamura, Kodama, Kobayashi, 2017. Impact of in vitro chemosensitivity test-guided platinum-based adjuvant chemotherapy on the surgical outcomes of patients with p-stage IIIA non-small cell lung cancer that underwent complete resection. *Mol. Clin. Oncol.* 7, 327–335. <https://doi.org/10.3892/mco.2017.1340>
- Allison, Ridolpho, 1980. Use of a trypan blue assay to measure the deoxyribonucleic acid content and radioactive labeling of viable cells. *J. Histochem. Cytochem.* 28, 700–703. <https://doi.org/10.1177/28.7.6156203>
- Amur, Zineh, Abernethy, Huang, Lesko, 2010. Pharmacogenomics and adverse drug reactions. *Pers. Med.* 7, 633–642. <https://doi.org/10.2217/pme.10.63>
- Anchang, Davis, Fienberg, Williamson, Bendall, Karacosta, Tibshirani, Nolan, Plevritis, 2018. DRUG-NEM: Optimizing drug combinations using single-cell perturbation response to account for intratumoral heterogeneity. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 115, E4294. <https://doi.org/10.1073/pnas.1711365115>
- Ballesteros, 2010. Methods for providing personalized medicine test ex vivo for hematological neoplasms. US20100298255 A1.
- Bandura, Baranov, Ornatsky, Antonov, Kinach, Lou, Pavlov, Vorobiev, Dick, Tanner, 2009. Mass cytometry: technique for real time single cell multitarget immunoassay based on inductively coupled plasma time-of-flight mass spectrometry. *Anal. Chem.* 81, 6813–6822. <https://doi.org/10.1021/ac901049w>
- Barakat, Elshazly, Mahmoud, 2015. Spirulina platensis Lacks Antitumor Effect against Solid Ehrlich Carcinoma in Female Mice. *Adv. Pharmacol. Sci.* 2015. <https://doi.org/10.1155/2015/132873>
- Barlogie, Göhde, Johnston, Smallwood, Schumann, Drewinko, Freireich, 1978. Determination of ploidy and proliferative characteristics of human solid tumors by pulse cytophotometry. *Cancer Res.* 38, 3333–3339. DOI: Published October 1978
- Behbehani, Samusik, Bjornson, Fantl, Medeiros, Nolan, 2015. Mass Cytometric Functional Profiling of Acute Myeloid Leukemia Defines Cell-Cycle and Immunophenotypic Properties That Correlate with Known Responses to Therapy. *Cancer Discov.* 5, 988–1003. <https://doi.org/10.1158/2159-8290.CD-15-0298>
- Berry, Laing, Wells, 1975. Fresh explant culture of human tumours in vitro and the assessment of sensitivity to cytotoxic chemotherapy. *Br. J. Cancer* 31, 218–227. PMID: 809049
- Black, Speer, 1954. Further Observations on the Effects of Cancer Chemotherapeutic Agents on the in Vitro Dehydrogenase Activity of Cancer Tissue. *JNCI J. Natl. Cancer Inst.* 14, 1147–1158. <https://doi.org/10.1093/jnci/14.5.1147>
- Black, Speer, Brenowitz, 1953. Effects of Cancer Chemotherapeutic Agents on Dehydrogenase Activity of Human Cancer Tissue in Vitro. *Am. J. Clin. Pathol.* 23, 218–227. <https://doi.org/10.1093/ajcp/23.3.218>
- Blumenthal, Goldenberg, 2007. Methods and goals for the use of in vitro and in vivo chemosensitivity testing. *Mol Biotechnol.* 35, 185–197. PMID: 17435285
- Brower, Fensterer, Bush, 2008. The ChemoFx assay: an ex vivo chemosensitivity and resistance assay for predicting patient response to cancer chemotherapy. *Methods Mol. Biol. Clifton NJ* 414, 57–78. PMID: 18175812
- Brown, 1999. The Hypoxic Cell: A Target for Selective Cancer Therapy—Eighteenth Bruce F. Cain Memorial Award Lecture. *Cancer Res.* 59, 5863–5870. PMID: 10606224
- Brown, Wittwer, 2000. Flow Cytometry: Principles and Clinical Applications in Hematology. *Clin. Chem.* 46, 1221–1229. PMID: 10926916

- Buccisano, Maurillo, Del Principe, Del Poeta, Sconocchia, Lo-Coco, Arcese, Amadori, Venditti, 2012. Prognostic and therapeutic implications of minimal residual disease detection in acute myeloid leukemia. *Blood* 119, 332–341. <https://doi.org/10.1182/blood-2011-08-363291>
- Burstein, Mangu, Somerfield, Schrag, Samson, Holt, Zelman, Ajani, 2011. American Society of Clinical Oncology clinical practice guideline update on the use of chemotherapy sensitivity and resistance assays. *J. Clin. Oncol. Off. J. Am. Soc. Clin. Oncol.* 29, 3328–3330. <https://doi.org/10.1200/JCO.2011.36.0354>
- Chumchalová, Kovařík, 2000. Metodiky testování chemosenzitivity / chemorezistence nádorů in vitro. *Časopis Klinická onkologie* 13, 18-21.
