

**UNIVERZITA KARLOVA V PRAZE
LÉKAŘSKÁ FAKULTA V HRADCI KRÁLOVÉ**

DISERTAČNÍ PRÁCE

Univerzita Karlova v Praze
Lékařská fakulta v Hradci Králové



Doktorský studijní program
Lékařská biologie

**Testování chemosenzitivity u buněk lidského ovariálního karcinomu
a jeho modelového systému, buněčné linie A2780**

Chemosenzitivity testing of human ovarian cancer cells and its *in vitro* model,
human ovarian cancer cell line A2780

Mgr. Kateřina Caltová

Školitel: prof. MUDr. RNDr. Miroslav Červinka, CSc.

Hradec Králové

Prohlášení

Prohlašuji tímto, že jsem doktorskou práci zpracovala samostatně a že jsem uvedla všechny použité informační zdroje. Dávám souhlas k tomu, aby tato práce byla uložena v knihovně Lékařské fakulty Univerzity Karlovy v Hradci Králové a mohla tak být použita ke studijním účelům. Souhlasím také se zpřístupněním této práce v informačním systému Univerzity Karlovy v Praze.

V Hradci Králové 23. 10. 2013

Poděkování

Ráda bych poděkovala všem, kteří byli ochotni podělit se se mnou o své znalosti a zkušenosti, jmenovitě svému školiteli panu prof. MUDr. RNDr. Miroslavu Červinkovi, CSc. a paní MUDr. Ivě Sedlákové, Ph.D. Děkuji také všem svým spolupracovníkům z Ústavu lékařské biologie a genetiky za podporu, pomoc a přátelskou pracovní atmosféru.

Seznam zkratek

ABCG2	člen rodiny ABC transportérů
Ac-DEVD-AMC	acetyl Asp-Glu-Val-Asp 7-amido-4-metylkumarin
Ac-DEVD-CHO	N-acetyl-L- α -aspartyl-L- α -glutamyl-N-(2-karboxyl-1-formyletyl)-L-valinamid
AKT2	v-akt homolog 2 myšího virového onkogenu
AMC	7-amino-4-metylkumarin
ATP7A	měď transportující ATPáza 1 (gen kódující měď transportující ATPázu 1)
ATP7B	měď transportující ATPáza 2 (gen kódující měď transportující ATPázu 2)
BAX	Bcl-2-asociovaný X protein
BRCA1	tumor-supresorový gen breast cancer 1
BRCA2	tumor-supresorový gen breast cancer 2
BSA	bovinní sérový albumin
CBDCA	karboplatina
Cdc25A	homolog 25A buněčného cyklu
CFU	kolonie tvořící jednotka
CisPt	cisplatina
c-Myc	myelocytomatózní virový onkogen
CTR1	transportér iontů mědi typu 1
Dab2	mitogen-responsivní fosfoprotein
DAPI	4',6-diamidino-2-fenylindol
DFI	bezpříznakové období do propuknutí nemoci (disease free interval)
DMSO	dimetylsulfoxid
EC50	koncentrace testované látky, která je letální pro 50 % testovaných nádorových buněk
ECL	elektrochemiluminiscence
EDR	extrémní léková rezistence (extreme drug resistance)
EDTA	etylendiamintetraoctová kyselina

EOC	epiteliální ovariální karcinom
Etop	etoposid
FBS	fetální bovinní sérum
FDA	vládní agentura USA pro potraviny a léčiva (Food and Drug Administration)
FIGO	Mezinárodní federace gynekologie a porodnictví
Gmc	gemcitabin
Her-2/neu	receptor lidského epidermálního růstového faktoru
HTCA	kolonie tvořící test (Human Tumor Cloning Assay)
LOT1	gen kódující růstový supresorový protein Lot1
MSH2	tumor-supresorový gen kódující protein pro opravu chybného párování bazí v DNA, MutS protein homolog 2
MLH1	gen asociovaný s hereditárním nepolypózním kolorektálním karcinomem, MutL homolog 1
MRP	proteiny vícečetné rezistence k léčivům
MTT	(3-(4,5-dimetyltiazol-2-yl)-2,5-difenyltetrazolium bromid
PCNA	jaderný antigen proliferujících buněk
PI	propidium jodid
PIK3CA	gen kódující Phosphatidylinositol-4,5-Bisphosphate 3-Kinázu
PTEN	fosfatázový a tensinový homolog
PTX	paklitaxel
RAS	protoonkogen kódující GTPázu Ras
RPMI 1640	Roswell Park Memorial Institute 1640 médium
RTCA	analyzátor průběhu buněčné proliferace
SDS	sodiumdodecylsulfát
SLC29A1	rozpustný nosič rodiny 29 nukleosidových transportérů č. 1
TBS	Tris pufr (Tris-buffered saline)
TBST	Tris pufr obohacený o Tween 20 (Tris-buffered saline with Tween 20)
TNM	system klasifikace zhoubných nádorů
Topo	topotekan
TRIS	tris(hydroxymethyl)aminomethan

VEGF	vaskulární endoteliální růstový faktor
WST-1	5-(2,4-disulfonatofenyl)-3-(4-jodfenyl)-2-(4-nitrofenyl)-2H-tetrazolium
XIAP	X-vážíci inhibitor apoptických protein

OBSAH

1. ÚVOD	4
2. SOUČASNÝ STAV PROBLEMATIKY	5
Ovariální karcinom	5
2.1 Epidemiologie ovariálního karcinomu	5
2.2 Patogeneze ovariálního karcinomu	7
2.3 Histologická klasifikace ovariálního karcinomu	8
2.4 Molekulární mechanismy vzniku ovariálního karcinomu	10
2.5 Léčba ovariálního karcinomu	11
2.6 Cílená biologická léčba	14
2.7 Prognóza	15
2.8 Rezistence u ovariálního karcinomu	16
Prediktivní testování <i>in vitro</i> - testy chemosenzitivity	20
2.9 <i>In vitro</i> testy chemosenzitivity	20
3. CÍLE PRÁCE	26
3.1 Testování chemosenzitivity u buněk lidského ovariálního karcinomu v podmínkách <i>in vitro</i> – klinické vzorky	26
3.2 Testování chemosenzitivity <i>in vitro</i> na modelovém systému lidské ovariální nádorové buněčné linie A2780	26
4. MATERIÁL A METODY	27
4.1 Chemikálie	27
4.2 Spotřební materiál pro kultivaci buněk	29
4.3 Klinické vzorky ovariálního karcinomu	29
4.3.1 Soubor klinických vzorků	29
4.3.2 Média pro klinické vzorky	30
4.3.3 Izolace buněk	31
4.3.4 Viabilita buněk	33
4.4 Příprava testovaných cytostatik	34
4.4.1 Příprava pracovních roztoků cytostatik	34
4.4.2 Příprava koncentračních řad testovaných cytostatik	35
4.5 Ovlivnění a kultivace izolovaných buněk	36
4.6 Testování chemorezistence – MTT test	37
4.7 Hodnocení reaktivity na testovaná cytostatika	38
4.8 Zamrazení buněk izolovaných z EOC	40
4.9 Rozmrazení buněk izolovaných z EOC	40

4.10 Buněčná linie A2780 a její kultivace	41
4.11 Testy metabolické aktivity	42
4.11.1 MTT	42
4.11.2 WST-1 a stanovení celkového množství proteinů v buňkách (barvení Coomassie Brilliant Blue).....	42
4.12 Dynamické měření buněčné proliferace pomocí systému xCELLigence.....	43
4.13 Morfologická studie – fotodokumentace	44
4.14 Analýza buněčného cyklu – barvení propidium jodidem	45
4.15 Detekce proteinů Western blotem	46
4.15.1 Příprava buněčných lyzátů	46
4.15.2 Elektroforéza a Western blot	46
4.15.3 Imunodetekce	47
4.15.4 Kvantitativní hodnocení Western blotů.....	47
4.15.5 Stanovení bílkoviny pomocí bicinchoninové kyseliny (BCA)	48
4.16 Stanovení aktivity kaspázy 3	49
4.16.1 Příprava buněčných lyzátů	49
4.16.2 Kinetické měření aktivity kaspázy 3	49
4.17 Fluorescenční mikroskopie	50
4.17.1 Imunofluorescenční detekce kaspázy 3.....	50
4.18 Statistické vyhodnocení	51
5. VÝSLEDKY	52
5.1 Výsledky testování klinických vzorků.....	52
5.1.1 Výsledky testování solidních nádorů	53
5.1.2 Výsledky testování ascitů.....	54
5.1.3 Souhrnné výsledky <i>in vitro</i> testování klinických vzorků	55
5.2 Porovnání reaktivity čerstvě izolovaných a rozmrazených vzorků solidních nádorů a ascitů	56
5.3 Porovnání reaktivity solidního nádoru a ascitu téže pacientky	57
5.4 Porovnání reaktivity vzorku téže pacientky v čase	58
5.5 Test metabolické aktivity MTT.....	59
5.6 WST-1 test metabolické aktivity a celkový obsah proteinů.....	63
5.7 Dynamické měření buněčné proliferace pomocí systému xCELLigence.....	70
5.8 Morfologická studie	72
5.9 Analýza buněčného cyklu – barvení propidium jodidem	74
5.10 Detekce proteinů Western blotem	77
5.10.1 Detekce proliferačních markerů pomocí Western blotu.....	77

5.10.2 Detekce apoptických markerů pomocí Western blotu.....	79
5.11 Stanovení aktivity kaspázy 3	81
5.12 Fluorescenční mikroskopie	82
6. DISKUSE.....	85
7. ZÁVĚRY.....	99
7.1 Klinické vzorky.....	99
7.2 Buněčná linie A2780.....	100
8. SEZNAM LITERATURY	101

1. ÚVOD

S rostoucí kvalitou života se prodlužuje jeho délka a s tím souvisí také vysoký výskyt nádorových onemocnění nehereditárního původu. Současná epidemiologická situace v České republice vykazuje setrvale rostoucí výskyt většiny nádorových onemocnění s dlouhodobě stabilizovanou mortalitou. Důsledkem toho je prudce rostoucí prevalence nádorových onemocnění. Navíc stárnutí české populace navyšuje počet novotvarů hlavně ve věkové kategorii nad 70 let. Tato fakta představují závažný medicínský a společenský problém. Nejdůležitějším předpokladem úspěšné léčby nádorových onemocnění obecně je jejich včasná diagnóza a následná efektivní léčba. U celé řady diagnóz jsou však nádorová onemocnění zachycena až v pokročilých klinických stádiích, kdy už terapie často nebývá dostatečně účinná a výsledkem je vysoká mortalita v důsledku těchto onemocnění. K řešení problému by mohly pomoci efektivní screeningové programy, které však v prevenci některých nádorových onemocnění zcela chybí. Stejně je tomu i v případě ovariálního karcinomu.

Ovariální karcinom jako nejčastější příčina úmrtí mezi gynekologickými malignitami v populaci českých žen představuje významný medicínský problém. Incidence tohoto onemocnění není zanedbatelná. Velký problém představuje pozdní diagnóza, kdy jsou onemocnění velmi často odhalena až v pozdních klinických stádiích v důsledku chybějícího funkčního screeningu a s tím pak souvisí i vysoká mortalita. Obdobná situace je také ve vyspělých zemích Evropy a světa. Limitujícím faktorem onemocnění je jeho vysoká heterogenita, často se rozvíjející rezistence na podávanou cytostatickou léčbu a nedostatečná individualizace léčby.

V předkládané práci sledujeme efektivitu vybraných cytostatik na souboru klinických vzorků ovariálních karcinomů a dále pak hodnotíme účinek těchto cytostatik na modelovém systému, stabilizované buněčné linii, v podmínkách *in vitro*. Tento přístup má význam také při hledání molekulárních mechanismů vzniku nádorových onemocnění a při vývoji nových léčiv.

2. SOUČASNÝ STAV PROBLEMATIKY

Ovariální karcinom

2.1 Epidemiologie ovariálního karcinomu

Ovariální karcinom je pátou nejčastější malignitou v populaci českých žen a zaujímá první místo v příčinách úmrtí mezi gynekologickými malignitami. Každý rok je v České republice diagnostikováno kolem 1200 nových případů tohoto onemocnění a asi 700 žen na něj zemře (Cibula 2009). Nejaktuálnější data uvádí incidenci 20,64 a mortalitu 12,58 na 100 000 žen pro rok 2010 (data převzata z webového portálu www.svod.cz spolupracujícím s Národním onkologickým registrem ČR). Všeobecné životní riziko vzniku ovariálního nádoru se pohybuje okolo 1,4 %, tj. 1 ze 70 žen. Funkční organizovaný screening ovariálního karcinomu, který by měl dostatečnou senzitivitu, specificitu a pozitivní prediktivní hodnotu, zatím chybí.

Ovariální karcinom se označuje jako „tichý zabiják“, protože jeho symptomy se většinou nerozvíjí dříve než v pokročilých stádiích onemocnění, kdy je šance na vyléčení nízká. Obecně lze říci, že čím dříve je onemocnění zachyceno, tím je jeho prognóza lepší. Léčba a přežití tak závisí na stádiu onemocnění v době diagnózy. Bohužel, více než 75 % pacientek s ovariálním karcinomem je diagnostikováno až v pokročilých stádiích (stádium III a IV podle FIGO). V těchto pozdních stádiích je pětileté přežití 20-30 %. Naopak v časných stádiích I a II je pětileté přežití 90-95 % (Tab. 2-1) (Modugno 2003; Urban 2003).

Ovariální karcinom se vyskytuje ve všech věkových skupinách v závislosti na histologickém typu nádoru. U epitelálního ovariálního karcinomu (EOC) je průměrný věk v době diagnózy 57 let, u nádorů neepitelálních asi 33 let. Incidence tohoto onemocnění roste s věkem (Karlíková 2012).

Ovariální tumory lze rozlišit na benigní, maligní či hraniční (borderline). Jasně ovariální prekancerózy nejsou definované. Ovariální karcinomy jsou považované za nádory chemosenzitivní ale nechemokurabilní.

Tab. 2-1 Souhrn klasifikací TNM a FIGO u ovariálního karcinomu, převzato z <http://www.onkogyn.cz/lekari/karcinom-ovaria>

TNM		FIGO	5 let přežívá (%)
T1a	Postižení jednoho ovaria, pouzdro intaktní, bez nádoru na povrchu ovaria, negativita ascitu nebo laváže	IA	75 – 80
T1b	Postižení obou ovarii, dále jako T1a	IB	
T1c	Jedno nebo obě ovaria + ruptura pouzdra/nádor na povrchu/ pozitivita ascitu nebo laváže	IV	
T2a	Šíření na dělohu/tubu/negativita ascitu nebo laváže	IIA	55 – 65
T2b	Šíření na jiné pánevní tkáně/negativita ascitu nebo laváže	IIB	
T2c	Šíření na dělohu/tubu/v pánvi/pozitivita ascitu nebo laváže	IIC	
T3a	Mikroskopické peritoneální metastázy mimo pánev	IIIA	15 – 55*
T3b	Makroskopické metastázy mimo pánev ≤ 2 cm	IIIB	
T3c	Makroskopické metastázy mimo pánev > 2 cm	IIIC	
T4	Vzdálené metastázy	IV	5 – 10
N1	Postižení pánevních a/nebo paraaortálních lymfatických uzlin	IIIC	15 – 55*
M1	Vzdálené metastázy	IV	5 – 10

* V těchto případech procento přežití závisí na velikosti pooperačního rezidua: čím je velikost pooperačního rezidua větší, tím je u pacientky šance na přežití menší.

Pětileté přežití u stadia I je 75-80 %, u stadia II 55-65 %, u stadia III 15-55 % (závisí na velikosti pooperačního rezidua) a stadia IV 5-10 %. Pětileté přežití v případě pánevní recidivy se pohybuje mezi 14–34.

2.2 Patogeneze ovariálního karcinomu

Patogeneze ovariálního karcinomu není jednoznačně objasněná. Celých 90 % ovariálních karcinomů představuje sporadická forma onemocnění, 5-10 % pak připadá na formu hereditární. Mezi dědičnou a sporadickou formou ovariálního karcinomu existují molekulární rozdíly. Sporadická forma se vyskytuje nejčastěji ve věkové skupině 50-79 let a většina postižených žen má negativní rodinnou anamnézu. Mezi známé faktory ovlivňující výskyt sporadického ovariálního karcinomu patří nuliparita, časná menarche, věk, sterilita, užívání hormonální substituční terapie nebo endometrióza (Karlíková 2012).

Hereditární karcinomy ovaria jsou důsledkem tří hlavních hereditárních syndromů. Jsou to hereditární karcinom prsu a ovaria s mutací tumor-supresorových genů BRCA1 a BRCA2 (Granstrom 2008; Gayther 2010), site-specific syndrom karcinomu ovaria a Lynchův syndrom (nepolypózní kolorektální karcinom) (Cook 2002; Boyd 2003; Karlíková 2012). První dvě formy jsou spojené s mutací v BRCA1 a BRCA2 genech. Nejméně 90 % případů hereditárních ovariálních karcinomů je podmíněno vrozenou mutací tumor-supresorových genů BRCA1 a BRCA2, z toho 60 % připadá na mutace BRCA1 a 30 % na mutace BRCA2 (Karlan 2003). Třetí forma, Lynchův syndrom, je spojena s vrozenou mutací v mismatch repair genech MSH2 nebo MLH1 (Boyd 2003). Celoživotní riziko vzniku karcinomu ovarii se pohybuje u nosiček těchto mutací mezi 20–40 % a je přibližně 10–20krát vyšší než v běžné populaci žen. Předpokládá se, že riziko roste s počtem ovulací. Hereditární forma mívá dřívější nástup a diagnostikovaná bývá v pozdějších stádiích onemocnění.

2.3 Histologická klasifikace ovariálního karcinomu

Z histologického pohledu jsou ovariální malignity velice heterogenní skupinou. Řadí se sem nádory z povrchového epitelu a stromatu (karcinomy a borderline nádory), které tvoří 80-90 % všech ovariálních nádorů, následují nádory z mezodermu gonád (gonadostromální nádory), nádory ze zárodečných buněk, ostatní a sekundární nádory ovarií, které metastazují (Karlíková 2012). Nádory z povrchového epitelu, tj. epiteliální ovariální karcinomy (EOC), jsou nejčastější, tvoří více než 85 % všech diagnostikovaných nádorů ovaria (Agarwal 2003). Podle Mezinárodní federace gynekologie a porodnictví (FIGO) se charakterizují epiteliální ovariální karcinomy do stádií I-IV a podskupin A-C (Tab. 2-1), dále podle histologie a stupně diferenciaci (dobře, středně a málo diferencované). Histologické typy epiteliálních ovariálních karcinomů zahrnují nádory serózní, mucinózní, nádory z jasných buněk (clear cell), endometrioidní, nediferencované a adenokarcinomy (Heintz 2003).

V naší práci jsme hodnotili pouze vzorky epiteliálních ovariálních nádorů a v dalším textu jsme pro lepší přehlednost používali jeden termín „ovariální karcinom“.

Na základě vývoje a chování se dají epiteliální ovariální karcinomy obecně rozdělit na dva typy. Typ I charakterizují dobře identifikované prekuzory, jejich progresse probíhá přes benigní cystu, hraniční (borderline) nádor až k nádoru invazivnímu. Tento typ se omezuje na vaječníky a chová se jako tzv. „pomalý“ nádor, pro který je charakteristický pomalý neinvazivní růst. Geneticky jsou tyto nádory poměrně stabilní. K typu I se řadí serózní a endometrioidní karcinomy nízkého stupně diferenciaci (low-grade), clear-cell a mucinózní karcinomy a maligní Brennerův tumor.

Nádory typu II bývají zachyceny v pokročilých stádiích, jsou agresivní a je pro ně typická přítomnost mutace genu TP53. Geneticky jsou velmi nestabilní. Do této skupiny patří serózní karcinom vysokého stupně diferenciaci (high-grade), karcinosarkom a nediferencovaný karcinom. Serózní karcinom vysokého stupně diferenciaci (high-grade) tvoří až 75 % epiteliálních ovariálních karcinomů a je příčinou téměř 90 % úmrtí na ovariální karcinom.

Ovariální karcinom se šíří přímým přerůstáním do okolních orgánů, jako je močový měchýř, rektum, děloha a další orgány, také cestou lymfatického systému do uzlin a v poslední řadě exfoliací a diseminací nádorových buněk v peritoneální dutině (Karlíková 2012).

2.4 Molekulární mechanismy vzniku ovariálního karcinomu

Příčinou vzniku ovariálního karcinomu jsou mutace dvou skupin klíčových genů, tumor-supresorových genů a protoonkogenů. Mutace tumor-supresorového genu kódujícího protein p53 je u ovariálního karcinomu přítomna přibližně ve 30 %, jiná studie uvádí více než v 50 % nádorů (Hirsh-Yechezkel 2003; Karlan 2003). Nadměrná exprese proteinu p53 byla pozorovaná u 50 % ovariálních nádorů a abnormality p53 bývají přítomny i v inkluzních cystách přilehlých k invazivnímu nádoru (Hirsh-Yechezkel 2003; Karlan 2003). Zdá se, že mutace p53 se objevuje později v průběhu progresu nádoru a je mnohem častější u pozdních stádií ovariálního karcinomu (Karlan 2003; Ozols 2003). Genetická změna, která inaktivuje gen TP53 nebo snižuje expresi pro-apoptotických molekul z rodiny BCL2 genů, podporuje vznik nádoru tím, že znemožňuje odstranění geneticky poškozených buněk cestou programované buněčné smrti (Karlan 2003).

K dalším tumor-supresorovým genům, které se zdají být inaktivované u ovariálních nádorů, patří geny PTEN, p16, Dab2 a LOT1 (Hirsh-Yechezkel 2003; Karlan 2003; Ozols 2003). A jako onkogeny účastníci se patogeneze ovariálního karcinomu a zároveň možné důležité cíle budoucí molekulární terapie byly identifikovány geny RAS, AKT2, C-MYC, HER2/Neu(erb2), PIK3CA a synuklein (Hirsh-Yechezkel 2003; Ozols 2003).

Profil genetických změn se liší podle histologického typu nádoru. Gen TP53 je často mutovaný v serózních nádorech, zatímco mutace genu K-RAS se vyskytuje především v mucinózních nádorech. Tato pozorování podporují hypotézu, že ačkoli odlišné typy epiteliálních ovariálních nádorů mají podle všeho původ ve stejném buněčném typu, histopatologicky, geneticky a biologicky reprezentují odlišné nemoci (Hirsh-Yechezkel 2003; Ozols 2003).

2.5 Léčba ovariálního karcinomu

Primární terapie ovariálního karcinomu zahrnuje chirurgický zákrok a následnou chemoterapii. Výjimečně se aplikuje i radioterapie (Chobanian 2008). Velikost pooperačního rezidua ovlivňuje dobu přežití pacientek. Čím je nádorové reziduum větší, tím je také vyšší riziko recidivy onemocnění a zkrácení doby přežití pacientky. Neoadjuvantní chemoterapie se podává před chirurgickým zákrokem za účelem zmenšení nádoru a zlepšení jeho operability. Adjuvantní chemoterapie se podává po chirurgickém výkonu k léčbě reziduální nemoci, kurativní k léčbě mikroskopické nemoci bez rezidua a paliativní léčba se užívá k redukci velikosti nádoru a zmírnění potíží pacientky.

V 60. letech minulého století se k léčbě karcinomu ovaria používal cyklofosfamid v monoterapii s celkovou léčebnou odpovědí mezi 30–40 %. Zlomové bylo zavedení platinových preparátů do chemoterapie ovariálního karcinomu v 70. letech minulého století. To vedlo k významnému zlepšení prognózy pacientek s touto diagnózou. V 90. letech byl do léčebných schémat zařazený k platinovým derivátům paklitaxel. Kombinace paklitaxelu a karboplatiny aplikovaná v 21 denních intervalech v šesti sériích je v současné době standardem pro zahájení chemoterapie u tohoto onemocnění (Markman 2008). Na chemoterapii v první linii odpovídá až 75 % pacientek, pětileté přežití je ale u pokročilého ovariálního karcinomu jen 20–25 % (Talač 2000; Bolis 2004). U 60 % pacientek dochází do dvou let k recidivě onemocnění i při odpovědi na primární léčbu. Toto riziko roste s rostoucím stádiem v době diagnózy. Recidiva se projevuje většinou vznikem ascitu a zasažením lymfatických uzlin. Vzdálené postižení představují metastázy v játrech, plicích nebo pleuře.

V případech recidivy onemocnění je léčba problematická. Retrospektivní studie na platině založené druhé linii terapie identifikovala dvě podskupiny pacientek s rekurentním ovariálním karcinomem: jsou to platina-senzitivní pacientky ($DFI > 6$ měsíců), kdy je možné platinový derivát opět aplikovat (často opět kombinace karboplatina a paklitaxel) a pak platina-rezistentní pacientky ($DFI \leq 6$ měsíců), kdy se platinový derivát opět nepodává (Gore 1990; Markman 1991). V těchto případech je léčba složitější, protože neexistuje terapeutický standard. U platina-rezistentních

pacientek zahrnuje druhá a vyšší linie chemoterapie paklitaxel v monoterapii, topotekan, gemcitabin, lipozomální doxorubicin, etoposid, docetaxel, ifosfamid nebo oxaliplatinu (Pujade-Lauraine 2010). V současné době probíhá několik mezinárodních studií pro zvýšení účinnosti stávající terapie ovariálního karcinomu. Přehled nejčastěji používaných a námi testovaných cytostatik u vzorků ovariálních karcinomů shrnuje tabulka 2-4.

Tab. 2-4 Charakteristika testovaných cytostatik

Cytostatikum	Charakteristika	Léčba nádorů	Nežádoucí účinky
cisplatina (CisPt)	alkylující sloučenina platiny s fázově nespecifickým účinkem, inhibuje syntézu DNA	ca ovarii, varlat, močového měchýře, malobuněčný ca plic a žaludku	nefrotoxicita, neuropatie, ototoxicita, útlum kostní dřeně
paklitaxel (PTX)	inhibitor mitózy rostlinného původu (taxany), inhibuje depolymeraci mikrotubulů	primární léčba pokročilého EOC, sekundární léčba metastazujícího EOC, ca prsu a bronchiální ca	útlum kostní dřeně, periferní neuropatie, ztráta tekutin
karboplatina (CBDCA)	alkylující sloučenina platiny s fázově nespecifickým účinkem, inhibuje syntézu DNA	časný i pokročilý EOC, ca varlat, močového měchýře, malobuněčný ca plic	mírnější vedlejší nežádoucí účinky než cisplatina, hematotoxicita
gemcitabin (Gmc)	antimetabolit, nukleosidový analog, nahrazuje cytidin během replikace DNA	ca slinivky břišní, malobuněčný karcinom plic, méně u ca močového měchýře, prsu a pokročilý nebo metastazující EOC	útlum kostní dřeně, nauzea, proteinurie, hematurie
topotekan (Topo)	inhibitor topoizomerázy I rostlinného původu, semi-syntetický derivát kamptotecinu	metastatický ca ovarii, ca děložního čípku a malobuněčný plicní karcinom	hematologická toxicita, útlum kostní dřeně, neuropatie
etoposid (Etop)	inhibitor topoizomerázy II, syntetický derivát epipodofylotoxinu	ca varlat, malobuněčný ca plic	útlum kostní dřeně (myelosuprese), anafylaxe

Pozn.: všechna výše uvedená cytostatika se podávají nitrožilní infúzí (intravenózně). ca - karcinom, EOC - epitelální ovariální karcinom.