- Clarke, 1996. Human breast cancer cell line xenografts as models of breast cancer. The immunobiologies of recipient mice and the characteristics of several tumorigenic cell lines. *Breast Cancer Res. Treat.* 39, 69–86. PMID: 8738607
- Cortazar, Johnson, 1999. Review of the Efficacy of Individualized Chemotherapy Selected by In Vitro Drug Sensitivity Testing for Patients With Cancer. *J. Clin. Oncol.* 17, 1625–1625. <https://doi.org/10.1200/JCO.1999.17.5.1625>
- Cree, Kurbacher, Lamont, Hindley, Love, TCA Ovarian Cancer Trial Group, 2007. A prospective randomized controlled trial of tumour chemosensitivity assay directed chemotherapy versus physician's choice in patients with recurrent platinum-resistant ovarian cancer. *Anticancer. Drugs* 18, 1093–1101. <https://doi.org/10.1097/CAD.0b013e3281de727e>
- Crosland-Taylor, 1953. A Device for Counting Small Particles suspended in a Fluid through a Tube. *Nature* 171, 37–38. <https://doi.org/10.1038/171037b0>
- Dagogo-Jack, Shaw, 2018. Tumour heterogeneity and resistance to cancer therapies. *Nat. Rev. Clin. Oncol.* 15, 81–94. <https://doi.org/10.1038/nrclinonc.2017.166>
- Davies, 2015. Viability Dyes for Flow Cytometry: It's Not Just a Matter of Life and Death. *Bitesize Bio*.
- Dendy, Bozman, Wheeler, 1970. In-vitro screening test for human malignant tumours before chemotherapy. *Lancet Lond. Engl.* 1, 68–72. PMID: 4193360
- Engelholm, Spang-Thomsen, Vindeløv, 1983. A short-term in vitro test for tumour sensitivity to adriamycin based on flow cytometric DNA analysis. *Br. J. Cancer* 47, 497–502. PMID: 6849794
- Engelholm, Spang-Thomsen, Vindeløv, Brünner, 1986. Chemosensitivity of human small cell carcinoma of the lung detected by flow cytometric DNA analysis of drug-induced cell cycle perturbations in vitro. *Cytometry* 7, 243–250. <https://doi.org/10.1002/cyto.990070304>
- Fisher, 1922. On the interpretation of χ^2 from contingency tables, and the calculation of P. *Journal of the Royal Statistical Society*, 85 (1), 87-94. doi:10.2307/2340521
- Fisher, 1954. *Statistical Methods for Research Workers*. ISBN 0-05-002170-2.
- Furukawa, Kubota, Hoffman, 1995. Clinical applications of the histoculture drug response assay. *Clin. Cancer Res. Off. J. Am. Assoc. Cancer Res.* 1, 305–311. DOI: Published March 1995
- Galderisi, Stork, Li, Mori, Mongoue-Tchokote, Huang, 2009. Flow Cytometric Chemosensitivity Assay As A Predictive Tool of Early Clinical Response in Acute Lymphoblastic Leukemia. *Pediatr. Blood Cancer* 53, 543–550. <https://doi.org/10.1002/pbc.22119>
- Galvan, 2018. In Vitro Chemoresistance and Chemosensitivity Assays. Regence 06, medical policy manual
- Gao, Wu, Zhang, Zhao, Li, Ning, Tian, Wang, Li, Sun, Li, Nan, Li, 2013. A prospective study of adenosine triphosphate-tumor chemosensitivity assay directed chemotherapy in patients with recurrent ovarian cancer. *Zhonghua Fu Chan Ke Za Zhi* 48, 358–363. PMID: 24016479
- Garozzo, Rossi, Denaro, Allegra, Santangelo, Amato, Tomasello, 1989. In vitro short-term chemosensitivity test in head and neck tumors. *J. Chemother. Florence Italy* 1, 59–63. PMID: 2723714
- GraphPad, 2018. What is the difference between an IC50 and an EC50 and an ED50? <https://www.graphpad.com/support/faq/what-is-the-difference-between-an-ic50-and-an-ec50-and-an-ed50>.
- Gwak, Park, Yoo, Youn, Rhee, Lee, 2011. Chemotherapy for Malignant Gliomas Based on Histoculture Drug Response Assay : A Pilot Study. *J. Korean Neurosurg. Soc.* 50, 426–433. <https://doi.org/10.3340/jkns.2011.50.5.426>

- Hajian-Tilaki, 2013. Receiver Operating Characteristic (ROC) Curve Analysis for Medical Diagnostic Test Evaluation. *Casp. J. Intern. Med.* 4, 627–635. PMID: 24009950
- Hallermann, Thom, Gerhartz, 1964. ELECTRONIC DIFFERENTIAL COUNTING OF GRANULOCYTES AND LYMPHOCYTES AFTER INTRAVITAL FLUOROCHROME STAINING WITH ACRIDINE ORANGE. *Verh. Dtsch. Ges. Inn. Med.* 70, 217–219. PMID: 14294223
- Hallinan, 2014. Assessing and Comparing Classifier Performance with ROC Curves. *Mach. Learn. Mastery*. <https://machinelearningmastery.com/assessing-comparing-classifier-performance-roc-curves-2/>
- Hatok, Babusikova, Matakova, Mistuna, Dobrota, Racay, 2009. In vitro assays for the evaluation of drug resistance in tumor cells. *Clin. Exp. Med.* 9, 1–7. <https://doi.org/10.1007/s10238-008-0011-3>
- Hidalgo, Amant, Biankin, Budinská, Byrne, Caldas, Clarke, Jong, Jonkers, Mælandsmo, Roman-Roman, Seoane, Trusolino, Villanueva, 2014. Patient-Derived Xenograft Models: An Emerging Platform for Translational Cancer Research. *Cancer Discov.* 4, 998–1013. <https://doi.org/10.1158/2159-8290.CD-14-0001>
- Hoffman, Vescio, 2018. Development of the HistoCulture Drug Response Assay (HDRA). *Methods Mol. Biol. Clifton NJ* 1760, 39–48. https://doi.org/10.1007/978-1-4939-7745-1_5
- Hofmann, Berens, Martz, 1984. Predictive Drug Testing on Human Tumor Cells. Berlin. ISBN: 978-3-642-82297-1
- Holford, 2018. Pharmacodynamic Principles and the Time Course of Drug Effects. <http://holford.fmhs.auckland.ac.nz/docs/time-course-drug-effect.pdf?fbclid=IwAR09paBIUSqCWdRUPEOkIHY89MgOCRNIH86zkCQoSw2sdtBzg87iMfe6LSs>
- Holmes, Little, 1974. Tissue-culture microtest for predicting response of human cancer to chemotherapy. *Lancet Lond. Engl.* 2, 985–987. PMID: 4138888
- Huang, Zhong, Bakke, 2007. Multiparameter flow cytometric cytotoxicity systems, methods, compositions and kits for evaluating the susceptibility of cancer. WO2007015926A2.