2.6 Cílená biologická léčba

V prosinci 2011 byla registrovaná první indikace biologické léčby pro karcinom ovaria. K tomuto účelu byl Evropskou komisí schválený bevacizumab (AVASTIN®) a to v kombinaci s karboplatinou a paklitaxelem v úvodní léčbě pokročilého stádia ovariálního karcinomu (IIIB, IIIC nebo IV podle FIGO). Bevacizumab je rekombinantní humanizovaná monoklonální protilátka proti růstovému faktoru cévního endotelu (VEGF), která se uplatňuje v anti-angiogenní léčbě ovariálního karcinomu (Nový 2012). Léčebným výsledkem je regrese a oddálení doby do progresu nádoru. Jeho aplikace má však řadu vedlejších nežádoucích účinků.

Bevacizumab byl do léčby ovariálního karcinomu zahrnutý na základě studií fáze III – GOG-0218 a ICON7. Byl podáváný spolu se standardní chemoterapií první linie a jeho dlouhodobé podávání vedlo k prodloužení doby přežití pacientek (Perren 2011; Burger 2012).

Podle standardů České gynekologické a porodnické společnosti není v České republice bevacizumab doporučený k primární léčbě pacientek s ovariálním karcinomem. Naopak podle doporučení České onkologické společnosti je možné jej v první linii chemoterapie u pacientek s ovariálním karcinomem podat.

2.7 Prognóza

Prognóza pacientek s ovariálním karcinomem jednoznačně závisí na stádiu v době diagnózy a velikosti pooperačního rezidua, tedy velikosti nádorové tkáně, která nemohla být chirurgicky odstraněna. Za všeobecně nepříznivé faktory při ovariálním karcinomu se pak dále považují vyšší věk pacientky, závažné interkurentní choroby, obezita, kachexie, stupeň pokročilosti onemocnění (pokročilá stádia III a IV podle FIGO), přítomnost ascitu, špatná diferenciacie nádorových buněk a histologický typ nádoru (Roztočil 2011). Z hlediska histologického typu nádoru mají nejhorší prognózu nediferencované karcinomy, dále pak karcinomy z jasných buněk (clear cell), serózní karcinomy – endometroidní karcinomy, smíšené karcinomy a mucinózní karcinomy (Fínek 2012).

2.8 Rezistence u ovariálního karcinomu

Ovariální karcinom je klasifikovaný jako chemosenzitivní, ale ne chemokurabilní nádor. Literatura uvádí úspěšnost primární léčby mezi 60 - 80% (Bolis 2004). Střední doba do progrese onemocnění se pohybuje mezi 16-22 měsíci. Až 85 % pacientek, zejména těch diagnostikovaných s pokročilým nádorem ovaria, v průběhu jednoho až dvou let recidivuje (Vasey 2004). S recidivou se pak často objevuje i rezistence k chemoterapii, která má hlavní podíl na vysoké mortalitě u tohoto nádorového onemocnění. Rozvoj lékové rezistence k platinovým preparátům a paklitaxelu je považovaný za hlavní důvod neúspěšné terapie a smrti více než 90 % pacientek s metastatickým ovariálním karcinomem (Agarwal 2003).

Neúspěch chemoterapie tedy spočívá právě v rozvoji lékové rezistence. Tu můžeme obecně rozdělit na rezistenci primární (přirozenou), kterou buňky vykazují bez předchozího styku s cytostatikem a dále pak sekundární (získanou), která se rozvíjí až po kontaktu s cytostatikem.

Z pohledu gynekologické onkologie mají význam dva typy lékové rezistence. Jsou to klasická mnohočetná léková rezistence (rozvoj fenotypu MDR), která patří mezi sekundární rezistence a je spojená s nadměrnou expresí MDR1 genu kódujícího glykoprotein p170 a další asociované proteiny. Tyto proteiny fungují jako efluxní pumpy a transportují cytostatikum z buňky ven (Ling 1974; Fojo 1985). Fenotyp MDR je spojovaný s rezistencí k přírodním produktům a jejich analogům, včetně antracyklinů, vinka alkaloidů a taxanů. Rezistence k přírodním hydrofobním léčivům je pak podmíněná expresí ATP-dependentních efluxních pump, které patří do rodiny ABC transportérů, které jsou sekvenčně a strukturně homologické. ABC proteiny se řadí do sedmi skupin, které kóduje 48 genů (Dean 2001).

Druhým typem podílejícím se na rozvoji rezistence jsou všechny ostatní mechanismy kromě efluxních pump, tedy mechanismy zabraňující doručení léčiva k cílovým buňkám ovlivněné procesy slabé absorpce léčiva při jeho orálním podání, zvýšený metabolismus léčiva, zvýšená exkrece vedoucí k jeho nízké koncentraci v krvi a redukováná difúze do nádorové tkáně (Jain 2001; Pluen 2001). Jde o buněčné

mechanismy jako jsou snížený příjem buňkou v důsledku ztráty membránových transportních proteinů, zvýšená detoxikace reaktivních meziproduktů produkcí glutationu, zvýšená tolerance poškození v důsledku defektní nebo apoptické signalizace nebo zvýšená schopnost reparace poškozené DNA v důsledku probíhajících intenzivnějších oprav poškozené DNA v zasažených buňkách. Rezistentní buňky mohou mít přítomné mutace v genech kódujících opravné proteiny nebo u nich roste tolerance k poškozené DNA (Kelland 2007). Tento typ rezistence je typický pro rezistenci k alkylačním látkám, včetně sloučenin platiny.

Chemorezistence je terapeutický problém, který výrazně limituje úspěšnost zásahu proti řadě lidských nádorů. Je tomu tak i v případě karcinomu ovaria. Onkogenní mutace vedou k inhibici normálních apoptických mechanismů a mohou tak vést ke vzniku nádoru nebo také k rozvoji rezistence k protinádorové léčbě, která vyžaduje apoptickou signalizaci k usmrcení nádorové buňky (Boise 1993; Johnstone 2002; Fulda 2006). Rozdíly mezi primární (vrozenou) a sekundární (získanou) rezistencí se spojují s molekulárními buněčnými mechanismy, jako jsou mutace genu TP53 nebo takové translokace v genomu, které vedou ke zvýšené aktivitě anti-apoptické molekuly Bcl-2. Řada signálních molekul jako např. Xiap, antiapoptický protein inhibující kaspázy, interaguje s řadou signálních drah přežití, jako je PI3K/Akt. Podobně TP53, tumor supresor potřebný pro indukci apoptózy vyvolané chemoterapeutickými agens, se zdá být sám regulovaný anti-apoptickými proteiny jako jsou MDM2 a Akt. Mutace tumor-supresorového genu kódujícího p53 a onkogenu kódujícího c-erbB2 jsou nejčastějšími genetickými změnami nalézány u ovariálních karcinomů. Ztráta funkce p53 vede k rozvoji rezistence nádorových buněk na řadu cytostatik (Lowe 1993; Symonds 1994).

Cytostatika aplikující se v primární a sekundární, případně vyšší línii chemoterapie ovariálního karcinomu, uplatňují následující mechanismy vedoucí k rozvoji rezistence. Rozvoj rezistence po podání platinových komplexů může nastat jako necitlivost vnitřní (vrozená, primární) nebo získaná (sekundární). Projevit se může po prvním podání nebo až v průběhu cytostatické léčby. Rezistence může vznikat na různých signálních úrovních buňky, může být spojená s mechanismy spočívajícími ve sníženém vstupu nebo naopak zvýšeném efluxu cytostatika z buňky. V několika

studiích byl popsán eflux za pomoci transportních přenašečů mědi CTR1, ATP7A a ATP7B (Song 2004). Vysoce polární sloučenina vstupuje do buněk poměrně snadno, její příjem může ovlivnit lokální koncentrace, pH, přítomnost redukčních agens, rychlé hledání membránového transportního systému, který by mohl doplnit pasivní difúzi. Hlavní transportní systém vyžadovaný při homeostáze mědi, CTR1 má podstatný význam v příjmu cisplatin (Ischida 2002). Snížená regulace exprese CTR1 může redukovat příjem cisplatin a tím tedy vést k rozvoji rezistence. Lidské ovariální nádorové buněčné linie rezistentní k alkylačním látkám, jako je cisplatin, mají zvýšené hladiny buněčného glutationu (Green 1984). Dalším mechanismem rezistence může být detoxikace pomocí sirných sloučenin glutation-S-transferázy nebo metalotionenu. Thioly vykazují ke sloučeninám platiny vysokou afinitu. Po jejich vzájemné interakci nedochází k vazbě platinových cytostatik na DNA, naopak jsou z buňky odstraňované (Rabik 2007).

Rezistence k taxanům, kam patří také paklitaxel, je spojovaná se změnami v proteinu tubulinu, který interaguje s buněčnými mikrotubuly, energeticky závislými efluxními pumpami, apoptickými proteiny a transdukcí signálních drah (Greenberger 2006). Literatura uvádí, že rozvoj lékové rezistence na paklitaxel se zdá být důvodem selhávání primární léčby a smrti více než 90 % pacientek s metastatickým ovariálním karcinomem (Agarwal 2003).

Na nukleosidový analog gemcitabin se také může rozvíjet rezistence. Ta může vycházet z jeho sníženého příjmu buňkou a to v důsledku snížené exprese transportních molekul SLC29A1 (El Maalouf 2009). Změny v expresi nebo funkci enzymů metabolizujících gemcitabin mohou také vést ke změně jeho účinnosti. Výsledkem pak mohou být změny v proliferaci, přežití a apoptické signalizaci u buněk ovlivněných gemcitabinem (El Maalouf 2009).

Topotekan jako inhibitor enzymu topoizomerázy I se uplatňuje v léčbě recidivujících gynekologických malignit (Lorusso 2010). Pro topotekan byl v podmínkách *in vivo* zjištěný rozvoj rezistence na základě zvýšené exprese efluxního transportéru ABCG2 patřícího do skupiny ABC transportních systémů (Zander 2012).

Buňky vystavené účinku etoposidu po čase vykazují rozvoj mnohočetné lékové rezistence. To platí i pro další cytostatika patřící do skupiny inhibitorů topoizomerázy II. Mechanismy vedoucí k rozvoji rezistence na etoposid zahrnují změnu aktivity topoizomerázy II (Lage 2000) nebo deregulaci apoptické dráhy přes receptory smrti (Friesen 1999).

Pro úplnost literatura zmiňuje také význam mikroprostředí nádorové tkáně, kdy nádorové buňky vyžadují vzájemné mezibuněčné interakce a interakce s buněčnou matrix. Jejich porušení může také vést k rozvoji rezistence na cytostatickou léčbu a to přes dráhy inhibující apoptózu (Morin 2003).

Prediktivní testování *in vitro* - testy chemosenzitivity

2.9 *In vitro* testy chemosenzitivity

In vitro testy chemosenzitivity se uplatňují při testování nových, potenciálně použitelných léčebných látek, sestavování nových léčebných protokolů a někdy také pro volbu individuální terapie. Prediktivní testování *in vitro* je vhodným nástrojem při rozhodování o tom, který z několika dostupných léčebných režimů použít u jednotlivých pacientů (Cree 2009). Samozřejmě, že je snazší determinovat v podmínkách *in vitro* rezistenci než senzitivitu. Rezistence určená v podmínkách *in vitro*, bude pravděpodobně v podmínkách *in vivo* stejná. Naopak senzitivita determinovaná v podmínkách *in vitro*, kde chybí řada dalších biologických faktorů, které účinnost chemoterapeutika ovlivňují, nebude s největší pravděpodobností v podmínkách *in vivo* totožná. Tedy určení rezistence v podmínkách *in vitro* má svůj význam, ale určení senzitivity v těchto podmínkách je mnohem méně spolehlivé (Chumchalová 2000).

Protože je každý nádor pacienta genotypově a fenotypově odlišný (Bown 1994; Zubor 2008), znamená to, že na totéž léčivo může každý pacient reagovat odlišně. Z tohoto důvodu bylo snahou vyvinout prediktivní *in vitro* testy k určení reaktivity na cytostatika (Hamburger 1981; Massaro 1989; Pieters 1990; Möllgård 2003).

Už v padesátých letech dvacátého století se objevovaly první *in vitro* testy se snahou predikce reaktivity k testované látce v podmínkách *in vitro* (Black 1954). Toto testování mělo v podmínkách *in vitro* předurčit efektivitu testované látky v podmínkách *in vivo*. Práce ale nevzbudila velký zájem. Další rozvoj nastal v sedmdesátých letech, kdy byla vyvinuta metoda HTCA (Hamburger 1977), která patří mezi tzv. klonogenní testy. Druhou skupinu tvoří testy neklonogenní zahrnující test inkorporace thymidinu (TIA), bioluminiscenci adenosintrifosfátu (ATP-b), MTT test, diferenciální barvení cytotoxicity (DiSC) nebo test extrémní lékové rezistence (EDR).

Všechny uvedené techniky mají společné základní kroky spočívající v izolaci buněk z biologického materiálu, jejich inkubaci s protinádorovými léčivy, určení množství přežívajících buněk a interpretaci buněčné odpovědi.

Testy chemorezistence u vzorků stabilizovaných buněčných linií nebo primokultur se dělí na základě dvou odlišných přístupů, klonogenního a neklonogenního. Oba hodnotí různými postupy stupeň poškození testovaných buněk.

2.9.1 Klonogenní testy

Klonogenní typ testů byl odvozený od kolonie tvořících testů (CFU) prováděných u bakterií a kmenových buněk kostní dřevě (Hamburger 1977). Mezi klonogenní testy patří metoda HTCA (Human Tumor Cloning Assay). Testované nádorové buňky rostou na polotuhých agaroch a tvoří kolonie, zatímco normální buňky jsou inhibované v růstu. Poškození buněk testovanou látkou se hodnotí porovnáním s buňkami kontroly, tj. neovlivněnými buňkami (Schlag 1984). Testy umí rozlišit normální populaci buněk od buněk nádorových a hodnotit stupeň jejich poškození, ale ne jeho příčinu (Chumchalová 2000). Klonogenní testy nedokáží určit poškození buněk v G_0 fázi buněčného cyklu. Výraznou nevýhodou této metody je požadavek na vysoký počet izolovaných buněk a to, že jen některé z nich jsou schopné na agarovém médiu růst. Tento fakt ztěžuje interpretaci testu (Hoffman 1991).

2.9.2 Neklonogenní testy

Neklonogenní testy jsou založené na určení podílu proliferujících a neproliferujících buněk, respektive na podílu živých, přežívajících a mrtvých buněk. Neklonogenní testy tak můžeme rozdělit na testy hodnotící buněčnou proliferaci a testy hodnotící apoptózu testovaných buněk. U buněk pak lze sledovat jejich metabolickou aktivitu nebo změnu membránové integrity po ovlivnění testovaným cytostatikem. Výhodou těchto metod je možnost ovlivnit buňky v G₀ fázi buněčného cyklu, relativně nízká potřeba množství buněk, časová nenáročnost testů (řádově dny), vysoká úspěšnost jejich provedení a z toho plynoucí vysoké procento vyhodnotitelných vzorků nebo možnost vyhodnotit účinnost více cytostatik v jednom testu. Nevýhodou testů je, že nedokáží odlišit buňky nádorové od nenádorových (Chumchalová 2000). Mezi neklonogenní testy patří testy membránové integrity a testy hodnotící metabolickou aktivitu buněk, tedy ATP nebo MTT test (Hoffman 1991). Tyto testy jsou používané mnohem častěji než testy klonogenní.

2.9.2.1 Testy hodnotící buněčnou proliferaci

Tyto testy využívají schopnosti proliferujících buněk inkorporovat tritiem (³H) značený tymidin do nově syntetizované molekuly DNA. Mezi tyto testy patří test extrémní lékové rezistence EDR. Dnes je tento typ testů komerčně dostupný a často používaný americkými onkology. Je založený na tom, že testované buňky jsou vystavené působení vysokých koncentrací testovaných cytostatik po dlouhou inkubační dobu. Buňky, které přežijí tuto extrémní zátěž, se považují za extrémně rezistentní. Tato testovaná cytostatika jsou pak považována za potenciálně neefektivní *in vivo* a v terapii by se proto mělo použít jiné léčivo (Chumchalová 2000). EDR test se tak používá k predikci neúspěchu terapie (Loizzi 2003).

2.9.2.2 Testy hodnotící buněčnou smrt

Tyto testy po skončení inkubační doby hodnotí míru poškození testovaných buněk. Výrazné poškození buněk může vést k jejich smrti, apoptóze. Mezi tyto testy patří testy hodnotící integritu buněčné membrány, změny aktivity mitochondriálních enzymů nebo ztrátu buněčného ATP.

Testy membránové integrity

Testy membránové integrity zahrnují vitální a supravitální techniky barvení buněk. K vitálnímu barvení buněk se používá neutrální červeň (Neutral red test). Živé buňky mají schopnost vázat a inkorporovat barvivo do lysozomů. Poškozené buňky mají sníženou schopnost vazby a inkorporace barviva a mrtvé buňky toho nejsou schopné vůbec. Na základě spektrofotometrického měření je pak možné hodnotit viabilitu buněk. Metoda je levná a senzitivní v porovnání s dalšími cytotoxickými testy.

Supravitální testy používají cytotoxická barviva, jako je trypanová modř nebo metylenová zeleň, k barvení buněk. Živé buňky nejsou schopné přijímat barvivo přes neporušenou buněčnou membránu, proto se jejich cytoplazma nebarví. U mrtvých buněk je integrita membrány porušená, barvivo proto vniká dovnitř buňky a tím její cytoplazmu obarví.

Alternativou testu je použití kombinace vitálního barviva (fluorescein diacetát) a supravitálního barviva (propidium jodid). Živé buňky se barví fluoresceinem zeleně a jádra mrtvých buněk propidium jodidem červeně. Procenta obarvených buněk se poté hodnotí mikroskopicky (Pavlik 1985).

Testy metabolické aktivity

ATP test

ATP test je založený na kvantitativním měření bioluminiscence ATP pomocí enzymu luciferázy. ATP se uvolňuje z mrtvých a stresu podléhajících buněk. Uvolněné

extracelulární ATP reaguje s luciferázou a bioluminiscence se měří luminometrem. Existuje lineární závislost mezi luminiscencí a množstvím extracelulárního ATP. Měřit se dá ale i intracelulární ATP v živých buňkách, endpoint ATP na základě detekce množství luciferin-luciferázy. Na ATP založený test nádorové chemosenzitivity ukázal robustnost a reprodukovatelnost a byl částečně rozvinutý použitím vzorků ovariálních karcinomů (Han 2008).

MTT test

Metoda byla zavedena roku 1953 Blackem a Speerem (Black 1953) a Mosmann ji pak v roce 1983 představil v její poloautomatické formě (Mosmann 1983). MTT test je definovaný jako rychlý, spolehlivý a objektivní, vhodný pro rozsáhlé hodnocení lékové rezistence u leukemií a lymfomů (Veerman 1990). Později byl upravený na hodnocení lékové rezistence lidských leukemických buněk a buněk jiných typů nádorů (Pieters 1988; Hwang 1993; Taylor 2001; Sargent 2003).

MTT je kolorimetrický test pro měření metabolické aktivity mitochondriálního enzymu sukcinátdehydrogenázy, která redukuje žlutou tetrazoliovou sůl MTT ((3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromid) na fialový formazan. Roztok detergentu, sodiumdodecylsulfátu (SDS) se používá k rozpuštění krystalů formazanu. Test se vyhodnocuje spektrofotometricky měřením absorbance při λ 560 nm. Výsledky se porovnávají s kontrolou, tj. neovlivněnými buňkami. Mezi absorbancí a viabilitou buněk existuje přímá závislost, tedy čím větší je hodnota absorbance, tím vyšší je viabilita buněk. Reakce probíhá jen na mitochondriálních membránách živých buněk. MTT test dává rychlé a reprodukovatelné výsledky se signifikantní klinickou relevancí. Neposkytuje ale žádnou informaci o molekulárním mechanismu lékové rezistence (Hatok 2009).

Výhody testu spočívají v absenci promývacích kroků, relativní rychlosti, přesnosti a absenci radioizotopů (Mosmann 1983). Má ale i své nevýhody jako je slabá linearita s počtem buněk, citlivost k vnějším podmínkám prostředí a závislost metabolismu buněk na formazanu (Denizot 1986; Boyd 1989; Haselberger 1996).

2.9.3 Ostatní testy

Pro úplnost výčtu *in vitro* prediktivních testů je potřeba zmínit také histokultury. Jako optimální matrix pro trojrozměrné fragmentové primokultury se využívají želatinové houbičky (The Upjohn Comp., Kalamazoo, MI, 49001, USA). Jsou vhodným substrátem pro explantované fragmenty tkáně. Tato metoda udržuje (primo)kulturu v její přirozené struktuře a proliferační aktivitě podobné fyziologickým podmínkám (Chumchalová 2000).

3. CÍLE PRÁCE

V předkládané práci jsme si stanovili následující cíle:

3.1 Testování chemosenzitivity u buněk lidského ovariálního karcinomu v podmínkách *in vitro* – klinické vzorky

1. Jaká je reaktivita souboru klinických vzorků na testovaná cytostatika?
2. Liší se chemosenzitivita čerstvě izolovaných buněk a buněk po jejich rozmrazení?
3. Liší se chemosenzitivita u buněk izolovaných ze solidního nádoru a ascitu téže pacientky?
4. Liší se reaktivita vzorků téže pacientky v čase (pacientky s recidivou onemocnění, opakované odběry)?

3.2 Testování chemosenzitivity *in vitro* na modelovém systému lidské ovariální nádorové buněčné linie A2780

Zjistit citlivost buněčné linie A2780 na testovaná cytostatika hodnocením její morfologie, metabolické aktivity, proliferace a apoptózy po ovlivnění cytostatiky a srovnání její reaktivity s reaktivitou klinických vzorků.

4. MATERIÁL A METODY

4.1 Chemikálie

Testovaná cytostatika

Cisplatina - CisPt 100 µg/ml (EBEWE Pharma Ges.m.b.H. Nfg.KG, Rakousko), Paklitaxel - PTX 50 µg/ml (Pliva-Lachema a.s., ČR), Karboplatina - CBDCA 100 µg/ml (EBEWE Pharma Ges.m.b.H. Nfg.KG, Rakousko), Gemcitabin - Gmc 300 µg/ml (Gemzar 200 mg, Eli Lilly, s.r.o., ČR), Topotekan - Topo 50 µg/ml (Hycamtin 4 mg, GlaxoSmithKline, UK), Etoposid – Etop 50 µg/ml (Teva Pharmaceuticals, s.r.o., ČR)

Amersham Biosciences

ECL Western blotting detection kit

BioRad

odtučněné sušené mléko (non-fat dry milk), Precision Plus Protein™ Dual Color Standard

Boehringer Mannheim-Roche

5-(2,4-disulfonatofenyl)-3-(4-jodfenyl)-2-(4-nitrofenyl)-2H-tetrazolium (WST-1), chemiluminiscenční detekční kit (ECL Western Blot Detection Reagents), Complete™ Mini Tablets

Cell Signaling Technology, Inc.

polyklonální králičí protilátka proti Cdc25A, polyklonální králičí protilátka proti cyklinu B1, monoklonální myší protilátka proti cyklinu D1, monoklonální myší protilátka proti PCNA, králičí protilátka proti BAX, monoklonální králičí protilátka proti XIAP, monoklonální myší protilátka proti p53, monoklonální myší protilátka proti β-aktinu

DAKO

polyklonální prasečí anti-králičí protilátka konjugovaná s křenovou peroxidázou, polyklonální prasečí anti-myší protilátka konjugovaná s křenovou peroxidázou

Eli Lilly

inzulín

GIBCO

penicilin, streptomycin, trypsin/EDTA

Guerbet

Telebrix 35

Molecular Probes

sekundární protilátka Alexa Fluor[®] 488, SlowFade[®] medium

PAA, The Cell Culture Company

fetální bovinní sérum (FBS), médium RPMI 1640 s L-glutaminem, bez fenolové červeně

Santa Cruz Biotechnology, Inc.

monoklonální myší protilátka proti p21

Serva

Ficoll 400

Sigma Aldrich

3-(4,5-dimethyl-2-thiazolyl)-2,5-diphenyl-2H-tetrazolium bromide (MTT), 4',6-diamidino-2-phenylindol (DAPI), kit pro fluorescenční stanovení aktivity kaspázy 3 (Caspase 3 Assay Kit, Fluorimetric), bovinní sérový albumin (BSA), Coomassie Brilliant Blue, dimethylsulfoxid (DMSO), sodium dodecyl sulfát pro molekulární biologii (SDS), approx. 99 %, (10 % roztok), HEPES sodná sůl, 3-[(3-cholamidopropyl)dimethylammonio]-1-propanesulfonate hydrate (CHAPS), dithiothreitol (DTT), paraformaldehyd, propidium jodid (PI), ribonukleáza A, triton-X

Zentiva

heparin

Kvalita ostatních použitých chemikálií odpovídala nejvyšší analytické čistotě.

4.2 Spotřební materiál pro kultivaci buněk

Nunc (Roskilde, Dánsko): plastové kultivační lahve 25 cm² a 75 cm², 96-jamkové mikrotitrační destičky

Becton-Dickinson (New Jersey, USA): plastové kultivační lahve 12,5 cm²

Hettich (Tuttlingen, Německo): cytopspinové komůrky

4.3 Klinické vzorky ovariálního karcinomu

4.3.1 Soubor klinických vzorků

Klinické vzorky byly získané od pacientek podstupujících chirurgický zákrok v důsledku diagnózy ovariálního karcinomu na Porodnické a gynekologické klinice Fakultní nemocnice v Hradci Králové. Soubor zahrnoval vzorky nádorů různého stádia a diferenciačního stupně ovariálního karcinomu. Odebírané byly solidní nádory a ascity, jednalo se o primární nálezy i recidivy onemocnění. Všechny pacientky podepsaly informovaný souhlas a studie byla vedena podle pravidel místní etické komise. Všechny klinické vzorky byly anonymní a informace o stagingu, gradingu, histologickém typu nádoru a odpovědi na léčbu, případně doba do objevení se recidivy onemocnění, jsme neměli k dispozici.