- Ibrahim, Engh, 2007. Flow cytometry and cell sorting. *Adv. Biochem. Eng. Biotechnol.* 106, 19–39. https://doi.org/10.1007/10_2007_073
- Jamal, Grillone, Jalisi, 2017. Chemosensitivity Assay in Head and Neck Cancer Patients: A Three-Year Follow Up. *J. Clin. Diagn. Res. JCDR* 11, XC01–XC03. <https://doi.org/10.7860/JCDR/2017/24802.9816>
- Jenks, 2012. Chemosensitivity assays: still eyeing the clinic. *J. Natl. Cancer Inst.* 104, 1775–1777. <https://doi.org/10.1093/jnci/djs499>
- Joo, Lee, Kim, Yoo, Roh, Park, Kim, Kim, Kim, Nam, 2009. Efficacy of taxane and platinum-based chemotherapy guided by extreme drug resistance assay in patients with epithelial ovarian cancer. *J. Gynecol. Oncol.* 20, 96–100. <https://doi.org/10.3802/jgo.2009.20.2.96>
- Kimura, Yonemura, Ohyama, Tsugawa, Kinoshita, Ninomiya, Kosaka, Miwa, Miyazaki, Tanaka, Sasaki, 1992. The succinate dehydrogenase inhibition test for evaluating biopsy specimens and resected tumors of advanced gastric cancer. *Surg. Today* 22, 508–511. <https://doi.org/10.1007/BF00308895>
- Kischkel, Meyer, Eich, Nassir, Mentze, Braicu, Kopp-Schneider, Sehouli, 2017. Prediction of clinical response to drugs in ovarian cancer using the chemotherapy resistance test (CTR-test). *J. Ovarian Res.* 10, 72. <https://doi.org/10.1186/s13048-017-0365-9>
- Kobayashi, 2005. Collagen gel droplet culture method to examine in vitro chemosensitivity. *Methods Mol. Med.* 110, 59–67. <https://doi.org/10.1385/1-59259-869-2:059>
- Kobayashi, Tanisaka, Doi, Kodama, Higashiyama, Nakagawa, Miyake, Taki, Hara, Yasutomi, Hanatani, Kotake, Kubota, 1997. An in vitro chemosensitivity test for solid human tumors using collagen gel droplet embedded cultures. *Int. J. Oncol.* 11, 449–455. <https://doi.org/10.3892/ijo.11.3.449>
- Krivak, Lele, Richard, Secord, Leath, Brower, Tian, Moore, 2014. A chemoresponse assay for prediction of platinum resistance in primary ovarian cancer. *Am. J. Obstet. Gynecol.* 211, 68.e1–8. <https://doi.org/10.1016/j.ajog.2014.02.009>

- Kubackzová, Sedlaříková, Bollová, Sandecká, Štork, Pour, Ševčíková, 2017. Liquid Biopsies – the Clinics and the Molecules. *Klin. Onkol.* 30, 2S13-2S20. <https://doi.org/doi:10.14735/amko20172S13>
- Kubota, Takezawa, Mori, Takakuwa, 1992. A new method of in vitro chemosensitivity test using multicellular spheroids of cholangiocarcinoma cell line cocultured with fibroblasts. *Nihon Geka Gakkai Zasshi* 93, 960–963. PMID: 1470162
- Kuksin, Kuksin, Qiu, Chan, 2016. Cellometer image cytometry as a complementary tool to flow cytometry for verifying gated cell populations. *Anal. Biochem.* 503, 1–7. <https://doi.org/10.1016/j.ab.2016.03.010>
- Lai, Wei, Lin, Qin, Cheng, Li, 2017. Current status and perspectives of patient-derived xenograft models in cancer research. *J. Hematol. Oncol.* *J Hematol Oncol* 10, 106. <https://doi.org/10.1186/s13045-017-0470-7>
- Langhansová, 2011. Využití průtokové cytometrie v imunologii. <http://biomedicina.prf.jcu.cz/wordpress/wp-content/uploads/2011/12/Vyuzitiprutokovecytometrievimunologii.pdf>
- Lee, Kim, Y.-M., Kim, M.-B., Kim, D.-Y., Kim, J.-H., Nam, Kim, Y.-T., 2012. In vitro chemosensitivity using the histoculture drug response assay in human epithelial ovarian cancer. *Acta Med. Okayama* 66, 271–277. <https://doi.org/10.18926/AMO/48567>
- Limburg, Heckmann, 1968. CHEMOTHERAPY IN THE TREATMENT OF ADVANCED PELVIC MALIGNANT DISEASE WITH SPECIAL REFERENCE TO OVARIAN CANCER. *Int. J. Obstet. Gynaecol.* 75, 1246–1255. <https://doi.org/10.1111/j.1471-0528.1968.tb02931.x>
- Liston, Davis, 2017. Clinically Relevant Concentrations of Anticancer Drugs: A Guide for Nonclinical Studies. *Clin. Cancer Res.* 23, 3489–3498. <https://doi.org/10.1158/1078-0432.CCR-16-3083>
- Litchfield, Mukherjee, Eckert, Johnson, Mills, Pan, Shridhar, Lengyel, Romero, 2015. Hyperglycemia-induced metabolic compensation inhibits metformin sensitivity in ovarian cancer. *Oncotarget* 6, 23548–23560. doi: 10.18632/oncotarget.4556
- Lynne, 2018. What do the Terms In Vivo and In Vitro Mean? *verywellhealth* <https://www.verywellhealth.com/what-does-in-vivo-and-in-vitro-mean-2249118>
- Mattanovich, Borth, 2006. Applications of cell sorting in biotechnology. *Microb. Cell Factories* 5, 12. <https://doi.org/10.1186/1475-2859-5-12>
- Meacham, Morrison, , 2013. Tumor heterogeneity and cancer cell plasticity. *Nature* 501, 328–337. <https://doi.org/10.1038/nature12624>
- Medenica, Powell, 1995. Flow cytometric pharmacosensitivity assay and method of cancer treatment. US5736129A
- Meitner, 1991. The fluorescent cytoprint assay: a new approach to in vitro chemosensitivity testing. *Oncology* 5, 75–81. PMID: 1835881
- Michalová, Poprach, Němečková, 2008. Predikce citlivosti nádorových buněk k chemoterapeutikům ex vivo – úskalí a limitace vlastní metody. *Časopis Klinická onkologie* 21 (3), 93-97.
- Moldavan, 1934. Photo-Electric Technique for the Counting of Microscopical Cells. *Science* 80, 188–189. <https://doi.org/10.1126/science.80.2069.188>
- Morton, Houghton, 2007. Establishment of human tumor xenografts in immunodeficient mice. *Nat. Protoc.* 2, 247–250. <https://doi.org/10.1038/nprot.2007.25>
- National Cancer Institute, 2018. Drugs Approved for Different Types of Cancer <https://www.cancer.gov/about-cancer/treatment/drugs/cancer-type>.
- National Comprehensive Cancer Network®, 2018. Ovarian Cancer, Including Fallopian Tube Cancer and Primary Peritoneal Cancer (NCCN Clinical Practice Guidelines in Oncology.)
- Novotný, Petruželka, 2005. Metodické problémy klinických studií v onkologii. *Teorie a praxe klinických hodnocení*, 017. <https://www.linkos.cz/lekar-a-multidisciplinari-tym/kongresy/po-kongresu/databaze-tuzemskych-onkologickych-konferencnich-abstrakt/metodicke-problemy-klinickyh-studii-v-onkologii/>.
- Ochs, Burholt, Kornblith, 2005. The ChemoFx assay: an ex vivo cell culture assay for predicting anticancer drug responses. *Methods Mol. Med.* 110, 155–172. <https://doi.org/10.1385/1-59259-869-2:155>
- Ohie, Udagawa, Aoki, Nozawa, 2005. Histoculture drug response assay to monitor chemoresponse. *Methods Mol. Med.* 110, 79–86. <https://doi.org/10.1385/1-59259-869-2:079>

- Ornatsky, Bandura, Baranov, Nitz, Winnik, Tanner, 2010. Highly multiparametric analysis by mass cytometry. *J. Immunol. Methods* 361, 1–20. <https://doi.org/10.1016/j.jim.2010.07.002>
- Ornstein, Ansley, 1974. Spectral matching of classical cytochemistry to automated cytology. *J. Histochem. Cytochem. Off. J. Histochem. Soc.* 22, 453–469. <https://doi.org/10.1177/22.7.453>
- Pappenheimer, 1917. EXPERIMENTAL STUDIES UPON LYMPHOCYTES : I. THE REACTIONS OF LYMPHOCYTES UNDER VARIOUS EXPERIMENTAL CONDITIONS. *J. Exp. Med.* 25, 633–650. PMID: 19868114
- Patra, Peng, Liao, Lee, Tung, 2016. Drug testing and flow cytometry analysis on a large number of uniform sized tumor spheroids using a microfluidic device. *Sci. Rep.* 6, 21061. <https://doi.org/10.1038/srep21061>
- Pawelski, 2005. Cancer Chemosensitivity Testing. *Positive Health Online*, 117.