Během let 2006-2011 bylo získáno 194 vzorků, 144 z nich bylo plně testováno. Průměrný věk souboru pacientek byl 63,5 roku, nejstarší pacientce v souboru bylo 86 let a nejmladší 28 let v době diagnózy.

V době diagnózy byl soubor rozdělený podle věku pacientek takto: pacientky do 20 let 0 %, pacientky 20–34 let 1,7 %, pacientky 35-44 let 1,7 %, pacientky 45-54 let 26,0 %, pacientky 55-64 let 25,2 %, pacientky 65-74 let 26,2 %, pacientky 75-84 let 17,5 % a pacientky nad 85 let 1,7 %. Nejvyšší incidence byla zaznamenána u daného souboru v kategorii 65-74 let. V případech, kdy bylo ze vzorku izolované malé množství buněk, byla přednostně testovaná cytostatika v pořadí cisplatina, paklitaxel, karboplatina a topotekan.

4.3.2 Média pro klinické vzorky

Transportní médium pro solidní nádory: RPMI 1640 médium s L-glutaminem, Penicilin/Streptomycin (100 U/ml), 15 % fetální bovinní sérum, inzulín (100 IU/ml), transferin (2 mg/ml), heparin (25 000 IU/ml)

Transportní médium pro ascites: 15 % fetální bovinní sérum, heparin (25 000 IU/ml)

Promývací médium: RPMI 1640 médium s L-glutaminem, Penicilin/Streptomycin (100 U/ml)

Kultivační médium: RPMI 1640 médium s L-glutaminem, Penicilin/Streptomycin (100 U/ml), 15 % fetální bovinní sérum, inzulín (100 IU/ml), transferin (2 mg/ml)

4.3.3 Izolace buněk

4.3.3.1 Izolace buněk ze solidního nádoru

Vzorek nádorové tkáně se rozstříhal na malé kousky, 5 x 5 mm, jako prevence centrální nekrotizace tkáně a poté transportoval v 50 ml centrifugační zkumavce s transportním médiem pro solidní nádor při laboratorní teplotě na pracoviště Ústavu lékařské biologie a genetiky, kde byl dále zpracovaný. Tkáň v transportním médiu se přelila na nerezové sítko (Sigma Aldrich), rozstříhala na malé kousky a dále se protlačovala skrz sítko pístem injekční stříkačky do Petriho misky. Buňky v suspenzi se nalily na 5 ml gradientu (Ficoll 400, Telebrix 35 a destilovaná voda, hustota gradientu 1,077 kg/l) v centrifugačních zkumavkách a centrifugovaly 30 min při 2200 rpm a laboratorní teplotě v centrifuze (Jouan MR23i, TrigonPlus). Vzorek tkáně se mechanicky desintegroval a izolované buňky oddělily od erytrocytů a mrtvých buněk na hustotním gradientu. Pod gradientem se usadily erytrocyty a mrtvé buňky a ve střední části, na rozhraní mezi gradientem a médiem, živé buňky v podobě prstence. Buňky se sesbíraly do nové zkumavky Pasteurovou pipetou, promyly promývacím médiem a opět centrifugovaly 5 min při 1600 rpm a laboratorní teplotě.

Pokud po stočení peleta obsahovala erytrocyty, bylo potřeba je lyzovat 5 ml destilované vody po dobu maximálně 30 s a poté lýzu zastavit 0,5 ml 10x koncentrovaným roztokem PBS bez iontů. Zkumavky se doplnily promývacím médiem a opět centrifugovaly. Počet lyzačních kroků se lišil podle množství erytrocytů ve vzorcích.

Po poslední lýze se pelety resuspendovaly, promyly promývacím médiem a centrifugovaly. Pelety z jednotlivých zkumavek se nakonec sesbíraly do jedné, promyly promývacím médiem a naposledy centrifugovaly. Po naředění kultivačním médiem byly buňky připravené k testování.

4.3.3.2 Izolace buněk z ascitu

Vzorky ascitů byly transportované v 500 ml skleněných lahvích s transportním médiem při laboratorní teplotě. Bylo-li to potřeba, ascites se přelával přes nerezové sítko, aby se oddělily kousky tkáně a krevní sraženiny. Ascites se přelil do 50 ml falkonek a centrifugoval 10 min při 1500 rpm. Buňky z ascitu se izolovaly jednoduchou centrifugací.

Pokud pelety obsahovaly erytrocyty, bylo třeba je lyzovat 9 ml destilované vody po dobu maximálně 30 s a lýza se zastavovala 1 ml 10x koncentrovaného roztoku PBS bez iontů. Tuby se doplnily promývacím médiem a centrifugovaly.

Po poslední lýze se pelety resuspendovaly, promyly promývacím médiem a centrifugovaly. Pelety z jednotlivých zkumavek se nakonec sesbíraly do jedné, promyly promývacím médiem a centrifugovaly. Po naředění kultivačním médiem byly buňky připravené k testování.

4.3.4 Viabilita buněk

Viabilita izolovaných buněk se určovala barvením 0,4% roztokem trypanové modři a počítáním v Neubauerově komůrce. Pro testování chemosenzitivity v podmínkách *in vitro* se použily vzorky s viabilitou vyšší než 80 %. V případě buněčných suspenzí vzorků po rozmrazení byla jejich viabilita nižší, mezi 50 – 80 %, v porovnání s čerstvě izolovanými buňkami.

4.4 Příprava testovaných cytostatik

4.4.1 Příprava pracovních roztoků cytostatik

Pracovní roztoky se připravovaly naředěním originálních roztoků cytostatik (Tab. 4-4-1).

Tab. 4-4-1 Příprava pracovních roztoků cytostatik. Originální koncentrované roztoky se ředily fyziologickým roztokem pro dosažení finální koncentrace pracovních roztoků cytostatik.

Cytostatikum	Originální roztok cytostatika	Celkový objem roztoku (μl)	Množství zásobního roztoku (μl)	Fyziologický roztok (μl)	Koncentrace pracovního roztoku (μg/ml)
CisPt	10 mg/20 ml	360	360	0	500
PTX	6 mg/1 ml	360	15	345	250
CBDCA	150 mg/15 ml	360	18	342	500
Gmc	200 mg + 5 ml fyziol. roztoku	360	13,5	346,5	1500
Topo	4 mg + 4 ml aqua pro inj.	360	90	270	250
Etop	20 mg/1 ml	360	4,5	355,5	250

Pozn.: Takto připravené pracovní roztoky (nejvyšší testované koncentrace = c_1) se uchovávaly při -20 °C.

4.4.2 Příprava koncentračních řad testovaných cytostatik

Každé cytostatikum bylo testované v šesti sestupných koncentracích, které byly připravené následujícím postupem: do řádku A mikrotitrační destičky se pipetovalo 150 μ l pracovních roztoků (nejvyšší testované koncentrace) v pořadí cytostatik CisPt – Etop (viz. Tab. 4.3). Do řádků B – F se pipetovalo 150 μ l fyziologického roztoku. Do řádku B se přeneslo multikanálovou pipetou 50 μ l roztoku z řádku A. Vznikl tak roztok o koncentraci čtyřikrát nižší než v řádku předchozím. Tento postup se opakoval v dalších řádcích destičky.

Tab. 4-4-2 Sestupná koncentrační řada testovaných cytostatik

Každé cytostatikum bylo testované v šesti koncentracích c_1 - c_6 . V prvním řádku jsou uvedené nejvyšší testované koncentrace, každá následující je čtyřikrát nižší. Koncentrace c_4 byla vyhodnocená jako střední inhibiční koncentrace pro další testování na modelové linii A2780.

Koncentrace (μ g/ml)	CisPt	PTX	CBDCA	Gmc	Topo	Etop
c_1	100	50	100	300	50	50
c_2	25	12,50	25	75	12,50	12,50
c_3	6,25	3,13	6,25	18,75	3,13	3,13
c_4	1,56	0,78	1,56	4,69	0,78	0,78
c_5	0,39	0,20	0,39	1,17	0,20	0,20
c_6	0,10	0,05	0,10	0,29	0,05	0,05

4.5 Ovlivnění a kultivace izolovaných buněk

Peleta nádorových buněk získaná po izolaci z nádorové tkáně nebo ascitu se jemně rozklepala a podle množství izolovaných buněk bylo přidáno kultivační médium. Koncentrace buněk v suspenzi byla určena počítáním v Neubauerově komůrce. Koncentrace buněk se upravovala na 1×10^6 buněk/ml. Konečný objem buněčné suspenze o požadované koncentraci limitoval počet testovaných cytostatik (cca 1 ml suspenze na jedno cytostatikum). Počet testovaných cytostatik byl ovlivněn kvalitou a množstvím dodaného vzorku tkáně. V první části testování se navíc část buněčné suspenze zamrazovala pro další testování.

Buněčná suspenze o koncentraci 1×10^6 buněk/ml se pipetovala po 80 μ l do 96-jamkových kultivačních destiček kromě prvního sloupce (blenk). K 80 μ l buněčné suspenze se přidalo 20 μ l média v případě kontrolních buněk a 20 μ l roztoků cytostatik (Tab. 4.3.5.2). Buňky se kultivovaly 72 h v inkubátoru při 37 °C a atmosféře 5% CO₂.

4.6 Testování chemorezistence – MTT test

Po skončení kultivace se do každé jamky mikrotitrační destičky pipetovalo 10 μ l roztoku žluté tetrazoliové soli MTT (5 mg/ml). Během 2 – 6 hodin po vytvoření fialových krystalů formazanu se do každé jamky pipetovalo 100 μ l 10 % roztoku SDS, pH 5. Krystaly formazanu se rozpouštěly přes noc. Spektrofotometrické vyhodnocení, měření absorbance formazanu, bylo provedeno na spektrofotometru (SpektraFluor Plus, Tecan, Salzburg, Austria) při vlnové délce 560 nm. Od naměřených hodnot byla odečtená hodnota pozadí (médiu) a výsledky byly vyjádřeny jako procenta kontroly.

4.7 Hodnocení reaktivity na testovaná cytostatika

Primární data se exportovala do MS Excel, kde byly sestrojeny křivky dávkových závislostí pro každé cytostatikum a odečteny hodnoty EC50, tj. koncentrace testované látky, která je letální pro 50 % testovaných nádorových buněk. Z grafu bylo možné vyčíst, kolik procent buněčné populace přeživalo nejvyšší (terapeuticky nepoužitelnou) testovanou koncentrací cytostatika.

Spektrofotometrické měření absorpance a výpočet hodnoty EC50 pro každé cytostatikum byly základem pro hodnocení reaktivity klinického vzorku. Podle hodnoty EC50 spadající do jednoho z intervalů (Tab. 4-7) byla určena reaktivita vzorku jako vnímavost, hraniční vnímavost nebo rezistence.

Pokud cytostatikum ve vysoké koncentraci působí pokles počtu živých buněk pod 25 %, buňky se označují jako vnímavé k působení léčiva. Zabíjí-li nejvyšší testovaná koncentrace léčiva více než 25 % ale méně než 50 % buněk, označují se jako hraničně (středně) vnímavé. A pokud buňky přežívají nejvyšší testovanou koncentrací léčiva, označují se jako rezistentní.

EC50 je koncentrace léčiva, která zabíjí 50 % buněk. Poskytuje rychlé a reprodukovatelné výsledky, ale neříká nic o mechanismech rezistence (Hatok 2009). Slovní interpretace výsledků reaktivit a testovaná koncentrační rozmezí byla vytvořena na základě mnoha klinických experimentů v Laboratoři experimentální medicíny Fakultní nemocnice Olomouc, odkud byl postup zpracování a testování klinických vzorků převzat. Analogická koncentrační rozmezí uvádí také literatura (Hatok 2009).

Tab. 4-7 Hodnocení reaktivity klinických vzorků. Pro každé cytostatikum byla vypočtená hodnota EC50. Koncentrační interval, ve kterém EC50 leží, určuje reaktivitu vzorku. Slovní interpretace výsledků reaktivit pro jednotlivá cytostatika vycházela z praxe užívané lékaři Gynekologicko-porodnické kliniky Fakultní nemocnice v Hradci Králové.

Cytostatikum	Vypočtená hodnota EC50 (µg/ml)		
	rezistence	hraniční vnímavost	vnímavost
CisPt	100 - 18,75	18,75 - 6,25	< 6,25
PTX	50 - 9,38	9,38 - 3,13	< 3,13
CBDCA	100 - 18,75	18,75 - 6,25	< 6,25
Gmc	300 - 56,25	56,25 - 18,75	< 18,75
Topo	50 - 9,38	9,38 - 3,13	< 3,13
Etop	50 - 9,38	9,38 - 3,13	< 3,13

4.8 Zamrazení buněk izolovaných z EOC

Izolované buňky se naředily kultivačním médiem a centrifugovaly v předchlazené centrifuze 5 min při 500 rpm a 4 °C. Následně se odsál supernatant a buňky opatrně resuspendovaly v zamrazovací směsi (10 % DMSO ve FBS) v konečné koncentraci 1×10^7 - 2×10^7 buněk/ml. Směs se rozplnila po 1 ml do předchlazených kryozkumavek, které se ihned uložily do kryokontejneru vychlazeného na 4 °C. Kryokontejner se zkumavkami se uložil při -20 °C po dobu jednoho dne, následně při -80 °C po dobu tří dnů a pak do tekutého dusíku po dobu několika týdnů (2 – 6 týdnů) než byly buňky opět testované na MTT.

4.9 Rozmrazení buněk izolovaných z EOC

Zamrazené buňky v kryozkumavkách se rozmrazovaly za stálého třepání ve vodní lázni. Suspenze se ihned pipetovala do 15 ml zkumavky s obsahem cca 10 ml promývacího média a dále zpracovala. Takto rozmrazené buňky byly opět testované na citlivost k cytostatikům MTT testem.

4.10 Buněčná linie A2780 a její kultivace

Stabilizovaná buněčná linie A2780 byla získaná z katalogu Evropské sbírky buněčných kultur European Collection of Animal Cultures (ECACC, Porton Down, Wiltshire, England, katalog. číslo 93112519). Linie byla odvozená od lidského epiteliálního ovariálního karcinomu. Buňky rostou v médiu RPMI 1640 obohaceném o 2mM glutamin a 10% fetální bovinní sérum (FBS). Buňky se pasážovaly třikrát týdně za použití 0,25 % roztoku trypsinu obohaceného o EDTA. Kultivace probíhala při 37°C a 5% CO₂ a buňky rostly jako monolayer. Kultury byly pravidelně testované na přítomnost mykoplazmat pomocí metody PCR.

Tato buněčná linie A2780 byla použita jako modelový systém při testování chemorezistence u buněk lidského ovariálního karcinomu v podmínkách *in vitro*.

4.11 Testy metabolické aktivity

4.11.1 MTT

Postup shodný jako při testování klinických vzorků (odstavec 4.1 – 4.7).

4.11.2 WST-1 a stanovení celkového množství proteinů v buňkách (barvení Coomassie Brilliant Blue)

Pro stanovení metabolické aktivity buněk byl použit kit Cell proliferation reagent WST-1 (Boehringer Mannheim-Roche) a celkové množství proteinů bylo stanovené postupem podle Bradfordové (Bradford 1976). Po skončení inkubačního intervalu 72 h se buňky v mikrotitračních destičkách 2x opláchly PBS a do jamek se přidalo po 100 μ l WST-1 v médiu (0,3 mg/ml). Absorbance se měřila při 450 nm proti 650 nm (spektrofotometr SpektraFluor Plus, Tecan, Salzburg, Austria). Poté se destičky inkubovaly v termostatu a po 2 h se provedlo další měření. Po skončení měření se destičky 2x opláchly PBS a fixovaly roztokem metanolu. Následně se buňky barvily roztokem Coomassie Brilliant Blue (0,4 mg/ml) 1 h. Poté se oplachovaly roztokem o složení 85 % destilovaná voda, 10 % absolutní etanol, 5 % ledová kyselina octová. Navázané barvivo se rozpouštělo přidáním 100 μ l desorpčního roztoku na jamku (98 mg octan draselný, 700 ml etanol a 300 ml H₂O) za mírného třepání po dobu 1 h. Absorbance se měřila při 620 nm proti 450 nm (spektrofotometr SpektraFluor Plus, Tecan, Salzburg, Austria).

4.12 Dynamické měření buněčné proliferace pomocí systému xCELLigence

xCELLigence systém (Roche) se užívá k monitorování cytotoxicity s využitím technologie elektrických buněčných senzorů. Speciální xCELLigence E-destičky se plnily 100 μ l RPMI na jamku a determinoval se signál pozadí. Poté se do každé jamky přidalo po 100 μ l buněčné suspenze o koncentraci 25 000 buněk/jamku. Buňky se nechaly 30 min adherovat na dna jamek při laboratorní teplotě. E-destičky se umístily do zařízení xCELLigence v inkubátoru a po dobu 24 h se sledovala buněčná proliferace. Po této době se přidaly roztoky testovaných cytostatik v koncentračních řadách (Tab. 4.3.5.2) a sledoval se buněčný index po dobu dalších 72 h. Systém měří relativní změnu v impedanci a naměřené hodnoty převádí na arbitrární jednotky nazývané buněčný index. Po uplynutí inkubační doby software přístroje vypočetl hodnoty EC50 pro každé testované cytostatikum.

4.13 Morfologická studie – fotodokumentace

10 ml buněčné suspenze A2780 o koncentraci 2×10^5 buněk/ml se nasazovalo do malých kultivačních lahvíček ($12,5 \text{ cm}^2$) a kultivace probíhala 24 h při $37 \text{ }^\circ\text{C}$ a 5% CO_2 . Po této době bylo médium vyměněno za médium s příslušnou koncentrací testovaného cytostatika (střední inhibiční koncentrace c_4). V časových intervalech 0 h – 24 h – 48 h – 72 h byly kontrolní a ovlivněné buňky fotografované za použití Olympus IX70 mikroskopu a JVC barevné videokamery (Victor Company of Japan) při zvětšení 400x. Obrazy byly analyzované pomocí LUCIA (NIS Elements) softwaru.

4.14 Analýza buněčného cyklu – barvení propidium jodidem

Kontrolní a ovlivněné buňky (testovaná střední inhibiční koncentrace c_4) v časových intervalech 3 h – 6 h – 12 h – 24 h se seškrabaly ze dna pasážovacích lahví a přenesly do centrifugačních zkumavek o objemu 50 ml. Centrifugovaly se 10 min při 1000 rpm a 4 °C. Supernatant se slil a peleta dobře rozklepala. Bylo přidáno 10 ml vychlazeného PBS a znovu se centrifigovalo. Supernatant se slil a peleta dobře rozklepala. Za mírného vortexování se pipetou přikapávaly postupně 2 ml ledově vychlazeného 70 % etanolu. Takto zpracované vzorky se nechaly přes noc fixovat v lednici. Další den se zkumavky centrifugovaly 10 min při 2000 rpm a 4 °C. Supernatant se slil a peleta dobře rozklepala. Obsah zkumavek se oplachoval 10 ml vychlazeného PBS a opět centrifigoval. Supernatant se slil a peleta dobře rozklepala. Ke každému vzorku se přidalo 0,5 ml vychlazeného PBS a 0,5 ml fosfát-citrátového pufru (0,2 M Na_2HPO_4 , 0,1 M kyselina citrónová, pH 7,8) a inkubovalo 5 min ve tmě při laboratorní teplotě. Poté se zkumavky dolily 9 ml vychlazeného PBS a centrifugovaly. Supernatant se slil a peleta dobře rozklepala. Přidalo se 0,5 ml Vindelovova roztoku (1,2 g/l TRIS, 0,6 g/l NaCl, 0,01 g/l RNAáza, 0,05 g/l PI) a vzorky se inkubovaly 1 h při 37 °C v CO_2 inkubátoru. Poté se resuspendovaly, pipetovaly do průtokových zkumavek a měřily na průtokovém cytometru (Cell Lab Quanta SC MPL Flow Cytometer, Beckman Coulter, USA) vybaveném 488 nm laserem v FL2 kanálu.

4.15 Detekce proteinů Western blotem

4.15.1 Příprava buněčných lyzátů

Kontrolní a ovlivněné buňky (testovaná koncentrace c_4) v časových intervalech 24 h a 48 h se použily k přípravě buněčných lyzátů. Buňky ve středních pasážovacích lahvích o objemu 20 ml se seškrábaly ze dna a suspenze se přenesly do falkonek o objemu 50 ml. Vzorky se centrifugovaly 10 min při 1300 rpm a 4 °C (centrifuga Jouan MR23i, TrigonPlus). Po stočení se supernatant slil, sediment smíchal s 5 ml PBS a 5 μ l 1 mM orthovanadanu sodného. Vzorky se centrifugovaly a po stočení se supernatant opět slil. K sedimentu se přidalo 0,5 ml ledového lyzovacího pufru (137 mM NaCl, 10 % glycerol, 1 % octyl- β -D-glukopyranosid, 50 mM NaF, 20 mM TRIS base pH 8) a 0,5 μ l ortovanadanu sodného a důkladně se resuspendovalo. Suspenze se následně přenesly do 1 ml ependorfeek a inkubovaly 30 min na ledu. Každých 5 min se vzorky důkladně promíchaly. Po skončení inkubace se vzorky resuspendovaly injekční 2 ml stříkačkou a centrifugovaly 30 min při 14 000 rpm a 4 °C. Odebíralo se 40 μ l supernatantu pro stanovení bílkoviny pomocí bicinchoninové kyseliny (BCA) a zbytek supernatantu se přenesl do kryozkumavek a zamrazil na -80 °C pro další zpracování (elektroforéza).

4.15.2 Elektroforéza a Western blot

Dělení proteinů probíhalo v prostředí 15 % polyakrylamidového gelu. Vzorky naředěné 3xSDS vzorkovým puftrem (0,5 M TRIS-HCl pH 6,8, 20 % glycerol, 1,25 % SDS, 0,004 % bromfenolová modř) se zahřívaly 5 min při 95 °C a vychladily v lednici. Nanášely se v koncentraci bílkoviny 40 μ g/ml spolu s 5 μ l markeru molekulových hmotností (Precision Plus ProteinTM Dual Color Standard, Bio-Rad). Elektroforéza probíhala v puftrovacím roztoku (25 mM TRIS-HCl pH 8,3, 960 mM glycin, 0,1 % SDS) při napětí 200 V a elektrickém proudu 240 mA 50-60 min. Po skončení elektroforézy se gely skládaly s membránami do tzv. „sendvičů“ a přenesly do blotovacího pufru (25 mM TRIS-HCl, 190 mM glycin, 20 % metanol). Přenos proteinů

na PVDF membránu probíhal za podmínek napětí 100 V a elektrickém proudu 250 mA po dobu 60 min. Po ukončení blotování se membrány promyly v destilované vodě a sušily pro následnou imunodetekci.

4.15.3 Imunodetekce

Vysušené membrány se aktivovaly ponořením do metanolu po dobu 1 min, oplachovaly 10 min v TBS (0,025 M TRIS-HCl pH 7,5, 0,15 M NaCl), 1 h blokovaly v blokačním roztoku (5 % roztok sušeného mléka, non-fat dry milk) a přes noc inkubovaly s primárními protilátkami (anti-Cdc25A 1:100, anti-cyklin B1 1:200, anti-cyklin D1 1:100, anti-p21 1:200, anti-PCNA 1:1 000, anti-BAX 1:200, anti-XIAP 1:100, anti-p53 1:100 a β -aktin 1:10 000, který byl použitý jako nanášecí kontrola) při 4 °C. Následovalo 6 x 5 min promývání membrán v roztoku TBS-T (0,01M TRIS-HCl pH 8, 0,15 M NaCl, 0,3 % Tween 20) při 30 °C. Následně 1 h inkubace membrán se sekundární protilátkou (nejčastěji 1:1 000 nebo 1:500) při 30 °C. Poté promývání 6 x 9 min v 0,05 % TBS-T při 30 °C a jednou v TBS po dobu 5 min. Následně se membrány inkubovaly 1 min s ECL roztokem (ECL Western blotting detection kit, Amersham Biosciences). Následovala 1 min expozice membrány na fotografický film, 1 min se film oplachoval ve vývojce a po oplachu vodou dále 1 min v ustalovači. Doba expozice membrány na film byla různá podle intenzity detekovaných proužků. Data byla analyzovaná pomocí Carestream molecular imaging softwaru (Carestream Health, Inc., USA).

4.15.4 Kvantitativní hodnocení Western blotů

Kvantitativní hodnocení intenzit proužků bylo provedeno pomocí analyzátoru GelLogic PRO 2200 a Carestream molecular imaging softwaru (Carestream Health, Inc., USA). Intenzita proužků blotů byla vyjádřena jako procento kontroly (100 %).

4.15.5 Stanovení bílkoviny pomocí bicinchoninové kyseliny (BCA)

Vzorky buněčných lyzátů pro stanovení bílkoviny byly čtyřikrát naředěné destilovanou vodou a v objemu 10 μ l se pipetovaly do jamek mikrotitrační destičky. Přidalo se 200 μ l roztoku BCA a inkubace probíhala 30 min při 37 °C a 5 % CO₂. Intenzita fialového zbarvení jamek mikrotitrační destičky byla přímo úměrná množství bílkoviny a měřila se spektrofotometricky při 560 nm (Peterson 1979). Vlastní činidlo se připravilo smísením komerčně dodávaných roztoků A (NaHCO₃, Na₂CO₃, BCA v 0,1 M NaOH) a B (4 % CuSO₄.6H₂O) v poměru 50:1. Kalibrace se prováděla na standard, bovinní sérový albumin (BSA).

4.16 Stanovení aktivity kaspázy 3

4.16.1 Příprava buněčných lyzátů

Kontrolní a ovlivněné buňky (testovaná koncentrace c_4) v časových intervalech 6 h – 12 h – 24 h – 48 h – 72 h se seškrabaly ze dna středních pasážovacích lahví do 50 ml falkonek a stočily v předchlazené centrifuze (Jouan MR23i, TrigonPlus) 5 min při 1500 rpm a 4° C. Supernatant se slil, ke každému vzorku se přidalo 20 ml vychlazeného PBS bez iontů a vortexovalo. Falkonky se opět centrifugovaly. Supernatant se slil, k peletám se přidalo 400 μ l lyzačního pufru pH 7,4 na vzorek (50 mM HEPES, 5 mM CHAPS, 5 mM DTT) a suspenze se přenesla do 1,5 ml zkumavek. Zkumavky se inkubovaly na ledu 20 min. Po inkubaci se zkumavky centrifugovaly 10 min při 14 000 rpm a 4°C. Po stočení se odebraly supernatanty a ihned se stanovovala aktivita kaspázy 3 nebo se přenesly do kryozkumavek a uložily při -80 °C k pozdějšímu měření aktivity kaspázy 3.

4.16.2 Kinetické měření aktivity kaspázy 3

Aktivita kaspázy 3 se měřila v 96ti-jamkových mikrotitračních destičkách za použití kinetické fluorimetrické assay, která je založená na hydrolýze peptidového substrátu acetyl Asp-Glu-Val-Asp 7-amido-4-methylkumarinu (Ac-DEVD-AMC) kaspázou 3. Reakce vedla k uvolnění fluorescenčního 7-amino-4-methylkumarinu (AMC) a tato fluorescence byla detekovaná. N-acetyl-L- α -aspartyl-L- α -glutamyl-N-(2-karboxyl-1-formylethyl)-L-valinamid, Ac-DEVD-CHO, je specifický inhibitor kaspázy 3, a byl použitý k potvrzení specifity štěpení kaspázy 3. Fluorescence byla měřená při excitační λ_{ex} 360 nm a λ_{em} 465 nm (spektrofotometr SpektraFluor Plus, Tecan, Salzburg, Austria). Koncentrace uvolněného AMC se počítala ze standardní kalibrační křivky AMC. Aktivita kaspázy 3 se vyjádřila jako nmol AMC/min/mg proteinu. Koncentrace proteinů byla určena spektrofotometricky pomocí bicinchoninové kyseliny (BCA) a bovinního sérového albuminu (BSA) jako standardu.

4.17 Fluorescenční mikroskopie

4.17.1 Imunofluorescenční detekce kaspázy 3

Buňky byly nasazené do cytospinových komůrek v hustotě 3×10^4 buněk na 1 ml média a kultivované po dobu 24 h v inkubátoru při 37 °C a 5 % CO₂. Poté byly buňky ovlivněné cytostatiky a kultivované po dané časové intervaly. Následně se komůrky centrifugovaly 5 min při 500 rpm a 4°C. Po stočení se slilo kultivační médium a buňky se fixovaly čerstvým roztokem 2% paraformaldehydu po dobu 20 min. Následně se buňky třikrát oplachovaly roztokem PBS bez iontů, permeabilizovaly roztokem TRITON-X 3-5 min a následně opět proplachovaly třikrát roztokem PBS bez iontů. Následovala blokace buněk v blokačním roztoku 1 h (0,5 g sušeného mléka v 10 ml PBS-T; T = Tween 20) při laboratorní teplotě. Poté se blokační roztok slil a ihned se aplikovala primární protilátka proti kaspáze 3 v ředění 1:100 v mléku (5 % v PBS-T). Inkubace probíhala 1 h při 4°C. Poté se cytospinové komůrky opět třikrát oplachovaly roztokem PBS a aplikovala se sekundární protilátka anti-myší Alexa Fluor[®] 488 ředěná 1:250 v 5 % mléku v PBS-T a fluorescenční barvivo DAPI v koncentraci 10 µg/ml pro barvení jader. Inkubace probíhala 45 min při laboratorní teplotě. Poté se opět třikrát oplachovaly PBS a jednou v destilované vodě. Cytospinové komůrky se rozebraly a sklíčka lepila k sobě pomocí montovacího média SlowFade[®]. Takto připravené preparáty se prohlížely ve fluorescenčním mikroskopu Nikon ECLIPSE E 400 (Nikon Corporation, Kanagawa, Japan) přes vhodnou kombinaci filtrů. Fotografie byly pořízené a analyzované pomocí programu Lucia DI Image Analysis System (Laboratory Imaging Ltd., Česká republika).

4.18 Statistické vyhodnocení

Prezentované výsledky jsou průměrem tří nezávislých experimentů. Statistická analýza dat byla provedená pomocí statistického programu GraphPad Prism 4.0 (GraphPad software, Inc., San Diego, USA). Výsledky byly srovnávané s kontrolou, kdy rozdíly byly považované za signifikantní na hladině významnosti $p < 0,05$. Pro komparativní analýzu klinických vzorků byl použitý jednosměrný Anova test a Dunnettův post test pro mnohočetné porovnání a také McNemarův test symetrie v kontingenční tabulce. V žádném případě nebyla zamítnuta nulová hypotéza. To, že nebyla zamítnuta hypotéza shody, však nelze zobecnit tak, že se hodnoty před a po rozmrazení, respektive solidní nádor vs ascites neliší, ale pouze tak, že jsme rozdíl nenalezli (kvůli relativně malému souboru).

5. VÝSLEDKY

Klinické vzorky

5.1 Výsledky testování klinických vzorků

Soubor klinických vzorků zahrnoval solidní nádory ovaria a ascitické tekutiny pacientek s ovariálním karcinomem. Do skupiny byly zahrnuty i vzorky pacientek s recidivou ovariálního karcinomu (opakovaný růst nádoru nebo tvorba ascitu). Vzorky se testovaly v průběhu let 2006 - 2011. Celkový počet vyhodnocených vzorků byl 144. Souhrnná data v tabulce ukazují, že ne každý vzorek bylo možné testovat nebo vyhodnotit a to z důvodu malého množství vzorku tkáně nebo ascitu, případně nízké viability izolovaných buněk nebo nulové reakce na MTT.

Tab. 5-1 Přehled testování souboru klinických vzorků

Rok	Přijaté vzorky	Testované vzorky	Vyhodnocené vzorky
2006	28	23	22
2007	27	23	18
2008	23	17	17
2009	64	41	36
2010	48	44	33
2011	25	22	18

5.1.1 Výsledky testování solidních nádorů

Celkem u 83 vzorků solidních nádorů ovaria bylo možné hodnotit jejich reaktivitu v podmínkách *in vitro*. Data ukazují nejvyšší citlivost klinických vzorků na topotekan (Topo) 80,6 % a cisplatinu (CisPt) 60,2 %. Naopak nevyšší rezistence byla zjištěná na gemcitabin (Gmc) 81,4 % a etoposid (Etop) 77,9 %. Vysoká byla také rezistence na karboplatinu (CBDCA) 54,9 % vzorků. A paklitaxel (PTX) vykazoval nejčastěji jen hraniční vnímavost a to v 44,6 % vzorků.

Tab. 5-1-1 Reaktivita vzorků solidních nádorů v podmínkách *in vitro*

Cytostatikum	Vzorky solidních nádorů (n = 83)					
	vnímavost		hraniční vnímavost		rezistence	
	n	% reaktivity	n	% reaktivity	n	% reaktivity
CisPt	50	60,2	20	24,1	13	15,7
PTX	17	20,5	37	44,6	29	34,9
CBDCA	19	23,2	18	21,9	45	54,9
Gmc	7	10,0	6	8,6	57	81,4
Topo	58	80,6	5	6,9	9	12,5
Etop	7	10,3	8	11,8	53	77,9

Buňky jsou hodnocené jako vnímavé, pokud cytostatikum ve vysoké koncentraci působí pokles počtu živých buněk pod 25 % ve srovnání s kontrolou, hraničně vnímavé, pokud cytostatikum zabije více než 25 % ale méně než 50 % buněk a rezistentní, pokud přežívají nejvyšší testovanou koncentrací cytostatika.

5.1.2 Výsledky testování ascitů

Celkem u 61 vzorků ascitů pacientek s ovariálním karcinomem bylo možné hodnotit reaktivitu v podmínkách *in vitro*. Nejvyšší vnímavost vzorků ascitů byla detekovaná na topotekan (Topo) 84,5 % a cisplatinu (CisPt) 82,0 % vzorků. Naopak nejvyšší rezistence byla zjištěná na etoposid (Etop) 76,8 %, gemcitabin (Gmc) 61,7 % a relativně vysoká byla rezistence také u karboplatiny (CBDCA) 44,3 %. Stejně jako u vzorků solidních nádorů, paklitaxel (PTX) vykazoval nejčastěji jen hraniční vnímavost a to u 50,8 % vzorků.

Tab. 5-1-2 Reaktivita vzorků ascitů v podmínkách *in vitro*

Cytostatikum	Vzorky ascitů (n = 61)					
	vnímavost		hraniční vnímavost		rezistence	
	n	% reaktivity	n	% reaktivity	n	% reaktivity
CisPt	50	82,0	7	11,5	4	6,5
PTX	7	11,5	31	50,8	23	37,7
CBDCA	7	11,4	27	44,3	27	44,3
Gmc	15	25,0	8	13,3	37	61,7
Topo	49	84,5	3	5,2	6	10,3
Etop	8	14,3	5	8,9	43	76,8

Buňky jsou hodnocené jako vnímavé, pokud cytostatikum ve vysoké koncentraci působí pokles počtu živých buněk pod 25 % ve srovnání s kontrolou, hraničně vnímavé, pokud cytostatikum zabíjí více než 25 % ale méně než 50 % buněk a rezistentní, pokud přežívají nejvyšší testovanou koncentraci cytostatika.

5.1.3 Souhrnné výsledky *in vitro* testování klinických vzorků

Na základě výsledků MTT testu bylo celkem plně vyhodnoceno 83 vzorků solidních nádorů a 61 ascitů, tedy soubor 144 klinických vzorků. V tomto souboru byla jako nejefektivnější cytostatika vyhodnocena topotekan 82,3 % a cisplatina 69,4 %. Rezistence byla nejčastěji zjištěná na etoposid 77,4 % a gemcitabin 72,3 %. Účinek cisplatiny a karboplatiny nebyl identický. 69,4 % vzorků bylo vnímavých na cisplatinu, ale jen 18,2 % vzorků na karboplatinu. Na karboplatinu byla nejčastěji zjištěná rezistence a to v 50,3 % vzorků. Na paklitaxel byla nejčastěji zjištěná jen hraniční vnímavost a to v 47,2 %. Takto získané výsledky testování chemosenzitivity v podmínkách *in vitro* nerozhodují o primární léčbě, ale uplatňují se až v případech recidivy onemocnění a nasazení individuální vyšší linie chemoterapie. Primární a sekundární linie chemoterapie mají daná schémata. Na výsledky našeho testování se bere zřetel až při recidivách onemocnění.

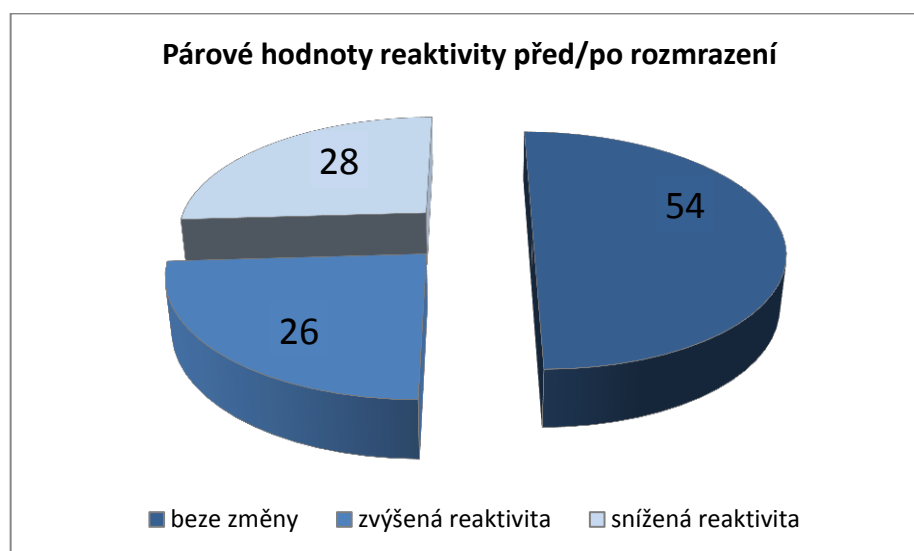
Tab. 5-1-3 Celková reaktivita souboru klinických vzorků v podmínkách *in vitro*

Celková reaktivita klinických vzorků (%), n = 144			
Cytostatikum	vnímavost	hraniční vnímavost	rezistence
CisPt	69,4	18,8	11,8
PTX	16,7	47,2	36,1
CBDCA	18,2	31,5	50,3
Gmc	16,9	10,8	72,3
Topo	82,3	6,2	11,5
Etop	12,1	10,5	77,4

Buňky jsou hodnocené jako vnímavé, pokud cytostatikum ve vysoké koncentraci působí pokles počtu živých buněk pod 25 % ve srovnání s kontrolou, hraničně vnímavé, pokud cytostatikum zabije více než 25 % ale méně než 50 % buněk a rezistentní, pokud přežívají nejvyšší testovanou koncentraci cytostatika.

5.2 Porovnání reaktivity čerstvě izolovaných a rozmrazených vzorků solidních nádorů a ascitů

Z 39 rozmrazených vzorků jich bylo možné otestovat 27, z toho 16 solidních nádorů a 11 ascitů. Získali jsme 108 párových hodnot, kdy reaktivita zůstala stejná u 54 (50 %) párových hodnot, reaktivita byla po rozmrazení vyšší u 26 (24,1 %) párových hodnot a naopak nižší u 28 (25,9 %) párových hodnot (Obr. 5-2A, Tab. 5-2B). Statisticky významný rozdíl v reaktivitě solidních nádorů a ascitů nebyl pozorovaný. Výsledky však mohou být ovlivněné malým počtem dat v souboru. Po rozmrazení byla pozorovaná vyšší viabilita buněk izolovaných z ascitů oproti buňkám ze solidních nádorů.



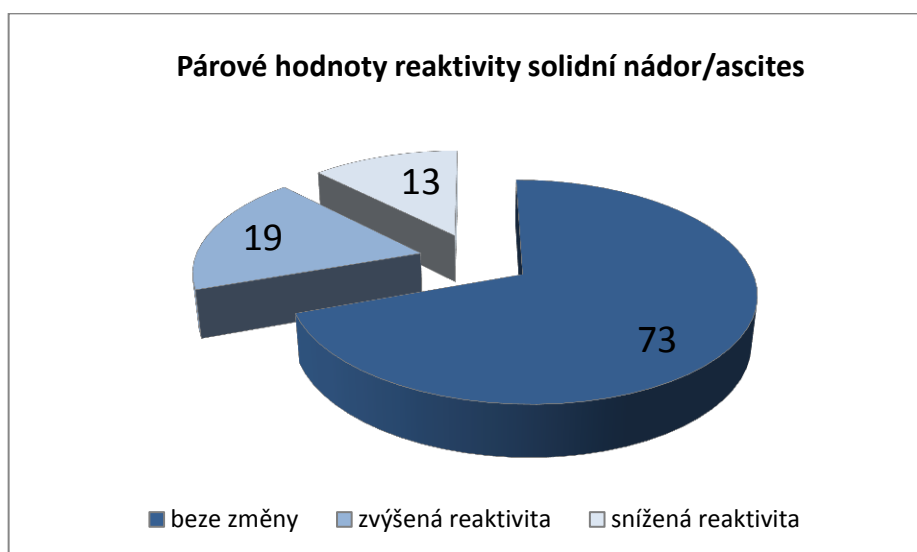
Obr. 5-2A Porovnání párové reaktivity čerstvě izolovaných a rozmrazených buněk klinických vzorků ovariálních karcinomů. Čísla vyjadřují počty párových hodnot, jejichž reaktivita se před a po rozmrazení nelišila, byla zvýšená nebo naopak snižená.

Tab. 5-2B Výsledky testování chemosenzitivity *in vitro* - čerstvě izolované a rozmrazené buňky. Počet případů (vyjádření v procentech).

Reaktivita	CisPt	PTX	CBDCA	Gmc	Topo	Etop
nezměněná	14 (51,9%)	10 (40,0 %)	10 (45,5 %)	6 (50,0 %)	5 (45,5 %)	9 (81,8 %)
zvýšená	6 (22,2 %)	7 (28,0 %)	5 (22,7 %)	5 (41,7 %)	4 (36,4 %)	1 (9,1 %)
snížená	7 (25,9 %)	8 (32,0 %)	7 (31,8 %)	1 (8,3 %)	2 (18,1 %)	1 (9,1 %)

5.3 Porovnání reaktivity solidního nádoru a ascitu těžce pacientky

V souboru pacientek se podařilo vybrat 19 párových vzorků, solidních nádorů a ascitů těžce pacientky a bylo získáno 105 párových hodnot, jejichž reaktivita se porovnávala. Reaktivita solidního nádoru a ascitu se neměnila u 73 (69,5 %) párových hodnot, reaktivita byla u ascitu v porovnání se solidním nádorem vyšší u 19 (18,1 %) párových hodnot a reaktivita byla u ascitu v porovnání se solidním nádorem nižší u 13 (12,4 %) párových hodnot (Obr. 5-3A, Tab. 5-3B).



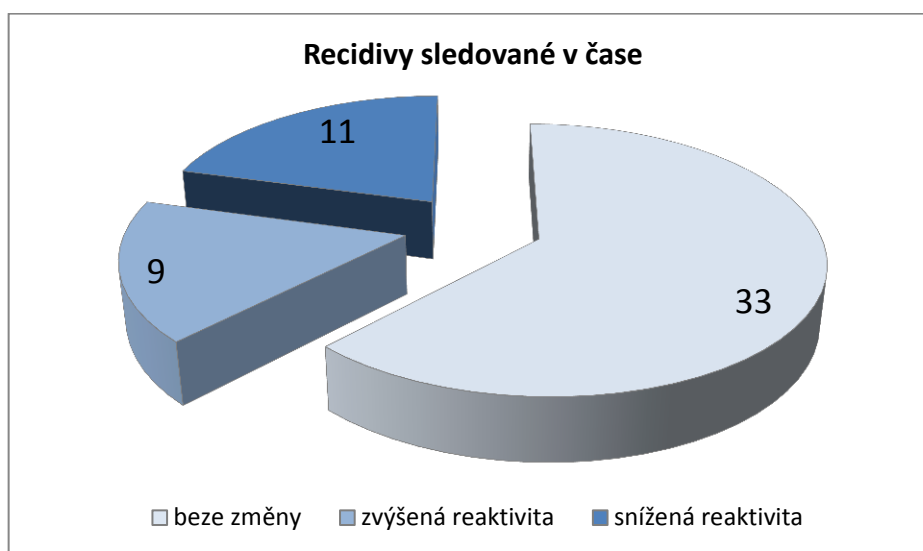
Obr. 5-3A Porovnání párové reaktivity solidních nádorů a ascitů těžce pacientky v souboru klinických vzorků ovariálních karcinomů. Čísla vyjadřují počty párových hodnot, jejichž reaktivita se u párových vzorků solidní nádor - ascites nelišila, byla zvýšená nebo naopak snižená.

Tab. 5-3B Výsledky testování chemosenzitivity *in vitro* – solidní versus ascites těžce pacientky. Počet případů (vyjádření v procentech).

Reaktivita	CisPt	PTX	CBDCA	Gmc	Topo	Etop
nezměněná	15 (79,0 %)	11 (57,9 %)	15 (83,3 %)	9 (56,3 %)	13 (76,5 %)	9 (60,0 %)
zvýšená	2 (10,5 %)	4 (21,05 %)	1 (5,6 %)	6 (37,5 %)	1 (5,9 %)	5 (33,3 %)
snížená	2 (10,5 %)	4 (21,05 %)	2 (11,1 %)	1 (6,2 %)	3 (17,6 %)	1 (6,7 %)

5.4 Porovnání reaktivity vzorku těže pacientky v čase

Ze souboru pacientek s ovariálním karcinomem se podařilo vybrat celkem 10 pacientek, u kterých jsme měli k dispozici vzorky po opakovaných odběrech v důsledku recidivy onemocnění. Z toho byly tři solidní nádory a sedm ascitů, s minimálně 2 a maximálně 5 opakovanými odběry vzorků. Bylo získáno 53 párových hodnot reaktivity. U dvou vzorků byla reaktivita v čase nahodilá, tyto nebyly do souboru zahrnuty. Ostatní vykazovaly shodnou reaktivitu u 33 (62,2 %) párových hodnot nebo postupně v čase zvýšenou 9 (17 %) nebo naopak sníženou 11 (20,8 %) reaktivitu (Obr. 5-4A, Tab. 5-4B).



Obr. 5-4A Výsledky testování chemosenzitivity *in vitro* – opakovaně odebrané vzorky pacientek s recidivou ovariálního karcinomu sledované v čase. Čísla vyjadřují počty párových hodnot, jejichž reaktivita se v čase nelišila, byla zvýšená nebo naopak snížená.

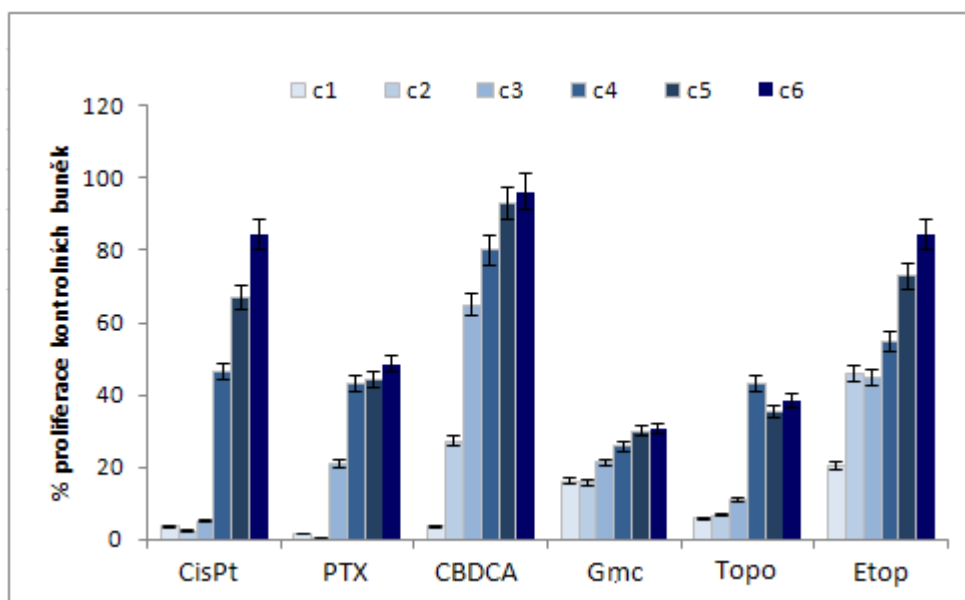
Tab. 5-4B Výsledky testování chemosenzitivity *in vitro* – vzorky těže pacientky odebírané postupně v čase, opakované odběry v důsledku recidivy ovariálního karcinomu. Počet případů (vyjádření v procentech).

Reaktivita	CisPt	PTX	CBDCA	Gmc	Topo	Etop
nezměněná	7 (77,8 %)	2 (25,0 %)	6 (66,7 %)	6 (66,7 %)	5 (55,6 %)	7 (77,8 %)
zvýšená	0 (0 %)	3 (37,5 %)	2 (22,2 %)	3 (33,3 %)	0 (0 %)	1 (11,1 %)
snížená	2 (22,2 %)	3 (37,5 %)	1 (11,1 %)	0 (0 %)	4 (44,4 %)	1 (11,1 %)

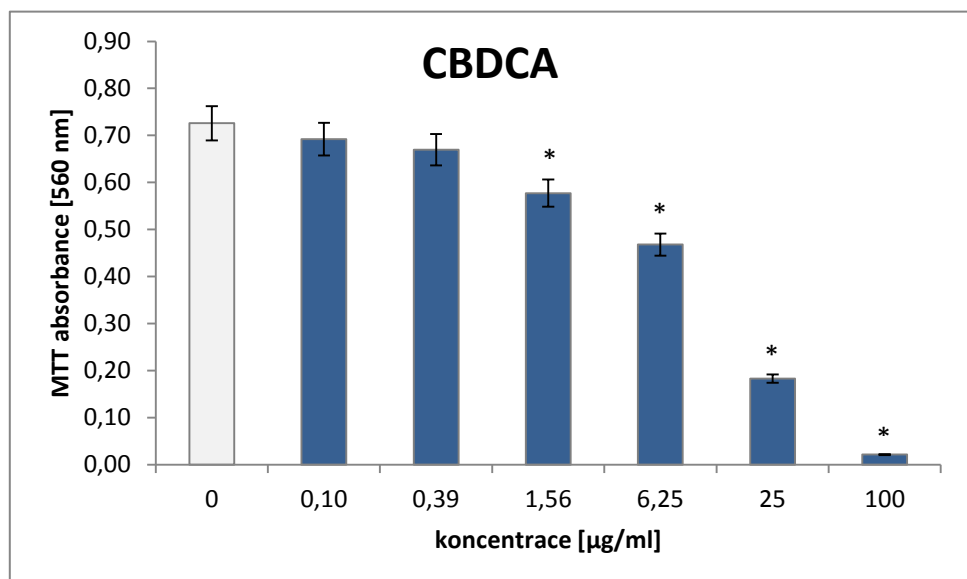
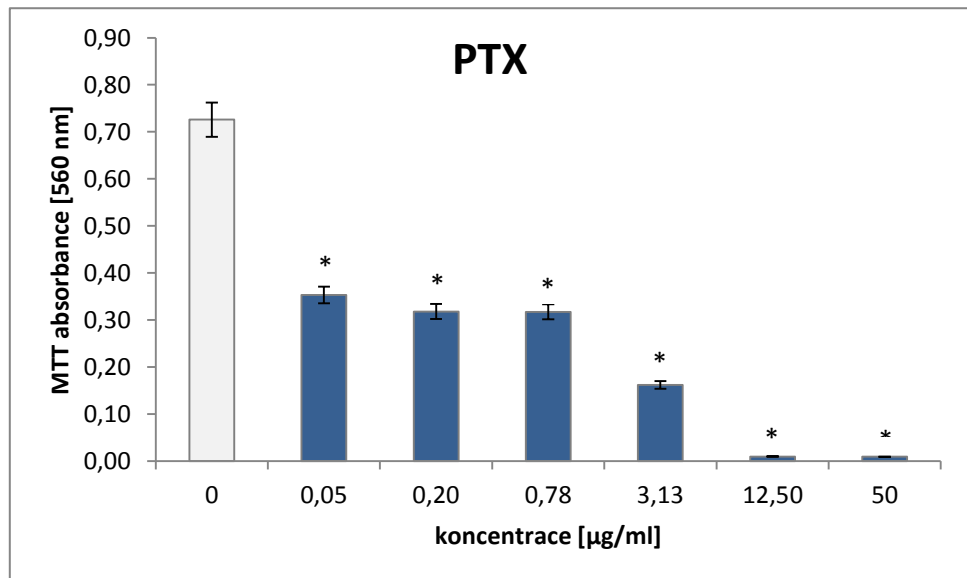
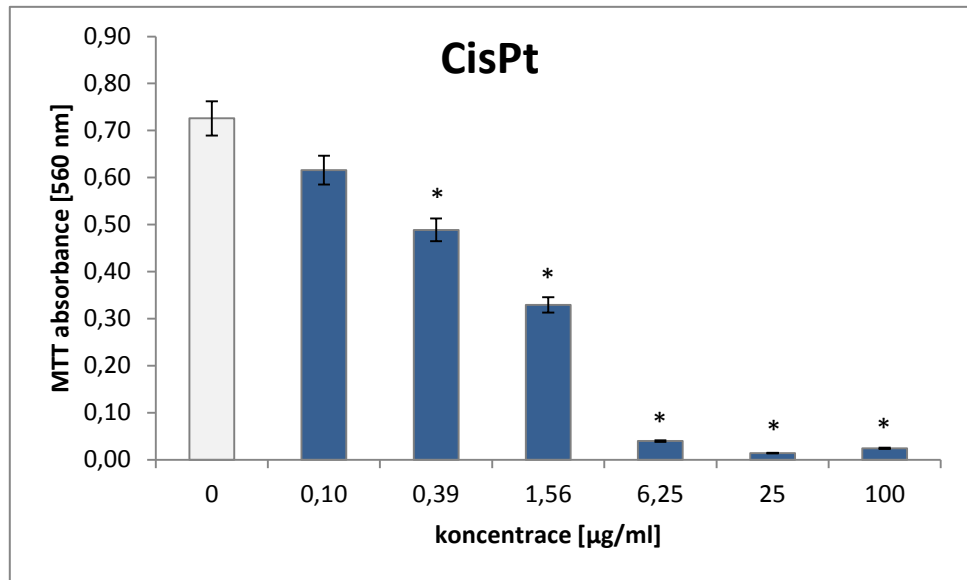
Buněčná linie A2780