- Phillips, Scott, Blaszczynski, 1983. Statistics for diagnostic procedures. I. How sensitive is “sensitivity”; how specific is “specificity”? *AJR Am. J. Roentgenol.* 140, 1265–1270. <https://doi.org/10.2214/ajr.140.6.1265>
- Price, 1996. Metastasis from human breast cancer cell lines. *Breast Cancer Res. Treat.* 39 (1), 93-102. PMID: 8738609
- Qian, Wang, Chen, Cheng, 2017. Detection of single cell heterogeneity in cancer. *Semin. Cell Dev. Biol.* 64, 143–149. <https://doi.org/10.1016/j.semcdb.2016.09.003>
- Radcliff, Jaroszeski, 1998. Basics of flow cytometry. *Methods Mol. Biol. Clifton NJ* 91, 1–24. PMID: 9664477
- Rogalińska, Błoński, Góralski, Wawrzyniak, Hartman, Rogalska, Robak, Koceva-Chyła, Piekarski, Robak, Kiliańska, 2015. Relationship between in vitro drug sensitivity and clinical response of patients to treatment in chronic lymphocytic leukemia. *Int. J. Oncol.* 46, 1259–1267. <https://doi.org/10.3892/ijo.2015.2823>
- Rutherford, Orr, Grendys, Edwards, Krivak, Holloway, Moore, Puls, Tillmanns, Schink, Brower, Tian, Herzog, 2013. A prospective study evaluating the clinical relevance of a chemoresponse assay for treatment of patients with persistent or recurrent ovarian cancer. *Gynecol. Oncol.* 131, 362–367. <https://doi.org/10.1016/j.ygyno.2013.08.009>
- Salmon, 1984. Human tumor colony assay and chemosensitivity testing. *Cancer Treat. Rep.* 68, 117–125. PMID: 6692423
- Salmon, Hamburger, Soehnen, Durie, Alberts, Moon, 1978. Quantitation of differential sensitivity of human-tumor stem cells to anticancer drugs. *N. Engl. J. Med.* 298, 1321–1327. <https://doi.org/10.1056/NEJM197806152982401>
- Schinköthe, 2008. Method for determination of cell viability by using flow cytometry with fixed volume acquisition. EP1936353A1.
- Schrag, Garewal, Burstein, Samson, Von Hoff, Somerfield, 2004. American Society of Clinical Oncology Technology Assessment: Chemotherapy Sensitivity and Resistance Assays. *J. Clin. Oncol.* 22, 3631–3638. <https://doi.org/10.1200/JCO.2004.05.065>
- Sedláková, Tosner, Cervinka, Brigulová, Rezac, Spacek, Laco, Skapinec, 2011. Primary drug resistance/sensitivity in vitro and clinical outcome in ovarian cancer patients. *Ceska Gynekol.* 76, 184–189. PMID: 21838147
- Shapiro, 2005. *Practical Flow Cytometry*. John Wiley & Sons. ISBN: 978-0-471-43403-0
- Shargel, Yu, 2015. *Applied Biopharmaceutics & Pharmacokinetics*, 7e. ISBN: 978-0-07-183093-5
- Strate, Longdin, 2017. Best practices in performing flow cytometry in a regulated environment: feedback from experience within the European Bioanalysis Forum 1253–1265.
- Stratton, 1987. The murine subrenal capsule human tumor implant assay. *J. Clin. Lab. Anal.* 1, 62–66. <https://doi.org/10.1002/jcla.1860010109>
- Strober, 2001. Trypan blue exclusion test of cell viability. *Curr. Protoc. Immunol.* Appendix 3, Appendix 3B. <https://doi.org/10.1002/0471142735.ima03bs21>
- Taláč; Žaloudík, Hajdúch, Mihál, Chumchalová, Hanke, Kovařík, 2000. Hodnocení lékové rezistence in vitro a její klinické implikace. *Časopis Klinická onkologie.* 13, 2-3.