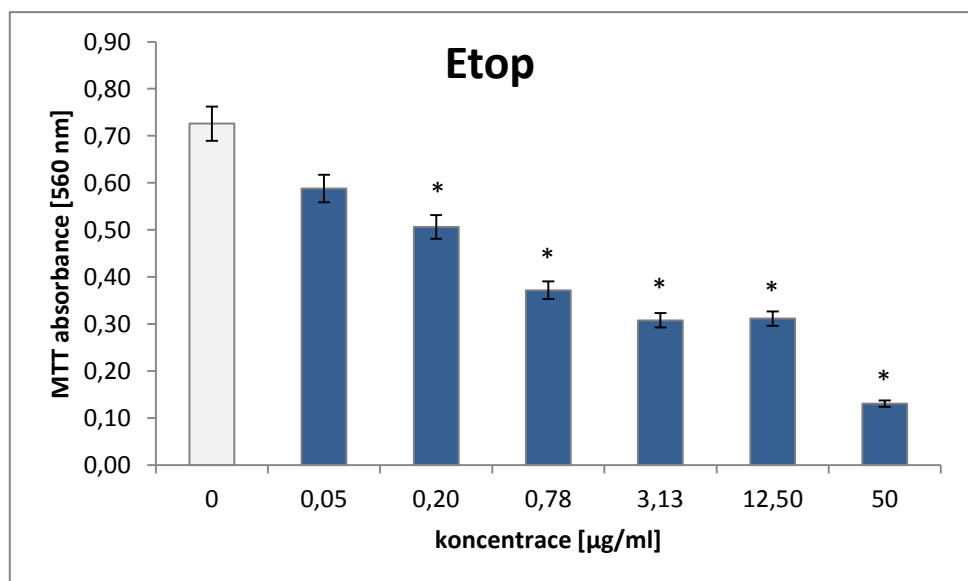
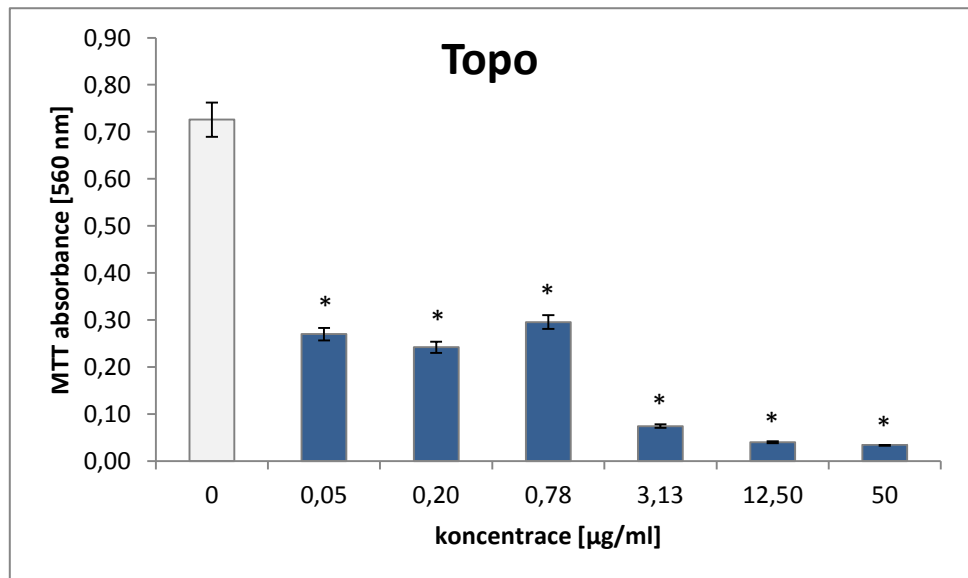
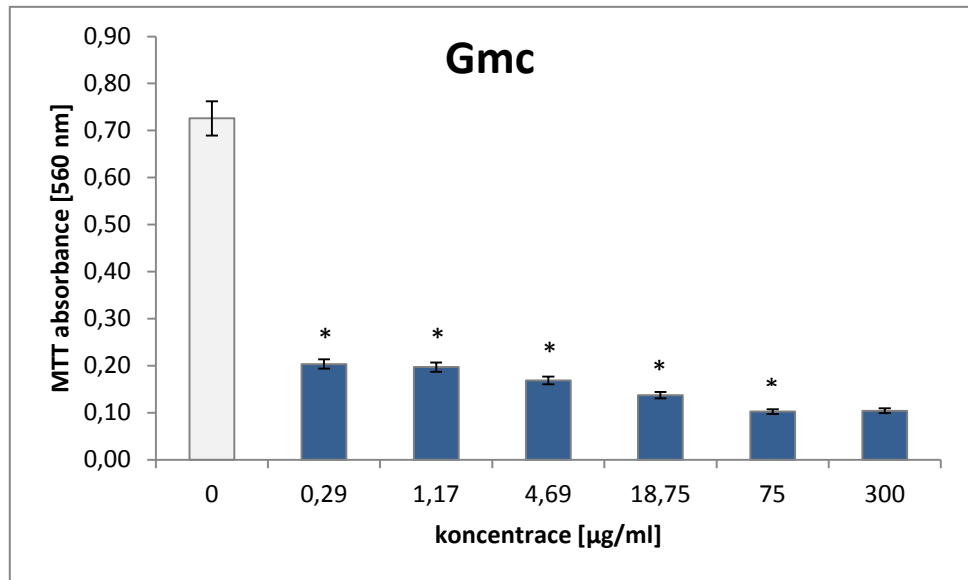
5.5 Test metabolické aktivity MTT

Účinek testovaných cytostatik na proliferaci buněčné linie A2780 byl po 72 h inkubace s cytostatiky vyhodnocený pomocí testu metabolické aktivity MTT (Obr. 5-5A, B). Nejvyšší inhibici proliferace vykazovaly buňky po ovlivnění gemcitabinem, paklitaxelem a topotekanem. Buněčná linie byla méně vnímavá k cisplatině a etoposidu. Nejnižší byla vnímavost buněk A2780 ke karboplatině. Střední inhibiční koncentrace c_4 pro každé z cytostatik byla vybrána pro další testování právě na základě opakovaně shodných výsledků MTT testů. Bylo provedeno devět nezávislých experimentů v různých pasážích linie A2780.



Obr. 5-5A Antiproliferační efekt testovaných cytostatik na buňky A2780 detekovaný pomocí MTT testu, souhrnný graf. CisPt – cisplatina, PTX – paklitaxel, CBDCA – karboplatina, Gmc – gemcitabin, Topo – topotekan, Etop – etoposid. Výsledky reprezentují průměr z devíti nezávislých experimentů.





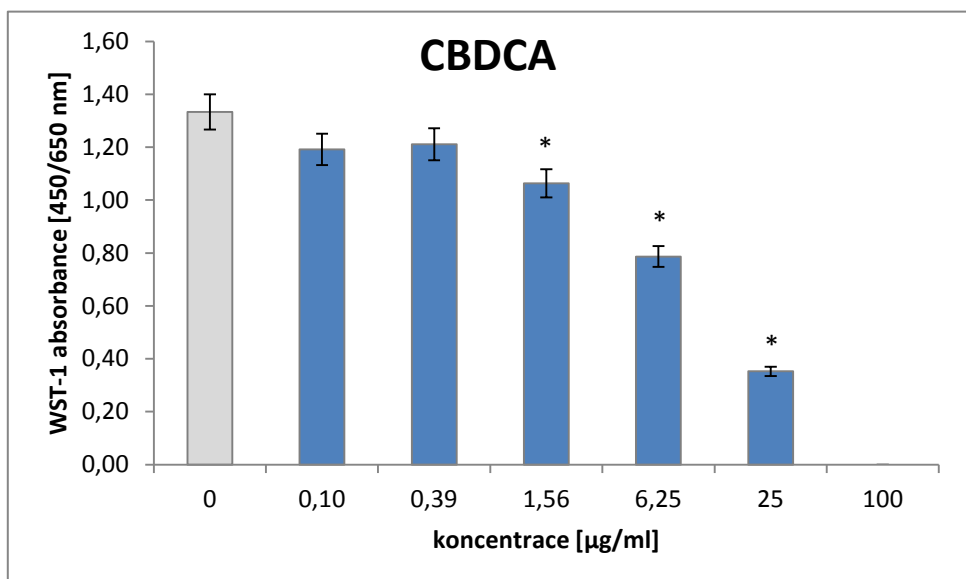
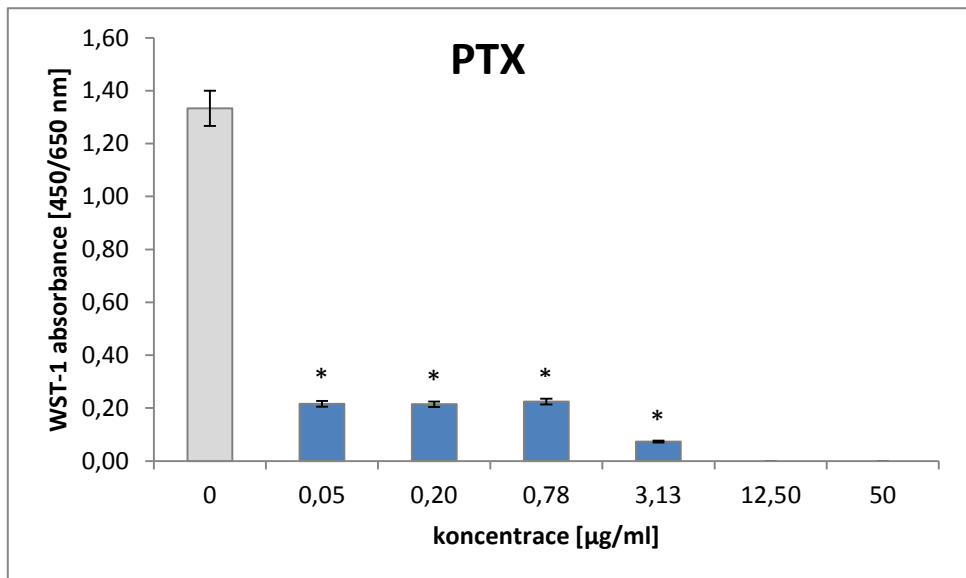
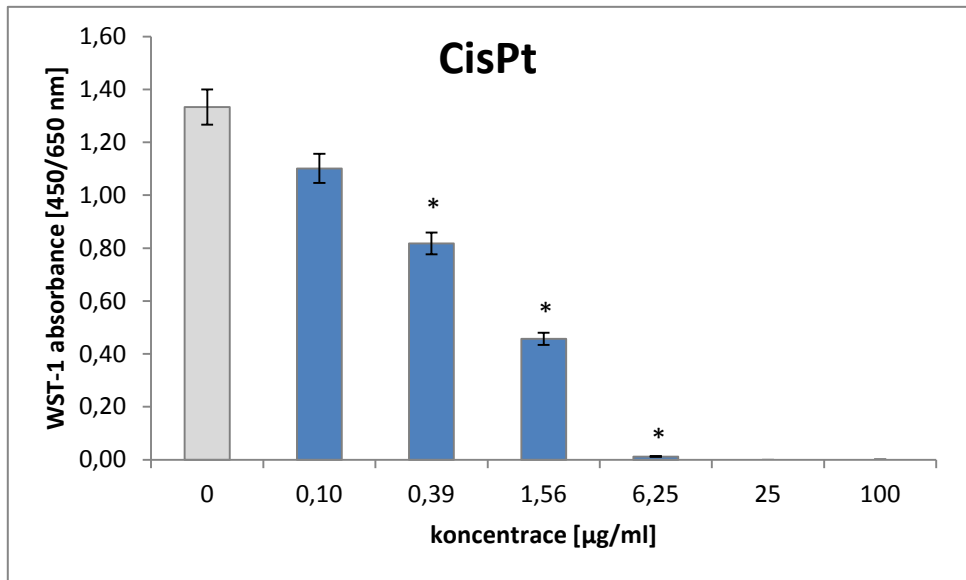
Obr. 5-5B Antiproliferační efekt testovaných cytostatik na buňky linie A2780 detekovaný pomocí MTT testu. * = statisticky významný rozdíl proti kontrole, $p < 0,05$.

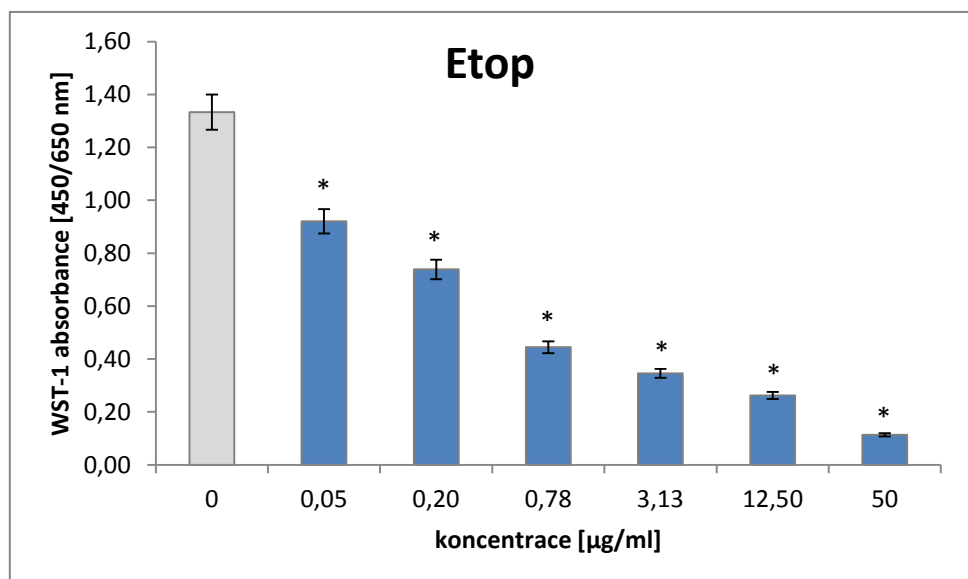
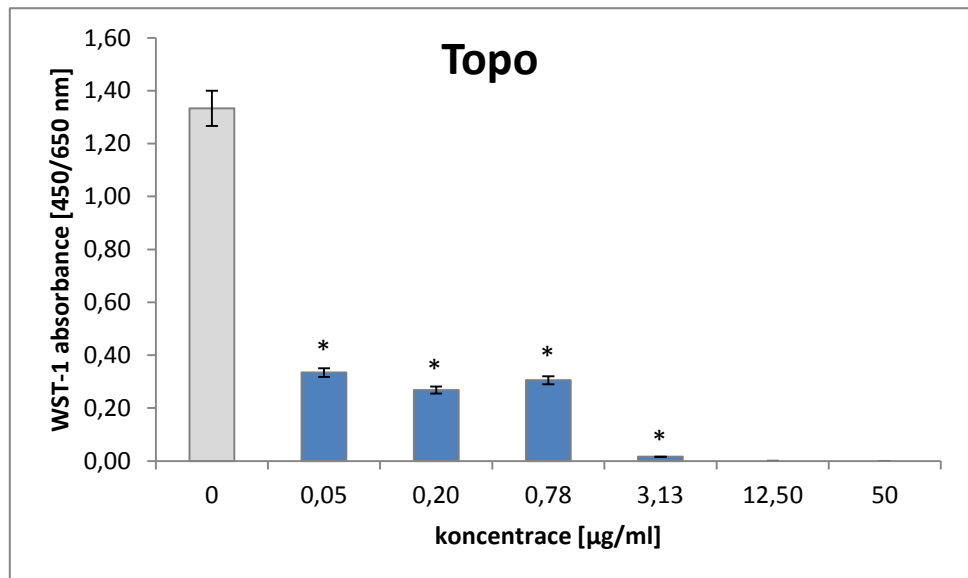
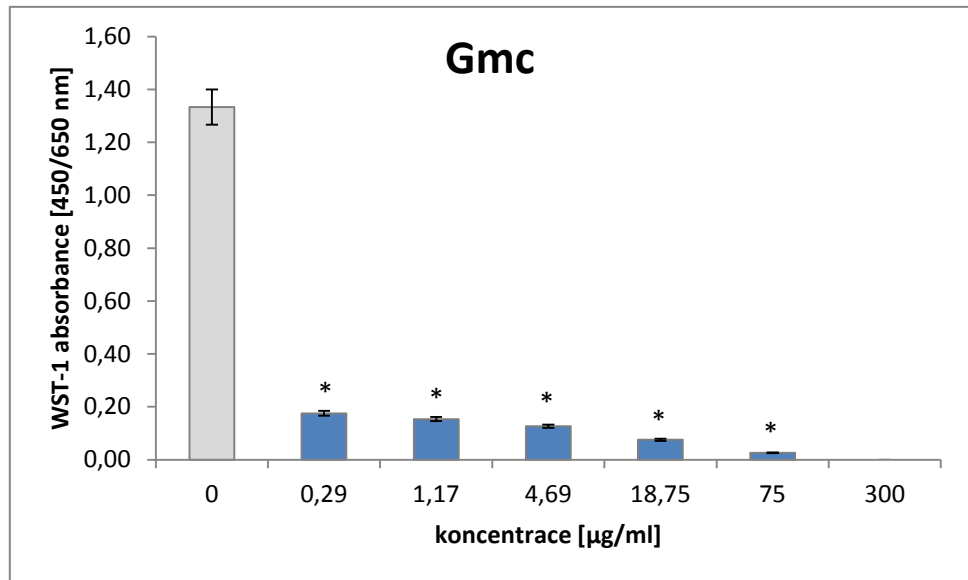
5.6 WST-1 test metabolické aktivity a celkový obsah proteinů

Účinek testovaných cytostatik na proliferaci buněčné linie A2780 byl vyhodnocený také pomocí WST-1 testu metabolické aktivity a také měřením celkového obsahu proteinů barvením Coomassie Brilliant Blue po 72 h inkubaci s cytostatiky (Obr. 5-6A, B). Nejvyšší inhibici proliferace vykazovaly buňky ovlivněné gemcitabinem, paklitaxelem a topotekanem. Buněčná linie byla méně vnímavá k cisplatině a etoposidu. Nejnižší byla vnímavost ke karboplatině.

Celkový obsah proteinů stanovený metodou barvení Coomassie Brilliant Blue byl nejvyšší v buňkách ovlivněných etoposidem a karboplatinou. Naopak nejnižší po ovlivnění gemcitabinem a topotekanem.

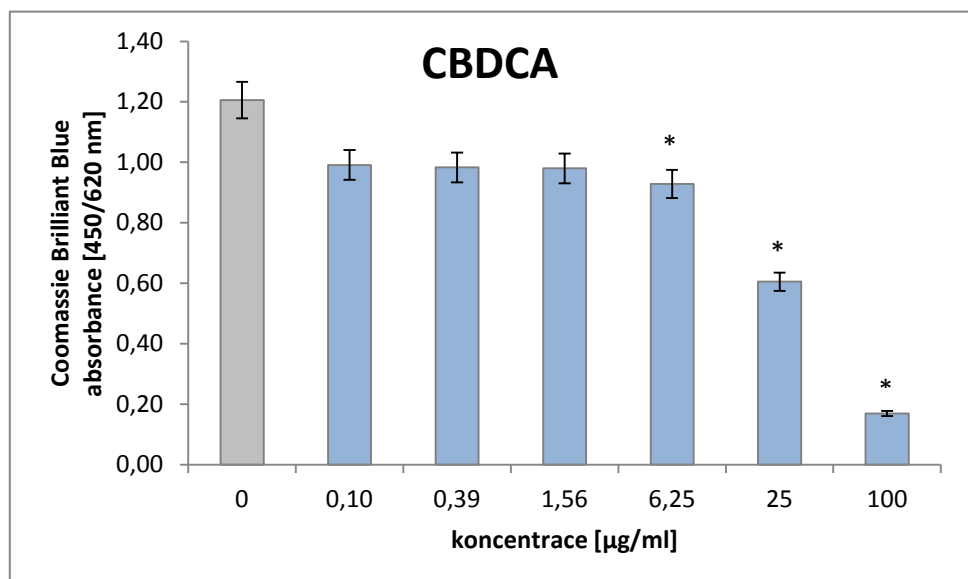
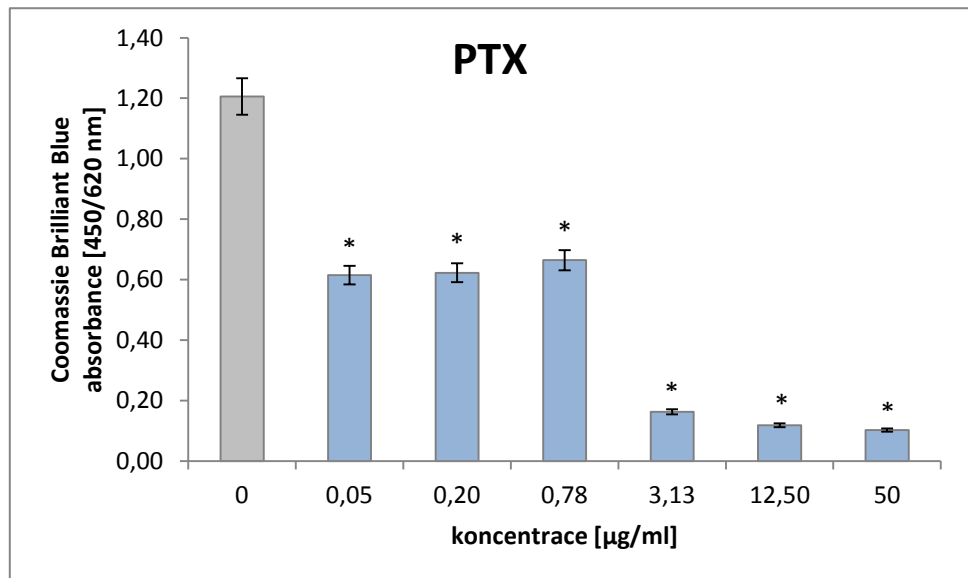
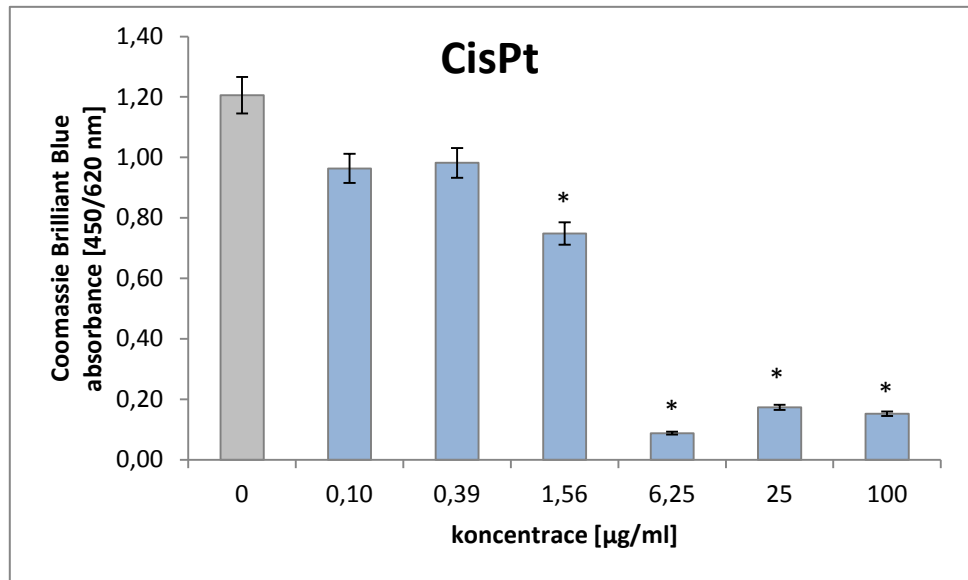
Tyto výsledky jsou průměrem tří nezávislých experimentů. Výsledky obou testů, MTT a WST-1, poskytly shodné výsledky citlivosti buněčné linie A2780 na testovaná cytostatika.

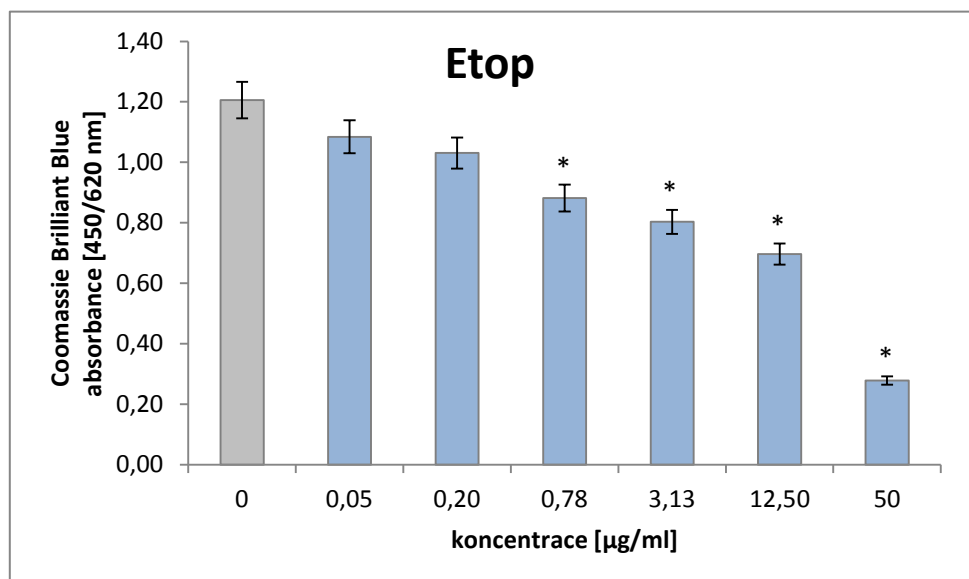
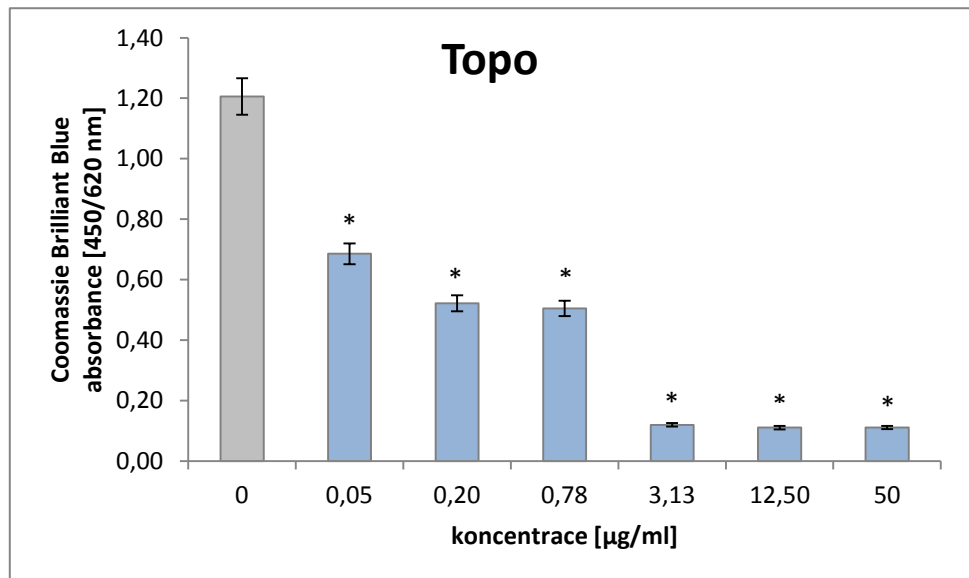
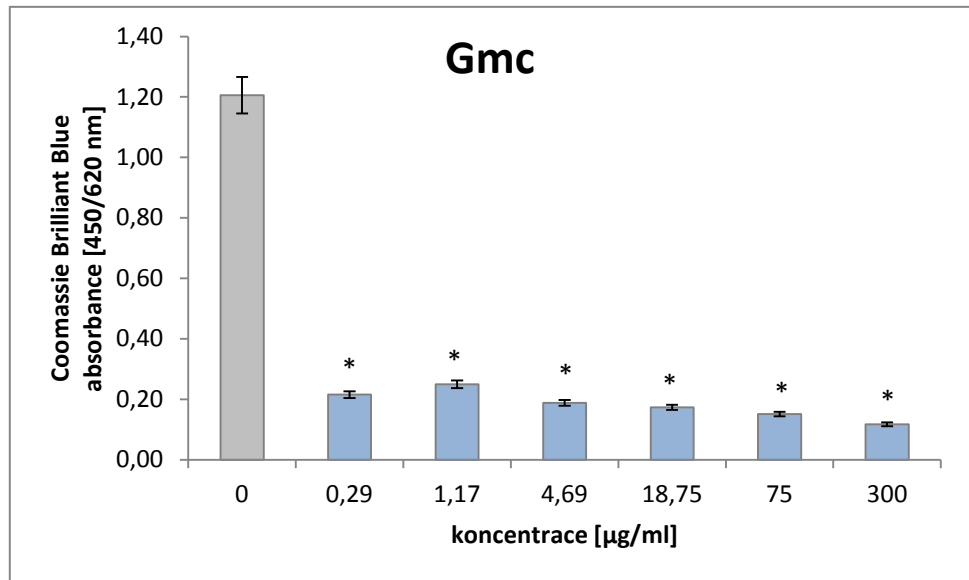




Obr. 5-6A Výsledky WST-1 testu metabolické aktivity u buněčné linie A2780. * = statisticky významný rozdíl proti kontrole, $p < 0,05$.

Nejnižší metabolická aktivita buněk byla zaznamenaná po ovlivnění paklitaxelem, gemcitabinem a topotekanem.



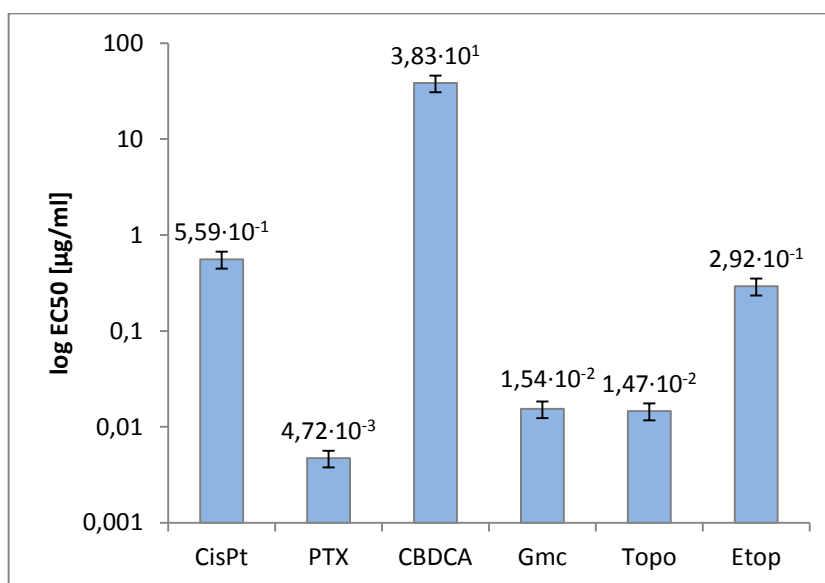


Obr. 5-6B Výsledky měření celkového obsahu proteinů metodou barvení Coomassie Brilliant Blue u buněčné linie A2780. * = statisticky významný rozdíl proti kontrole, $p < 0,05$.

Nejvyšší obsah proteinů byl detekovaný v buňkách ovlivněných etoposidem a karboplatinou. Naopak nejnižší po ovlivnění gemcitabinem a topotekanem.

5.7 Dynamické měření buněčné proliferace pomocí systému xCELLigence

Antiproliferační efekt testovaných cytostatik na linii A2780 byl hodnocený také pomocí xCELLigence systému a hodnoty EC50 byly určeny pomocí RTCA softwaru po 72 h inkubačním intervalu (Obr. 5-7A). Nejvyšší hodnoty EC50 byly získané po ovlivnění karboplatinou. Vysoká hodnota EC50 byla zaznamenána také po ovlivnění cisplatinou a etoposidem. Naopak nejnižší hodnota byla získána po ovlivnění paklitaxelem. Výsledky reprezentují hodnoty ze tří nezávislých experimentů.



Obr. 5-7A Grafické znázornění závislosti mezi hodnotami EC50 získanými pomocí xCELLigence, RTCA software. CisPt – cisplatinu, PTX – paklitaxel, CBDCA – karboplatinu, Gmc – gemcitabin, Topo – topotekan, Etop – etoposid.

Z důvodu velkého rozdílu mezi hodnotou EC50 pro karboplatinu a ostatní cytostatika byl použitý logaritmus EC50.

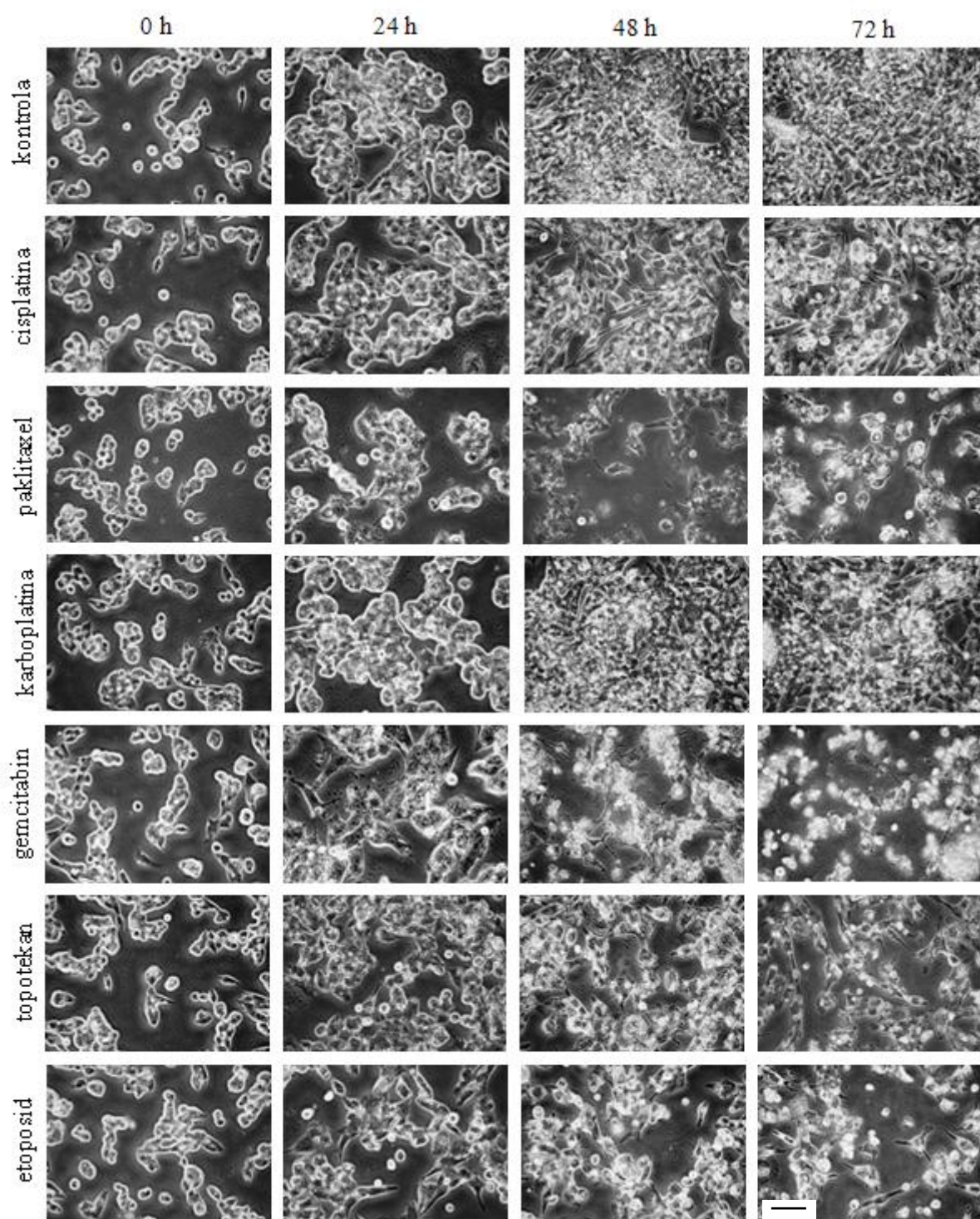
Porovnání hodnot EC50 získaných pomocí xCELLigence a MTT testu (Tab. 5-7B) poskytuje informaci o tom, že citlivost systému xCELLigence je vyšší oproti MTT testu, protože poskytuje nižší číselné hodnoty EC50. Důležité je, že se hodnoty EC50 získané pomocí MTT testu a xCELLigence nacházejí ve shodných intervalech slovního hodnocení reaktivity vzorků, tj. vnímavý, hraničně vnímavý.

Tab. 5-7B Srovnání hodnot EC50 získaných pomocí MTT testu a RTCA softwaru (xCELLigence). CisPt – cisplatina, PTX – paklitaxel, CBDCA – karboplatina, Gmc – gemcitabin, Topo – topotekan, Etop – etoposid. A2780 jsou vysoce citlivé ke gemcitabinu a topotekanu, EC50 určená MTT testem leží pod hodnotou minimální testované koncentrace cytostatik. NA – not applicable, z intervalové hodnoty se nedá určit hodnota směrodatné odchylky.

Cytostatikum	Průměrná hodnota EC50 (µg/ml) ± STD	
	xCELLigence	MTT
CisPt	$5,59 \cdot 10^{-1} \pm 1,87 \cdot 10^{-2}$	$1,36 \cdot 10^0 \pm 7,55 \cdot 10^{-1}$
PTX	$4,72 \cdot 10^{-3} \pm 5,65 \cdot 10^{-4}$	$< 7,81 \cdot 10^{-1} \pm 4,67 \cdot 10^{-1}$
CBDCA	$3,83 \cdot 10^1 \pm 6,06 \cdot 10^0$	$1,37 \cdot 10^1 \pm 5,16 \cdot 10^0$
Gmc	$1,54 \cdot 10^{-2} \pm 6,17 \cdot 10^{-3}$	$< 4,69 \cdot 10^0 \pm \text{NA}$
Topo	$1,47 \cdot 10^{-2} \pm 2,60 \cdot 10^{-3}$	$< 7,81 \cdot 10^{-1} \pm \text{NA}$
Etop	$2,92 \cdot 10^{-1} \pm 3,25 \cdot 10^{-2}$	$1,88 \cdot 10^0 \pm 4,18 \cdot 10^{-1}$

5.8 Morfologická studie

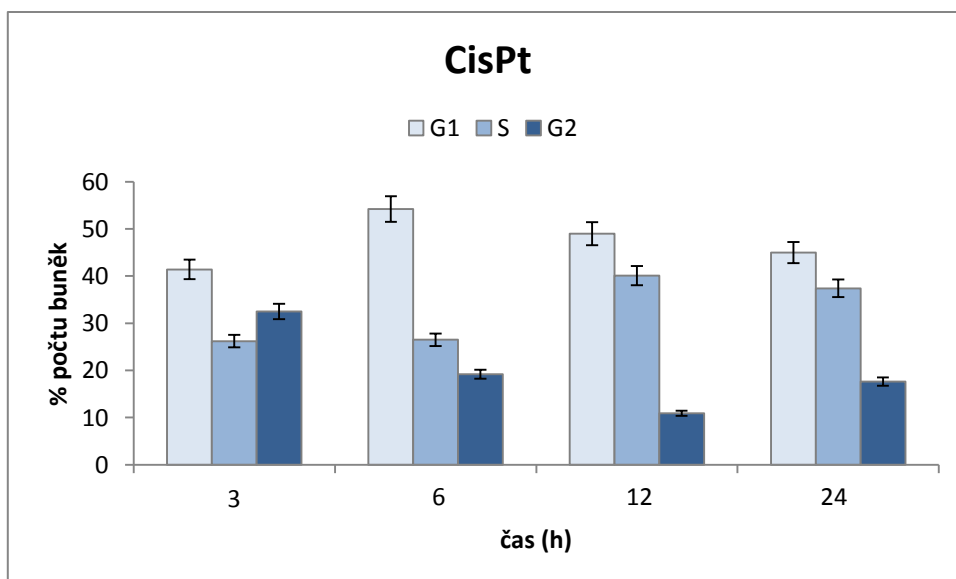
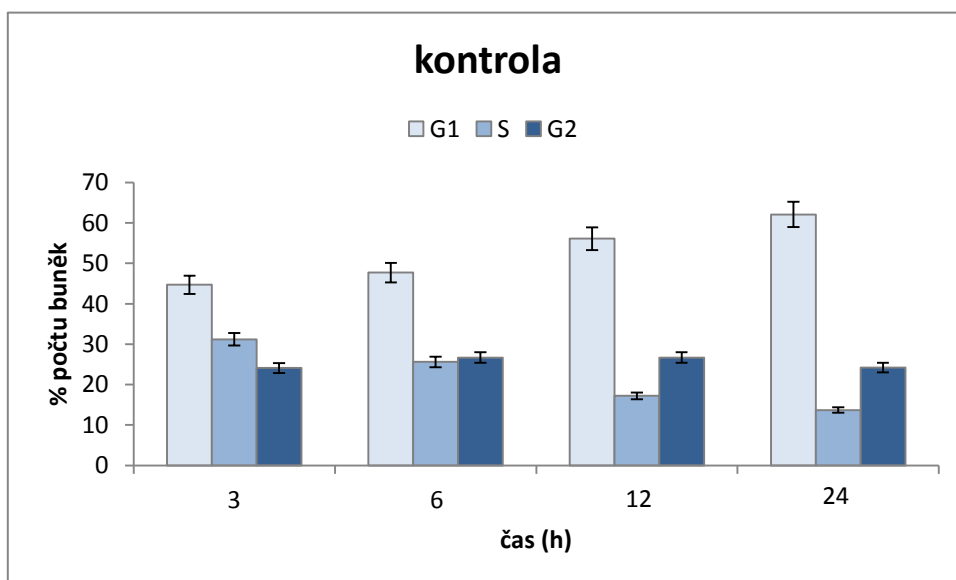
K vyhodnocení morfologických změn buněk A2780 po ovlivnění testovanými cytostatiky střední inhibiční koncentrací c_4 byla použita časosběrná mikroskopie kontrolních a ovlivněných buněk pomocí světelného mikroskopu Olympus IX70 při zvětšení 400x a časových intervalech 0 h, 24 h, 48 h a 72 h (Obr. 5-8). Buňky linie A2780 jsou epiteloidní, s oválnými jádry a výraznými jadérky, mají proměnlivý tvar a rostou ve shlucích jednotlivých buněk. Zatímco kontrolní buňky proliferovaly a zvyšovaly svoji konfluenci, ovlivněné buňky postupně ztrácely adhezenci k povrchu, zakulacovaly se a vykazovaly intenzivní „blebbing“, tedy vytvářely cytoplazmatickou membránou ohraničené protruze typické pro smrt buňky apoptózou. Nejdříve byly morfologické změny patrné u buněk ovlivněných paklitaxelem, dále pak gemcitabinem, topotekanem a etoposidem. Tyto změny se s prodlužujícími se časovými intervaly zvýrazňovaly, naopak minimální morfologické změny byly pozorované u buněk ovlivněných karboplatinou.

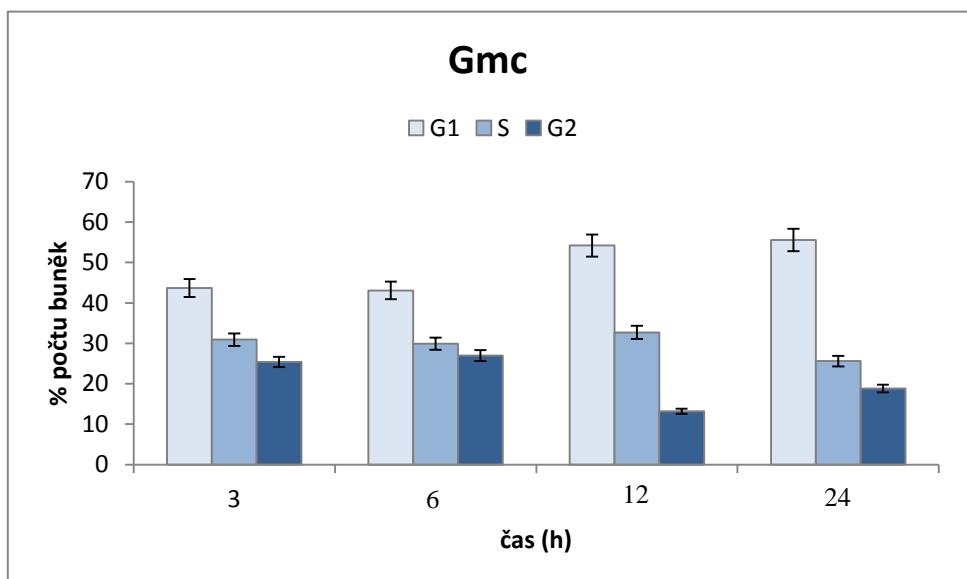
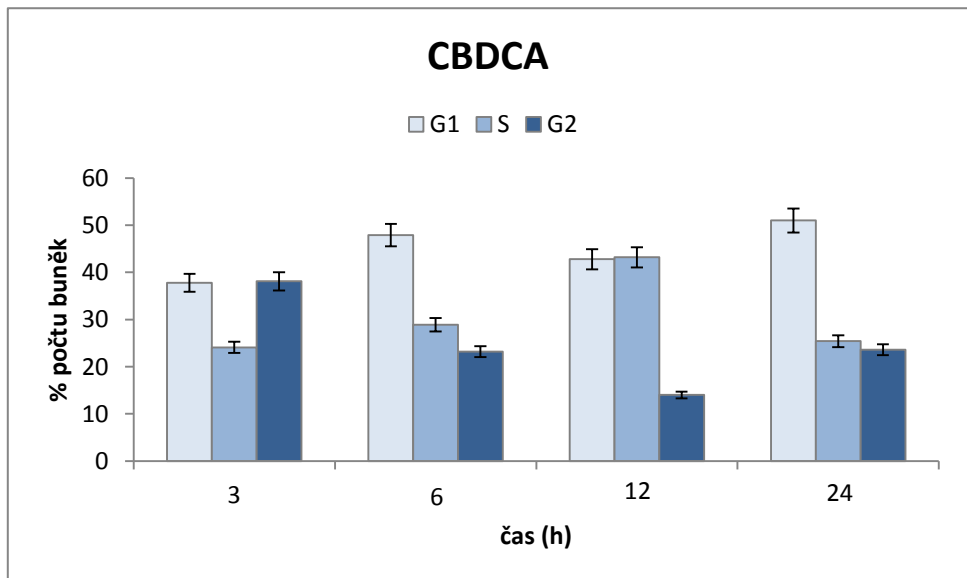
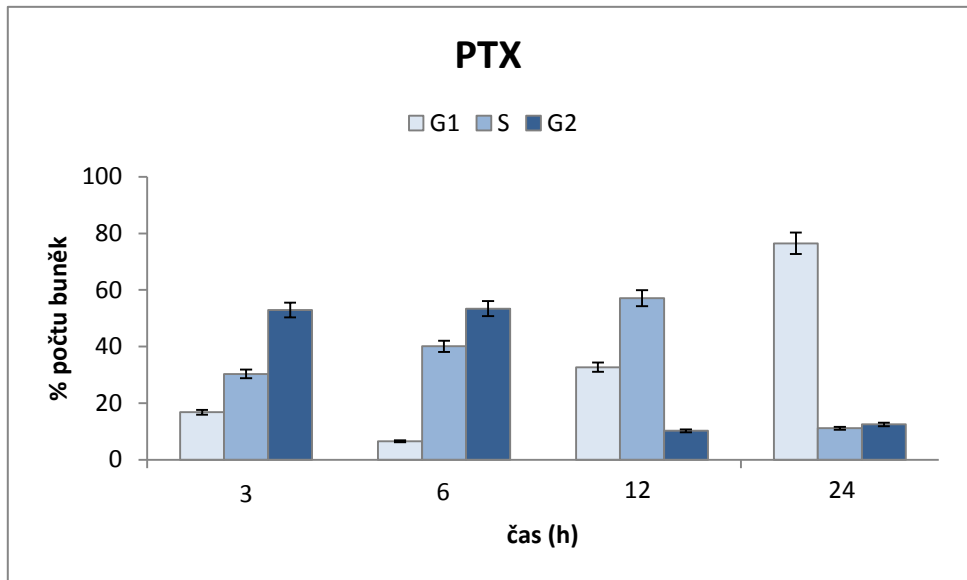


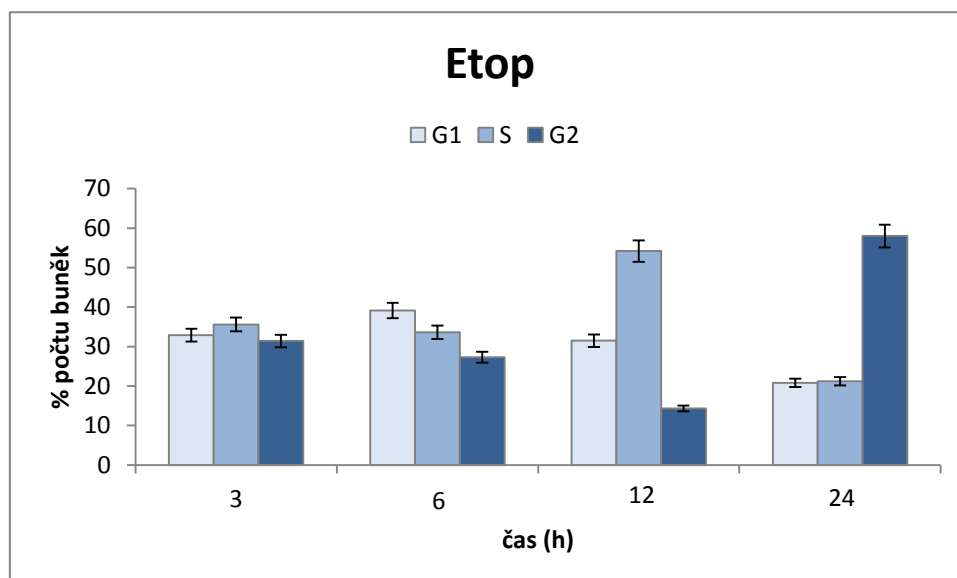
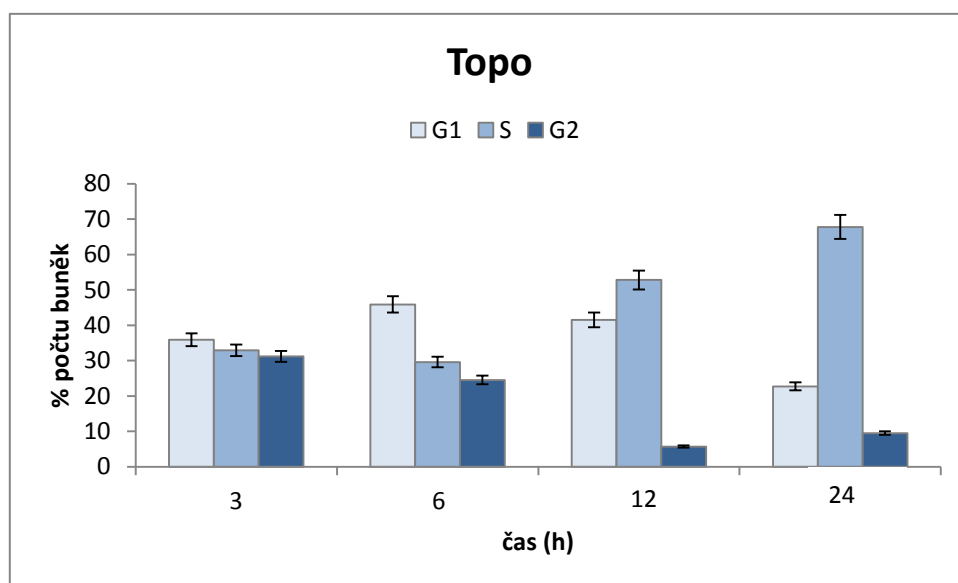
Obr. 5-8 Proliferace buněk A2780 ovlivněných střední inhibiční koncentrací c_4 testovaných cytostatik v intervalu 72 h časosběrnou mikroskopií pomocí Olympus IX70, zvětšení 400x, měřítko 100 μm .

5.9 Analýza buněčného cyklu – barvení propidium jodidem

Vliv testovaných cytostatik na distribuci fází buněčného cyklu byl stanovený pomocí průtokové cytometrie a barvení propidium jodidem. Testovaná cytostatika ve střední inhibiční koncentraci c_4 měnila distribuci fází buněčného cyklu buněk A2780 v časových intervalech 3 h – 6 h – 12 h – 24 h (Obr. 5-9). Cisplatina, karboplatina a gemcitabin zvyšovaly podíl buněk v G1/S fázi buněčného cyklu. Topotekan a etoposid indukovaly hromadění buněk v S fázi, tento efekt byl prodloužený u buněk ovlivněných topotekanem. Paklitaxel blokoval buněčný cyklus v G2 fázi cyklu až do šesté hodiny po ovlivnění, následně se pak zvyšovala S fáze ve 12 h a G1 fáze ve 24 h.