- Tanigawa, Shimomatsuya, Fujii, Yamakawa, Muraoka, Saitoh, 1993. In vitro chemosensitivity assay using a double-layer-agar system: human tumor cloning assay and thymidine incorporation assay. *Gan To Kagaku Ryoho* 20, 440–446. PMID: 8452381

- Tanioka, Utani, Araki, Fujii, Kore-Eda, Tachibana, Takano, Kobayashi, Nakajima, Miyachi, 2010. Evaluation of the chemosensitivity of primary cultured malignant melanoma cells using the collagen gel droplet-embedded culture drug sensitivity test. *Exp. Ther. Med.* 1, 65–68. https://doi.org/10.3892/etm_00000011
- *Team, 2016. Papanicolaou (PAP) Staining : Introduction, Principle, Procedure and Interpretation. <https://laboratoryinfo.com/papanicolaou-pap-staining-principle-procedure-interpretation/>
- Tozuka, Horiguchi, Takata, Rokutanda, Nagaoka, Tokiniwa, Kikuchi, Satou, Takei, Takeyoshi, 2013. Collagen gel droplet-embedded culture-drug sensitivity test and Ki67 expression in estrogen receptor-positive and HER2-negative breast cancer. *Mol. Clin. Oncol.* 1, 93–99. <https://doi.org/10.3892/mco.2012.4>
- Vindelov, Hansen, Gersei, Hirsch, Nissen, 1982. Treatment of small cell carcinoma of the lung monitored by sequential flow cytometric DNA analysis. *Cancer research* 42, 2499-2505
- Vogenberg, Isaacson Barash, Pursel, 2010. Personalized Medicine. *Pharm. Ther.* 35, 560–576. PMID: 21037908
- Volm, Efferth, 2015. Prediction of Cancer Drug Resistance and Implications for Personalized Medicine. *Front. Oncol.* 5. <https://doi.org/10.3389/fonc.2015.00282>
- Wasserstein, Ronald, Lazar, Nicole, 2016. The ASA's Statement on p-Values: Context, Process, and Purpose. *The American Statistician.* 70 (2): 129–133. doi:10.1080/00031305.2016.1154108
- Weisenthal, Marsden, Dill, Macaluso, 1983. A novel dye exclusion method for testing in vitro chemosensitivity of human tumors. *Cancer Res.* 43, 749–757. PMID: 6184155
- Wright, Cobb, Gumpert, Golomb, Safadi, 1957. Investigation of the relation between clinical and tissue-culture response to chemotherapeutic agents on human cancer. *N. Engl. J. Med.* 257, 1207–1211. <https://doi.org/10.1056/NEJM195712192572502>
- Wu, Zhang, Zhu, 2008. Predictive value of MTT assay as an in vitro chemosensitivity testing for gastric cancer: one institution's experience. *World J Gastroenterol* 14 (19), 3064-3068. doi: 10.3748/wjg.14.3064
- Yokosuka, Goto, Fujii, Naruto, Takeuchi, Tanoshima, Kato, Yanagimachi, Kajiwara, Yokota, 2013. Flow cytometric chemosensitivity assay using JC-1, a sensor of mitochondrial transmembrane potential, in acute leukemia. *Cancer Chemother. Pharmacol.* 72, 1335–1342. <https://doi.org/10.1007/s00280-013-2303-x>
- Yu, Bardia, Aceto, Bersani, Madden, Donaldson, Desai, Zhu, Comaills, Zheng, Wittner, Stojanov, Brachtel, Sgroi, Kapur, Shioda, Ting, Ramaswamy, Getz, Iafrate, Benes, Toner, Maheswaran, Haber, 2014. Ex vivo culture of circulating breast tumor cells for individualized testing of drug susceptibility. *Science* 345, 216–220. <https://doi.org/10.1126/science.1253533>
- Yu, Lin, Zhao, Huang, Zeng, Fang, Xu, 2017. A simple in vitro tumor chemosensitivity assay based on cell penetrating peptide tagged luciferase. *PLOS ONE* 12, e0186184. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0186184>
- Zhao, Wu, Li, X., Wang, Li, M., Li, Y., Tian, Song, Liu, Chang, Zhang, 2010. Application of ATP-tumor chemosensitivity assay in recurrent epithelial ovarian cancer. *Zhonghua Zhong Liu Za Zhi* 32, 855–858. PMID: 21223693