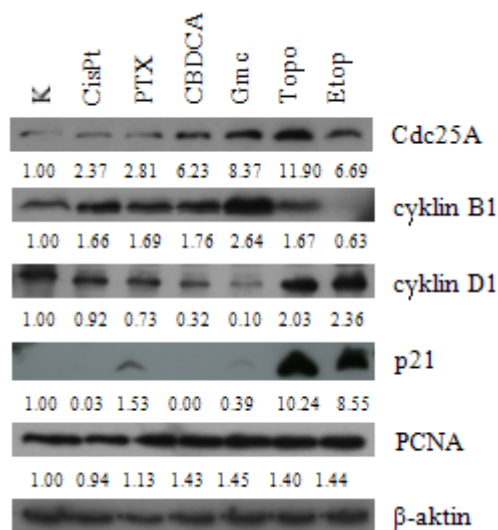
Obr. 5-9 Změny v distribuci fází buněčného cyklu u buněk A2780 ovlivněných střední inhibiční koncentrací c_4 testovaných cytostatik v intervalech 3 h – 6 h – 12 h a 24 h.

5.10 Detekce proteinů Western blotem

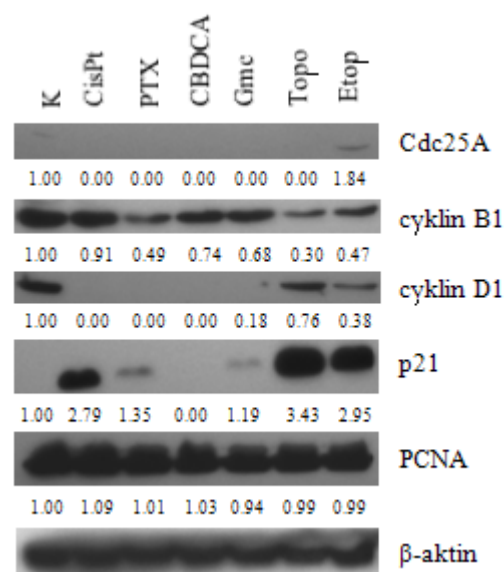
5.10.1 Detekce proliferačních markerů pomocí Western blotu

Cytostatika ve střední inhibiční koncentraci c_4 po 24 h od ovlivnění měnila expresi proteinových markerů buněčného cyklu (Obr. 5-10-1A, B). Expres Cdc25A proteinové fosfatázy byla zvýšená po ovlivnění všemi testovanými cytostatiky, nejvyšší hodnoty byly zaznamenány po ovlivnění topotekanem a gemcitabinem, dále pak etoposidem a karboplatinou. Expres cyklinu B1 byla zvýšená po ovlivnění všemi testovanými cytostatiky s výjimkou etoposidu. Nejvýznamnější bylo zvýšení po ovlivnění gemcitabinem, dále pak karboplatinou, paklitaxelem, topotekanem a cisplatinou. Expres cyklinu D1 byla zvýšená po ovlivnění topotekanem a etoposidem, naopak snížena po ovlivnění paklitaxelem, karboplatinou a hlavně gemcitabinem. Expres p21 byla zvýšená po ovlivnění topotekanem, etoposidem, paklitaxelem a gemcitabinem. Expres PCNA byla zvýšená po ovlivnění gemcitabinem, etoposidem, karboplatinou, topotekanem a mírně po ovlivnění paklitaxelem.

Po 48 h inkubace s cytostatiky byla expres Cdc25A proteinové fosfatázy snížena po ovlivnění všemi testovanými cytostatiky. Expres cyklinu B1 byla snížena po ovlivnění paklitaxelem, gemcitabinem a topotekanem, naopak byla zvýšená po ovlivnění etoposidem. Expres cyklinu D1 byla snížena u všech testovaných cytostatik. Výrazně zvýšená expres p21 se objevila po 48 h u cisplatin. Expres PCNA byla nepatrně zvýšená po ovlivnění cisplatinou, paklitaxelem a karboplatinou.



Obr. 5-10-1A Změny exprese markerů buněčné proliferace u buněk A2780 po ovlivnění testovanými cytostatiky (koncentrací c_4) v průběhu 24 h.



Obr. 5-10-1B Změny exprese markerů buněčné proliferace u buněk A2780 po ovlivnění testovanými cytostatiky (koncentrací c_4) v průběhu 48 h.

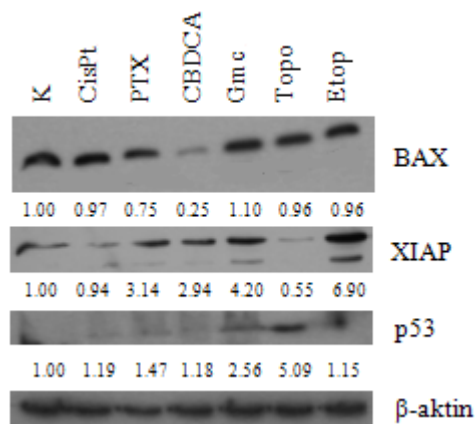
Kvantitativní hodnocení intenzit proužků bylo provedeno pomocí analyzátoru GelLogic PRO 2200 a Carestream molecular imaging softwaru (Carestream Health, Inc., USA). Intenzita proužků blotů byla vyjádřena jako procento kontroly (100 %).

K – kontrola, CisPt – cisplatina, PTX – paklitaxel, CBDCA - karboplatina, Gmc – gemcitabin, Topo – topotekan, Etop - etoposid.

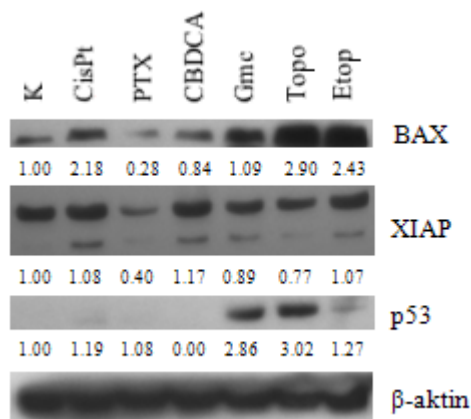
5.10.2 Detekce apoptických markerů pomocí Western blotu

Cytostatika testovaná ve střední inhibiční koncentraci c_4 ovlivnila také expresi apoptických markerů u modelových buněk A2780 (Obr. 5-10-2A, B). Expres Bax byla snížena po ovlivnění karboplatinou a paklitaxelem. Expres p53 byla zvýšená po ovlivnění topotekanem. Expres XIAP jako inhibitoru apoptických proteinů, obzvláště kaspázy 3 a 7, byla zvýšená po ovlivnění gemcitabinem, etoposidem, paklitaxelem a karboplatinou, ale snížena po ovlivnění topotekanem.

Po 48 h inkubace s cytostatiky se expres Bax zvýšila po ovlivnění topotekanem, etoposidem a také po ovlivnění gemcitabinem a cisplatinou, expres Bax se naopak snížila u paklitaxelu a karboplatiny. Expres XIAP byla zvýšená po ovlivnění cisplatinou, karboplatinou a etoposidem, naopak snížena po ovlivnění paklitaxelem, topotekanem a gemcitabinem. Expres p53 byla výrazně zvýšená po ovlivnění gemcitabinem a topotekanem.



Obr. 5-10-2A Změny exprese proteinů apoptických markerů u buněk A2780 po ovlivnění testovanými cytostatiky (koncentrací c_4) v průběhu 24 h.



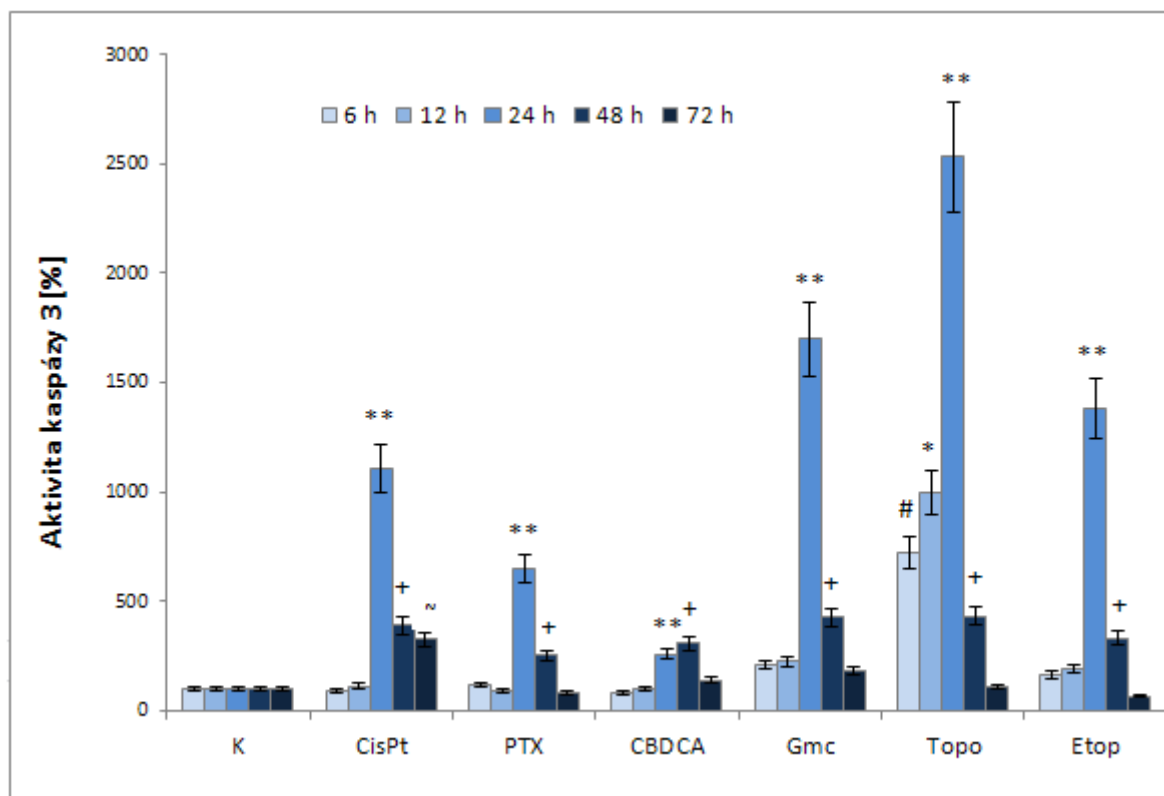
Obr. 5-10-2B Změny exprese proteinů apoptických markerů u buněk A2780 po ovlivnění testovanými cytostatiky (koncentrací c_4) v průběhu 48 h.

Kvantitativní hodnocení intenzit proužků bylo provedeno pomocí analyzátoru GelLogic PRO 2200 a Carestream molecular imaging softwaru (Carestream Health, Inc., USA). Intenzita proužků blotů byla vyjádřena jako procento kontroly (100 %).

K – kontrola, CisPt – cisplatina, PTX – paklitaxel, CBDCA - karboplatina, Gmc – gemcitabin, Topo – topotekan, Etop - etoposid.

5.11 Stanovení aktivity kaspázy 3

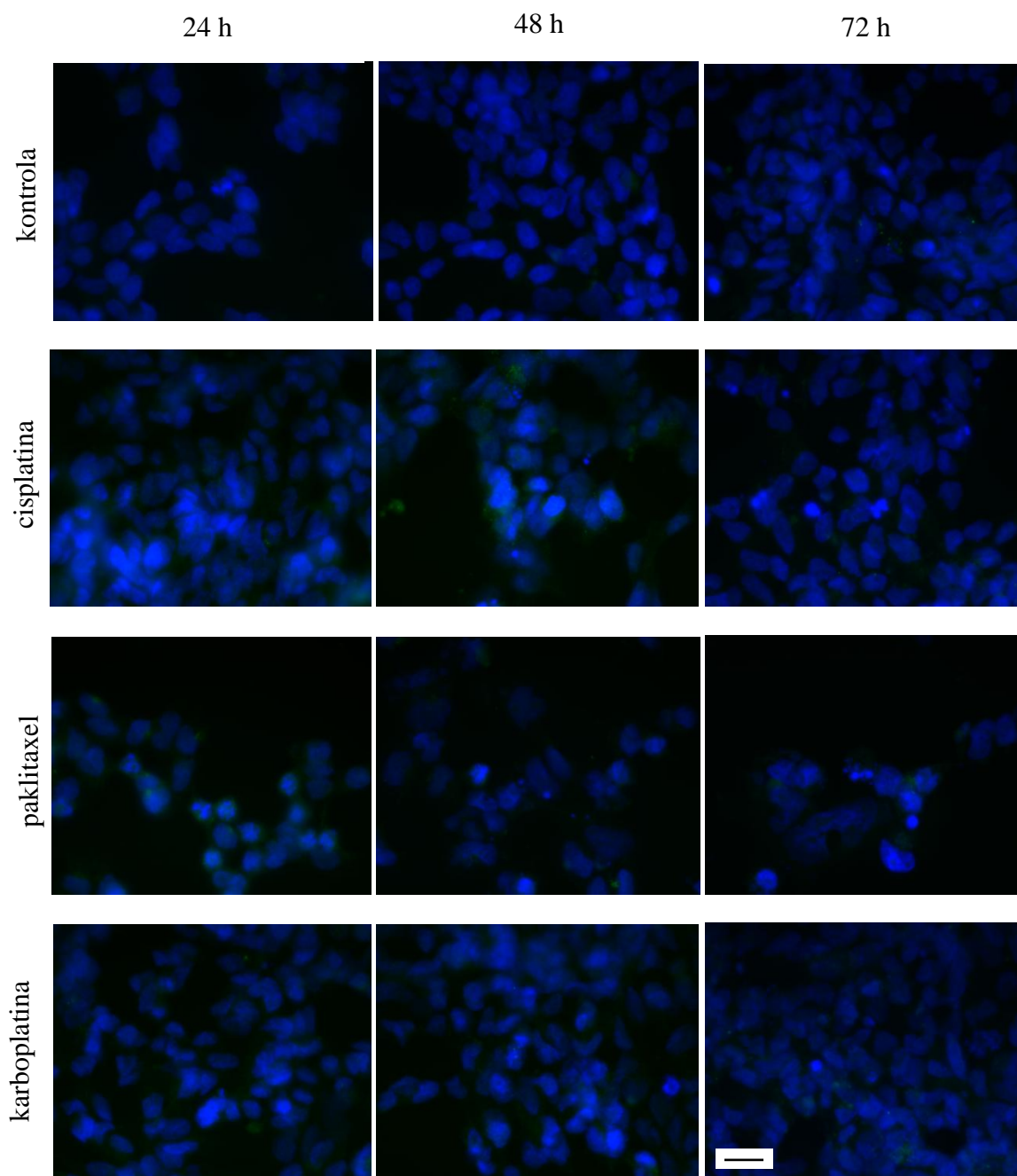
Aktivita kaspázy 3 byla stanovena pomocí kinetické fluorimetrické assay. Cytostatika testovaná ve střední inhibiční koncentraci c_4 ovlivnila aktivitu kaspázy 3 v průběhu 6 h – 12 h – 24 h – 48 h – 72 h inkubace (Obr. 5-11). Nejnižší aktivita kaspázy 3 byla detekovaná po ovlivnění karboplatinou. Naopak nejrychlejší nástup a nejvyšší hodnoty aktivity kaspázy 3 byly zaznamenány po ovlivnění topotekanem. V případě ostatních testovaných cytostatik byla nejvyšší aktivita kaspázy 3 shodně detekovaná po 24 h od ovlivnění buněk cytostatikou.



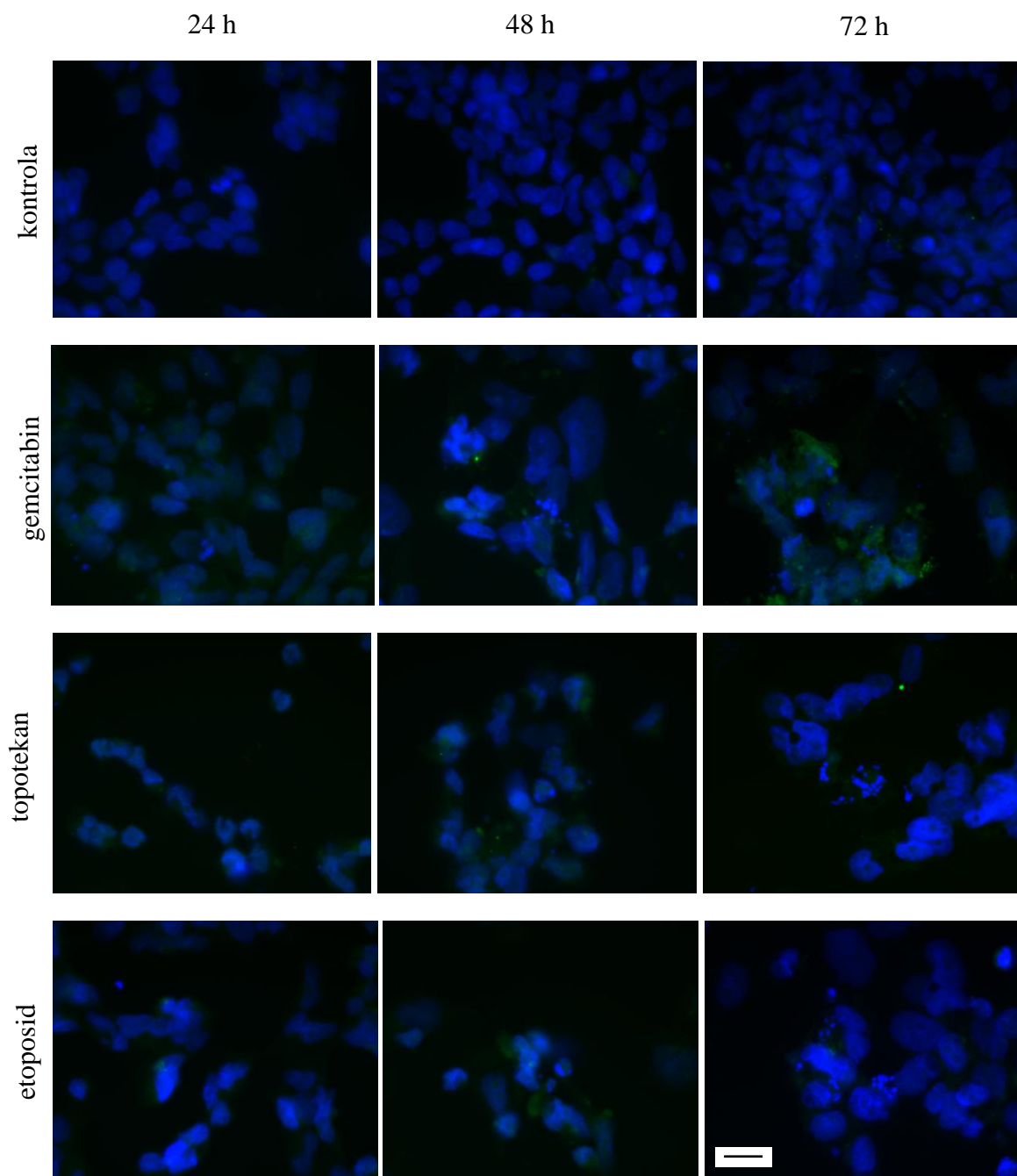
Obr. 5-11 Změny aktivity kaspázy 3 u buněk A2780 ovlivněných střední inhibiční koncentrací c_4 testovaných cytostatik v intervalu 72 h. K – kontrola, CisPt – cisplatin, PTX – paklitaxel, CBDCA – karboplatina, Gmc – gemcitabin, Topo – topotekan, Etop – etoposid. # signifikantně vyšší oproti kontrole v 6 h intervalu, * signifikantně vyšší oproti kontrole ve 12 h intervalu, ** signifikantně vyšší oproti kontrole ve 24 h intervalu, + signifikantně vyšší oproti kontrole ve 48 h intervalu, ~ signifikantně vyšší oproti kontrole v 72 h intervalu. Data byla analyzována pomocí Studentova t-testu, kde $p < 0,05$ bylo považováno za statisticky významné.

5.12 Fluorescenční mikroskopie

Testovaná cytostatika ve střední inhibiční koncentraci c_4 v průběhu 72 h u cílových buněk indukovala apoptózu a tedy i produkci efektorové kaspázy 3, kterou jsme detekovali pomocí specifické protilátky anti-myší Ig Alexa Fluor[®] 488 jako zelenou fluorescenci (obr. 5-12A, 5-12B). Gemcitabin, topotekan a etoposid indukovaly nejvyšší aktivitu kaspázy 3. Cisplatina a paklitaxel indukovaly aktivitu kaspázy 3 jen slabě a to v intervalu 48 hodin po ovlivnění. Minimální fluorescence byla detekovaná po ovlivnění karboplatinou. V případě paklitaxelu a etoposidu byla zachycená morfolgie tzv. “mitotické katastrofy“, kdy se v preparátech vyskytovalo velké množství fragmentovaných buněčných jader (výrazně modrá fluorescence).



Obr. 5-12A: Fluorescenční detekce kaspázy 3 v buňkách linie A2780. Kontrolní a buňky ovlivněné střední inhibiční koncentrací c_4 cisplatinu, paklitaxelu a karboplatiny v časových intervalech 24 – 48 – 72 hodin. Zelená fluorescence – kaspáza 3, modrá fluorescence – buněčná jádra barvená DAPI. Měřítko 100 μm .



Obr. 5-12B: Fluorescenční detekce kaspázy 3 v buňkách linie A2780. Kontrolní a buňky ovlivněné střední inhibiční koncentrací c_4 gemcitabinu, topotekanu a etoposidu v časových intervalech 24 – 48 – 72 hodin. Zelená fluorescence – kaspáza 3, modrá fluorescence – buněčná jádra barvená DAPI. Měřítko 100 μm .

6. DISKUSE

Ovariální karcinom představuje nejčastější příčinu úmrtí mezi gynekologickými malignitami v populaci českých žen, dosahuje až 47 % všech případů (Sedláková 2011a). Incidence onemocnění má rostoucí tendenci a mortalita se za posledních 20 let výrazně nezměnila. Problematika ovariálního karcinomu a jeho léčby má proto svůj význam.

Protinádorová chemoterapie zaznamenala v minulých desetiletích významný rozvoj. Původně byla pouze doplňkovou léčbou, ale postupně nabyla významu standardní léčebné metody a stala se rovnocennou léčbě chirurgické a radioterapii. Současná chemoterapie je založená převážně na empirických zkušenostech a generalizaci výsledků rozsáhlých klinických studií, aniž by respektovala individualitu nemocného a biologickou odlišnost každého nádoru. Je vysoce pravděpodobné, že zohlednění faktorů individuality a možnosti jejich posouzení může optimalizovat výběr protinádorových léčiv i jejich dávky, což ve svých důsledcích může příznivě ovlivnit terapeutický efekt a sníží riziko nežádoucích účinků (Chumchalová 2000). Pokud je daný nádor vůči podávanému cytostatiku rezistentní, pak bez ohledu na statistické výsledky randomizovaných klinických studií nemůžeme u daného pacienta očekávat léčebný efekt. Pacient je zbytečně zatěžovaný toxickou látkou a zbytečně také trpí nežádoucími účinky chemoterapie. Průběh onemocnění se tak může také zhoršit oslabením metabolismu a přirozených obranných mechanismů nemocného, případně vznikem dalších mutací nádoru (Talač 2000). Účinek cytostatik není přísně specifický pro nádorové buňky, ale působí toxicky i na normální buňky.

Léčba v onkologii směřuje k individualizaci. „Personalizovaná medicína“ je směr, jehož cílem je co největší zvýšení účinnosti terapie s minimálním zatížením pacienta. Jedním ze způsobů, jak toho dosáhnout je hodnocení citlivosti nádorové buněčné populace k cytostatikům v podmínkách *ex vivo* s cílem výběru cytostatika s maximální účinností a eliminací léčiva neúčinného (Michalová 2008). Eliminace neúčinného preparátu na základě výsledků *in vitro* zvyšuje šance na léčebný úspěch.

Velká část testů chemorezistence stále leží v oblasti výzkumu a neuplatňuje se v rutinní klinické praxi. Ale neustálý vývoj v této oblasti slibuje zlepšení klinických aplikací a individuální přístup v léčbě nádorů (Hatok 2009).

In vitro testy chemosenzitivity jsou vhodným prostředkem možnosti individualizace léčby pacientek s ovariálním karcinomem. V systémové chemoterapii nádorových onemocnění se používají léčebná schémata ověřená klinickými studiemi. Statisticky nejúspěšnější chemoterapie je považovaná za nejlepší léčebný postup. Až při neúspěšné primární, případně sekundární terapii je výběr cytostatik omezený a další volba není standardizovaná. Ale ani statisticky nejefektivnější způsob terapie není zárukou úspěšné léčby a vždycky existuje jistý podíl případů dané diagnózy, u kterých není dosaženo očekávaného účinku chemoterapie (Michalová 2008). Každý nádor, přestože je jednotně morfologicky klasifikovaný, je tvořený heterogenními populacemi buněk, které mohou mít odlišné molekulární vlastnosti, které předurčují jejich proliferační aktivitu, pohotovost k apoptóze, metastatický potenciál nebo také stupeň citlivosti k aplikované terapii (Lichý 2000).

Naším cílem bylo na souboru klinických vzorků sledovat jejich reaktivitu na panel šesti testovaných cytostatik. Testované byly cisplatina, paklitaxel, karboplatina, gemcitabin, topotekan a etoposid. První tři cytostatika se aplikují v klinické praxi k léčbě ovariálního karcinomu v první linii chemoterapie, gemcitabin a topotekan se uplatňují v alternativních režimech druhé a vyšší linie chemoterapie a etoposid se dnes v léčbě ovariálního karcinomu téměř nepoužívá. První linie chemoterapie byla potvrzena studiemi GOG 111, EORTC-GCCG a NOCOVA (Talač 2000).

Testovaná cytostatika mají rozdílný mechanismus účinku. Alkylační látky, cisplatina a karboplatina, vytváří inter- a intra-řetězcové překřížení (Conklin 2004). Tato cytostatika působí v kterékoli fázi buněčného cyklu, nejsou tedy fázově specifická. Taxanový derivát, paklitaxel, blokuje buněčné dělení stabilizací mikrotubulů. Chromozómy jsou proto neschopné dosáhnout metafázické konfigurace. Tento proces blokuje progresi mitózy a prodlužuje aktivaci mitotických kontrolních bodů nebo návrat do G fáze buněčného cyklu bez buněčného dělení (Bharadwaj 2004; Brito 2008).

Ovlivněné buňky jsou zastaveny v G2/M fázi buněčného cyklu. Pyrimidinový analog, gemcitabin, inhibuje proces potřebný pro syntézu DNA (Plunkett 1995). Inhibitor topoizomerázy I, topotekan, se interkaluje mezi DNA baze. Tato interkalace narušuje proces replikace DNA v místech vazby topotekanu. Procesy brání replikaci DNA a vedou k buněčné smrti (Staker 2002). Topotekan tedy působí v S fázi buněčného cyklu a nerozvíjí se na něj mnohočetná léková rezistence. A konečně inhibitor topoizomerázy II, etoposid, vytváří ternární komplexy s DNA a topoizomeráza II brání opětovnému svázání DNA řetězců. To způsobuje chyby v syntéze DNA a vede k apoptóze buňky (Gordaliza 2004). Na rozdíl od topotekanu se po aplikaci etoposidu velmi často rozvíjí mnohočetná léková rezistence, fenotyp MDR.

Dílčí cíle práce zahrnovaly hodnocení reaktivity souboru klinických vzorků na testovaná cytostatika *in vitro*, testování klinických vzorků po jejich kryokonzervaci, srovnání reaktivity buněk izolovaných ze solidního nádoru a ascitu téže pacientky, sledování reaktivity vzorků v čase při recidivách onemocnění a dále pak testování referenční buněčné linie A2780.

Testování souboru klinických vzorků přineslo následující výsledky. Pokud nebudeme uvažovat etoposid, který se dnes používá v léčbě ovariálního karcinomu jen velmi výjimečně, byla nejvyšší rezistence *in vitro* zjištěná na gemcitabin a karboplatinu. Naopak nejnižší výskyt rezistence *in vitro* byl zjištěný na topotekan a cisplatinu. Citlivost ovariálních nádorových buněk k topotekanu a cisplatině zmiňují také další studie (Cwierka 2000; Kostečka 2003; Cloven 2004). Na karboplatinu byla ve srovnání s cisplatinou častěji zjištěná rezistence *in vitro* a to platilo pro solidní nádory i pro ascity. Podstatně vyšší výskyt rezistence na karboplatinu v porovnání s cisplatinou také potvrzují jiné studie (Holloway 2002; Cloven 2004; Saitou 2009). Při současné primární léčbě ovariálního karcinomu platinovým preparátem v kombinaci karboplatina a paklitaxel, by bylo na základě zjištěných výsledků vhodné častěji používat cisplatinu. Výsledky opakovaně ukazují výrazně nižší výskyt rezistence u cisplatin v porovnání s karboplatinu, jak také zmiňuje práce našich kolegů (Sedláková 2010). Posledním testovaným cytostatikem byl paklitaxel, na který byla nejčastěji zjištěná jen hraniční vnímavost.

Topotekan, který se používá k léčbě metastatického ovariálního karcinomu, malobuněčného plicního karcinomu a karcinomu děložního čípku podle doporučení Vládní agentury USA pro potraviny a léčiva (FDA), vykazoval opakovaně vysokou senzitivitu při testování *in vitro*. Tyto výsledky vedou k myšlence přednostně ho používat v sekundární léčbě ovariálního karcinomu, případně změnit i schéma standardní primární terapie ovariálního karcinomu v případě, že budou výsledky klinických studií úspěšné (Tošner 2009). Podle výsledků klinické studie, vedené na nizozemském institutu pro výzkum rakoviny, má topotekan účinnost přinejmenším srovnatelnou s paklitaxelem a to s vyšším procentem odpovědí a signifikantně pozdějším nástupem recidivy (Huinink 1997). Jiná klinická studie se zabývala aplikací trojkombinace cytostatik karboplatina, paklitaxel a topotekan při léčbě ovariálního karcinomu. Výsledky ale nepřinesly žádné zlepšení v podobě oddálení času do progresu onemocnění nebo prodloužení doby přežití po přidání třetího cytostatika.

Rozdílná reaktivita klinických vzorků na panel testovaných cytostatik má své příčiny. Všeobecně je z literatury známo, že mezi tyto příčiny patří individuální genotyp a fenotyp každého pacienta, genetická variabilita v léčivo metabolizujících enzymech a transportních systémech, genový polymorfismus nebo výskyt sekvenčních variant v populaci (Meyer 2000). Na druhé straně je účinek protinádorového léčiva závislý také na povaze léčivé látky, tedy zda jde o látku hydrofobní, hydrofilní, se schopností procházet lipidovou dvojvrstvou, záleží také na velikosti molekuly a s tím související difúzi.

Rozvoj rezistence na podávanou cytostatickou léčbu je hlavní příčinou neúspěšné terapie a vysoké mortality u ovariálního karcinomu. Geisler et al. v *Gynecologic Oncology* v roce 2007 publikovali výsledky práce, v níž se věnovali extrémní lékové rezistenci u pacientek po předchozí aplikaci paklitaxelu. Pouze u malého procenta žen (10,3%) se ukázalo, že jejich nádor nebyl rezistentní na paklitaxel. Malý počet nízké lékové rezistence a vysoké procento extrémní lékové rezistence nalezené na paklitaxel v této práci po předchozí aplikaci karboplatiny a paklitaxelu otevírá otázku jeho opakovaného užití při recidivě onemocnění u těchto pacientek (Geisler 2007).

Holloway et al. publikovali, že ženy léčené cytostatiky spadajícími do skupiny extrémní lékové rezistence zjištěné při testování *in vitro* měly signifikantně kratší dobu přežití ve srovnání se ženami, které dostaly cytostatika s nízkou rezistencí zjištěnou *in vitro*. Tato studie 119 vzorků epiteliálních ovariálních karcinomů našla extrémní lékovou rezistenci v celých 89 % případů (Holloway 2002).

V souvislosti s rozvojem rezistence na podávanou cytostatickou léčbu u pacientek s karcinomem ovaria, provedli kolegové z Porodnické a gynekologické kliniky Fakultní nemocnice v Hradci Králové studii. V ní sledovali expresi proteinů souvisejících právě s rozvojem rezistence u souboru klinických vzorků a sledovali korelaci mezi expresí p-glykoproteinu, proteinů rezistence MRP, MRP3 a MRP5 a výsledky chemorezistence určené MTT testem v podmínkách *in vitro*. Zaznamenané byly vyšší hodnoty p-gp, MRP, MRP3 a MRP5 u pacientek s recidivou onemocnění a prokázány byly také vyšší hodnoty p-gp a MRP u pacientek chemorezistentních *in vitro* podle MTT testu. Ze stanovených proteinů rezistence se jako nejperspektivnější u karcinomu ovaria jeví p-gp a MRP, jak uvádí práce autorů (Sedláková 2012).

Po hodnocení celkové reaktivity souboru klinických vzorků bylo našim dalším cílem srovnání reaktivity vzorků solidních nádorů nebo ascitů pacientek s ovariálním karcinomem před a po jejich kryokonzervaci. Námi získaná data ukazují, že polovina srovnávaných párových hodnot vykazuje shodnou reaktivitu, čtvrtina zvýšenou a zbývající čtvrtina sníženou reaktivitu na testovaná cytostatika po kryokonzervaci vzorků. Nebyl zjištěn statisticky významný rozdíl v reaktivitě izolovaných buněk před a po jejich zamrazení. Tyto slibné první výsledky však bude potřeba potvrdit ještě na větším souboru klinických vzorků. Pokud by se potvrdila hypotéza, že kryokonzervace a následné rozmrazení vzorků neovlivňuje jejich reaktivitu vůči cytostatikům, bylo by toho možné využít k odložení *in vitro* testování chemosenzitivity v případech, kdy to není okamžitě po odběru vzorků, z časových nebo personálních důvodů, možné.

Literatura však uvádí, že poškození zdravých ovariálních buněk chladem ovlivňuje jejich membrány, mikrotubuly (Albertini 1995), organizaci cytoskeletu (Overstrom 1990) a zona pellucida (Vaita 1998). Bylo také popsáno, že mitotický aparát buňky se snadno poškozuje tvorbou intracelulárních krystalků ledu během procesu

mrazení a rozmrazení vzorku (Baka 1995; Shaw 2000). Zda stejnou citlivost vykazují také ovariální nádorové buňky, to se nám nepodařilo jednoznačně potvrdit.

Standard v kryokonzervaci představuje rychlé zamrazení vzorku s kryoprotektivem dimethylsulfoxidem a jeho následné pomalé rozmrazení, které minimalizuje tvorbu intracelulárních krystalků ledu a tím další strukturní poškození buněk (Fabbri 1998; Trad 1999). Tento postup jsme při naší práci dodrželi. Toxický účinek dimethylsulfoxidu však není zanedbatelný. Histologická analýza prováděná při jedné studii zaznamenala poškození tkáně během mrazení a rozmrazení u myších, kočkodaních i lidských vzorků oocytů (Candy 1995; Hovatta 1996; Candy 1997).

V dostupné literatuře jsme také našli množství příspěvků s tematikou kryokonzervace ovariální tkáně nebo oocytů pacientek s nádorovým onemocněním, které mají zájem o možnost udržení fertility a případné gravidity po skončení cytostatické léčby (Dolmans 2013).

Dalším z našich cílů bylo srovnání reaktivity buněk izolovaných ze solidního nádoru a ascitu těžce pacientky. U časných stádií ovariálního karcinomu má přítomnost ascitu negativní prognostický vliv. Nejčastěji se však tvoří až v pokročilých stádiích a jeho opakovaný vznik je také spojovaný s horší prognózou pacientek. Téměř 70% získaných párových hodnot vykazovalo stejnou reaktivitu na testovaná cytostatika. V ostatních případech byla reaktivita solidních nádorů v porovnání s ascity vyšší nebo naopak nižší. Nebyl zjištěn statisticky významný rozdíl mezi reaktivitou buněk izolovaných ze solidního nádoru a ascitu těžce pacientky. V některých případech by se dala zvýšená reaktivita buněk izolovaných ze solidního nádoru vysvětlit tím, že za přítomnosti krve ve vzorku tkáně, kdy je potřeba lyzovat přítomné erytrocyty, může tento proces poškodit také izolované buňky. Důsledkem tohoto poškození pak může být zvýšená vnímavost buněk k testovaným cytostatikům.

Pokud by se reaktivita buněk izolovaných ze solidního nádoru a ascitu opravdu nelišila, mělo by to velký praktický význam, protože z ascitu se buňky izolují mnohem snáze než ze solidního nádoru a současně ve většině případů je jejich viabilita, v porovnání s buňkami izolovanými ze solidních nádorů, vyšší. V ascitu máme také

větší jistotu, že izolované buňky jsou právě buňky nádorové, ve srovnání s nádorovou tkání, kde jsou přítomné i buňky podpůrných tkání. Množství úspěšně vyhodnotitelných testů *in vitro* klinických vzorků by se tak zvýšilo.

Na menším souboru klinických vzorků jsme také sledovali případnou změnu reaktivity vzorků pacientek s recidivou onemocnění v čase. Ve dvou případech nevykazovala reaktivita na testovaná cytostatika v čase odebíraných vzorků žádnou logickou závislost, tedy reaktivitu rostoucí nebo klesající v čase, případně neměnicí se reaktivitu. Tyto vzorky jsme proto do souboru nezahrnuli. U 60 % párových hodnot se reaktivita v čase neměnila, u 21 % se snižovala a u zbylých 17 % vnímavost k cytostatikům rostla. K relevantnímu hodnocení závislosti bude potřeba většího počtu vzorků pacientek s recidivami ovariálního karcinomu a data budou následně interpretovaná našimi klinickými kolegy. V těchto případech je pravděpodobně reaktivita na podávaná cytostatika závislá na počtu cyklů prodělané chemoterapie, případně počtu recidiv onemocnění, klinickém stavu pacientek a v neposlední řadě také na histologickém typu každého testovaného ovariálního karcinomu.

Problematika testování chemorezistence/chemosenzitivity v podmínkách *in vitro* má svá úskalí, ale zároveň je jediným způsobem, jak lze předpovědět reaktivitu izolovaných buněk vůči cytostatiku *in vivo*. Je to velmi obtížné a to z toho důvodu, že nejsme schopni v laboratoři simulovat podmínky *in vivo*. Určíme-li rezistenci vůči cytostatiku v podmínkách *in vitro*, dá se předpokládat rezistence na dané cytostatikum i v podmínkách *in vivo*. Totéž ale s největší pravděpodobností nebude platit pro sensitivitu zjištěnou *in vitro* a reaktivitu na dané cytostatikum *in vivo* (Chumchalová 2000). Při interpretaci výsledků testování buněk izolovaných z klinických vzorků v podmínkách *in vitro* je třeba brát v úvahu, že nádorové onemocnění je komplexní děj, který se nedá zjednodušit na problém jednotlivých buněk nebo buněčných populací. S tím zákonitě souvisí to, že buňky *in vitro* kultivované v nefyziologických podmínkách a bez kontaktu s okolními buňkami jejich „přirozeného“ prostředí, se mohou chovat jinak než v podmínkách *in vivo*. To se může projevit změnou morfologie, růstových parametrů, exprese povrchových a intracelulárních markerů nebo vést k jejich dediferenciaci (Langdon 2004). Je potřeba mít na paměti, že snaha interpretovat

výsledky *in vitro* testů chemosenzitivity musí být brána v kontextu biologie nádorového onemocnění (Talač 2000), kdy růst nádoru představuje komplexní děj, který zahrnuje proliferaci nádorových buněk, reakce buněk imunitního systému pacienta, neovaskularizaci a apoptózu. Toto nejsme v podmínkách *in vitro* schopni navodit.

Také samotný proces izolace nádorových buněk je stresem, který může ovlivnit metabolickou aktivitu buněk. Testy hodnotí reaktivitu buněk v krátkém čase, jde tedy o podíl buněk cyklujících a klidových, účinek řady cytostatik je ale právě fázově specifický. Chemosenzitivitu *in vitro* může ovlivňovat specifikace nádoru, způsob odběru nádorových buněk, předchozí léčba pacientky nebo přesnost zpracování vzorku. Problémem je identifikace nádorových buněk odebíraných z nádoru. Buněk musí být dostatečné množství a není jisté, jestli některá buněčná populace neroste rychleji než jiná. Mezi úskalí hodnocení účinku cytostatik na buňky izolované z nádoru patří i nejistota, jestli v dané buněčné populaci opravdu převládají buňky nádorové. Analýza kultivovaných buněk není u každého klinického vzorku, z časových důvodů ani v důsledku limitního množství buněk, možná. Navíc chybí jednoznačný identifikační marker těchto buněk. Otázkou také je, kdy buňky ovlivnit, zda hned po jejich izolaci nebo po adaptačním čase, po delší době, kdy už se buňky mohou selektovat (Chumchalová 2000).

Pro přesnější určení reaktivity klinického vzorku je potřeba zaměřit se na další parametry jako je hodnocení aktivity MDR genů, cyklinu D1, telomerázy, proteinu p53 a s tím související apoptózy, která je považovaná za konečný děj působení téměř každého cytostatika (Sedlakova 2012).

Hodnocení chemosenzitivity *in vitro* se provádělo na základě výsledků MTT testu. Výsledky MTT testu doporučují kolegové z Porodnické a gynekologické kliniky fakultní nemocnice v Hradci Králové použít ve druhé, případně vyšší linii chemoterapie (Tošner 2009). Nemyslí se tím ale výsledky testování primárních vzorků, nýbrž výsledky testování vzorků postupně odebíraných v čase při recidivách onemocnění. To proto, že se chemosenzitivita/chemorezistence v průběhu podávání chemoterapie pravděpodobně mění. Autoři potvrzují naše zjištění, že při souhrnném testování nebyl zjištěn statisticky významný rozdíl mezi výsledky testování buněk z nádoru a ascitu.

Testy *in vitro* chemosenzitivity/chemorezistence byly prováděné za účelem předpovědět účinnost chemoterapie u jednotlivých pacientek s ovariálním karcinomem. MTT test nemůže být samozřejmě jediný, který by měl rozhodovat o léčbě. Význam má také přítomnost nádorového rezidua, přidružená onemocnění, histologie nádoru, pokročilost onemocnění, stupeň diferenciacie nádoru nebo snášenlivost chemoterapie obecně (Tošner 2009).

Interpretace získaných dat není jednoduchá a s tím souvisí také otázka, že chemosenzitivita *in vitro* nemusí odpovídat stavu *in vivo* také díky selekci nádorových buněk. Otázkou zůstává, zachovávají-li si izolované buňky své vlastnosti a nemění se v průběhu kultivace. Třídenní inkubační interval je poměrně krátký a měl by tak zabránit případné selekci nádorových buněk. Na druhou stranu mohou být ale znevýhodněná cytostatika působící při masivní proliferaci buněk, která u těchto klinických vzorků nenastává v průběhu tří inkubačních dnů. Předpokládá se také rozdílný vliv na nádorové kmenové buňky a dceřiné proliferující buňky nádoru. To může být důvod proč paklitaxel, užívaný v klinické praxi v první linii chemoterapie, vykazoval rezistenci častěji než cisplatina (Tošner 2009).

Jako metodu testování *in vitro* chemosenzitivity jsme v souladu s doporučením podle SOP Fakultní nemocnice v Olomouci vybrali MTT test detekující aktivitu mitochondriální sukcinát dehydrogenázy (Denizot 1986). Na základě dosud publikovaných prací ho lze charakterizovat jako jednoduchou, rychlou, dobře reprodukovatelnou a relativně standardní metodu pro predikci chemorezistence/chemosenzitivity nádorů, která je navíc i cenově přijatelná (Sedláková 2011a). Rutinní test musí být standardní laboratorní technikou pro přípravu vzorku a kultivaci buněk. Musí být také možná automatizace postupu a tyto podmínky MTT test splňuje. Pro co nejlepší reprodukovatelnost výsledků *in vitro* testování je potřeba dodržet několik postupů: standardizovaný postup zpracování vzorků, dodržení co nejkratšího času od odběru ke zpracování a dostatek materiálu ke zpracování, které tvoří základ úspěšného testování. Těmito zásadami jsme se při zpracování klinických vzorků řídili.

Limitací MTT testu je, že neumí rozlišit cytotoxický a cytostatický účinek testovaných látek a výsledky testu jsou ovlivněné přítomností normálních buněk (Michalová 2008). Buněčná suspenze je heterogenní, podmínky *ex vivo* nejsou stejné jako *in vivo*, ale přesto všechno je MTT test stále jedním z nejužívanějších *in vitro* testů k testování chemosenzitivity. Je také relativně levný a nevyžaduje náročné laboratorní vybavení. Pokud je možné standardizovat postup od odběru vzorku po jeho zpracování, výsledkem mohou být data, mluvící ve prospěch myšlenky individuálního přístupu k léčbě na základě testování chemosenzitivity *in vitro*.

Podle studie Sargenta et. al je senzitivita MTT testu u ovariálního karcinomu 81 % a u akutní myeloidní leukémie dokonce celých 98 %. Navíc senzitivita *in vitro* a výsledky pacientů *in vivo* korelují na hladině významnosti $p < 0,0001$. Pětileté přežití je u pacientů léčených chemoterapeutiky senzitivními *in vitro* vyšší než u pacientů, kteří měli na danou terapii zjištěnou rezistenci *in vitro* a to na hladině významnosti $p < 0,033$ (Sargent 2003).

Studie vedená kolegy z Porodnické a gynekologické kliniky Fakultní nemocnice v Hradci Králové se zaměřila na sledování souvislostí mezi charakteristikou nádoru a výsledky MTT testu *in vitro*. Dospěla k tomu, že stádium a stupeň diferenciacie ovariálního karcinomu nekorelují s primární lékovou rezistencí/senzitivitou zjištěnou MTT testem *in vitro*. Naopak histologický typ ovariálního karcinomu koreluje s rezistencí/senzitivitou k cytostatikům *in vitro*. Pacientky s primární lékovou rezistencí na karboplatinu a paklitaxel *in vitro* měly více komplikací během primární chemoterapie, kratší čas do progresu onemocnění a jeho horší prognózu. Pacientky se zjištěnou *in vitro* rezistencí na karboplatinu a paklitaxel měly také signifikantně vyšší riziko progresu onemocnění při standardní primární léčbě platina a paklitaxel (Sedláková 2011b).

Pro srovnání s primárními klinickými vzorky byla v další práci použita modelová ovariální nádorová buněčná linie A2780. Kultivace nádorových buněk v podmínkách *in vitro* je dnes běžnou metodou se širokým uplatněním. Technika pěstování buněk v podmínkách *in vitro* byla odstartovaná v první polovině dvacátého století. V roce 1951 pak byla publikovaná první práce s tematikou lidské nádorové

buněčné linie, kterou byla linie HeLa. Dnes existuje velké množství buněčných linií odvozených od celé řady nádorů. Tyto linie jsou vhodnými modely pro studium biologických a biochemických principů buněk. Slouží také jako významný obnovitelný zdroj biologického materiálu pro testování *in vitro*. My jsme pro další studium účinnosti panelu šesti testovaných cytostatik zvolili buněčnou linii A2780, která je definovaná jako cisplatin-senzitivní buněčná linie a sloužila nám jako modelový systém ovariálního karcinomu v podmínkách *in vitro*.

K hodnocení anti-proliferační aktivity testovaných cytostatik jsme stejně jako v případě klinických vzorků zvolili MTT test a zkombinovali ho s dynamickým monitorováním buněčné proliferace pomocí xCELLigence systému. Tato metoda je vhodná pro bezznačkové hodnocení proliferace a buněčné adheze v reálném čase, která má některé výhody v porovnání s end-point testy a je dnes široce používaná k hodnocení toxicity sledovaných látek (Roche 2005). Výsledky ukazují, že hodnoty EC50 získané pomocí xCELLigence jsou nižší než ty získané pomocí MTT testu. xCELLigence systém tedy detekuje anti-proliferační aktivitu s vyšší citlivostí. Koncentrační rozmezí testovaných cytostatik bylo vybrané na základě postupů předchozího testování (Brigulová 2010). Nejvyšší anti-proliferační efekt byl pozorovaný u paklitaxelu, gemcitabinu a topotekanu. Shodných výsledků bylo dosaženo také pomocí WST-1 testu metabolické aktivity buněk.

Pro další, podrobnější testování účinku cytostatik, jsme vybrali střední inhibiční koncentraci c_4 , která byla nejbližší průměrným hodnotám EC50 u testovaného souboru klinických vzorků. Je zřejmé, že nejvyšší testované koncentrace by byly pro buňky velmi rychle smrtelné, naopak nejnižší testované koncentrace by buňky krátkodobě téměř neovlivnily.

Vybraná cytostatika v testované koncentraci měnila distribuci buněčného cyklu v průběhu 24 h od ovlivnění. Cisplatin, karboplatin a gemcitabin zvyšují podíl buněk v G1/S fázi buněčného cyklu. Tato cytostatika nakonec inhibují syntézu DNA a toto koreluje s distribucí buněčného cyklu. Topotekan a etoposid indukují hromadění buněk v S fázi buněčného cyklu a tento efekt trval déle u topotekanu. Topotekan inhibuje topoizomerázu I a etoposid topoizomerázu II. Oba tyto enzymy jsou nezbytné během replikace DNA a jejich inhibice vede k inhibici syntézy DNA. Buňky ovlivněné

paklitaxelem se hromadí v G2 fázi buněčného cyklu už 6 hodin po ovlivnění, dále pak zvyšují podíl buněk v S fázi po 12 hodinách od ovlivnění a G1 fázi po 24 hodinách. Tento průběh koreluje s mechanismem působení paklitaxelu, který zastavuje ovlivněné buňky v G2/M fázi buněčného cyklu. Toto chování odráží dynamiku buněčné proliferace a smrti během 24 hodinového inkubačního intervalu a je zapříčiněné poklesem počtu buněk v G2 fázi cyklu v důsledku apoptózy. U delších časových intervalů, 48 a 72 hodin, nebyly výsledky uvedené, protože opakovaně docházelo k tvorbě neoddělitelných shluků buněk, které ucpávaly trysky průtokového cytometru.

Expresí proteinů detekovaná Western blotem se po ovlivnění cytostatiky také měnila. Cdc25A fosfatáza hraje klíčovou roli v aktivaci cyklin-dependentních kináz a indukuje G1/S přechod buněčného cyklu. Normální průchod buněčným cyklem vede ke zvýšení hladiny Cdc25A fosfatázy (Vigo 1999). Její exprese byla nejvíce zvýšená po ovlivnění topotekanem, vyšší exprese v porovnání s kontrolou byla zaznamenána i po ovlivnění karboplatinou, gemcitabinem a etoposidem. Po 24 hodinách od ovlivnění nebyly buňky inhibované v progresi G1/S fáze buněčného cyklu. Zvýšená exprese mitotického cyklinu B1 značí blok v přechodu do M fáze buněčného cyklu. Toto bylo zaznamenáno u všech testovaných cytostatik kromě etoposidu. Distribuce buněčného cyklu po ovlivnění etoposidem ukazovala asi 60 % buněk hromadících se v G2 fázi cyklu. Cyklin D1 reguluje cyklin-dependentní kinázy a přechod do G1/S fáze buněčného cyklu (Johnson 1999). Jeho exprese byla snižena u buněk ovlivněných gemcitabinem, což koreluje se zvýšením počtu buněk v G1 fázi pozorovaným při analýze buněčného cyklu. Protein p21 je inhibátorem cyklin-dependentních kináz, který inhibuje průchod buněk buněčným cyklem. Jeho exprese je zvýšená proteinem p53 v odpovědi na poškození DNA (Dulic 1994; Deng 1995). Zvýšená exprese p21 u buněk A2780 byla zaznamenána po ovlivnění topotekanem a etoposidem ve 24 h časovém intervalu. V tomto čase byla exprese p53 signifikantně zvýšená jen u topotekanem ovlivněných buněk. Jaderný antigen proliferujících buněk PCNA je členem „DNA sliding clamp“ rodiny proteinů, která pomáhá při replikaci DNA (Kelman 1995). Je dobře všeobecně přijímaným markerem buněčné proliferace a je také nezbytný pro procesy reparace DNA (Shivji 1992; Essers 2005). V případě buněk A2780 byla exprese PCNA zvýšená po ovlivnění karboplatinou, gemcitabinem, topotekanem a etoposidem.

X-vážíci inhibitor apoptických proteinů XIAP váže a inhibuje aktivitu kaspázy 3, 7 a 9 (Deveraux 1999). To blokuje apoptózu v důsledku inhibice efektorových kaspáz. Nejvyšší exprese XIAP byla detekovaná po ovlivnění etoposidem, dále pak gemcitabinem, karboplatinou a paklitaxelem, což koreluje s relativně nízkou aktivitou kaspázy 3 zjištěnou u buněk A2780 po ovlivnění těmito cytostatiky. Exprese XIAP byla snížena po ovlivnění topotekanem v porovnání s kontrolou a topotekanem ovlivněné buňky zároveň vykazovaly nejvyšší expresi proteinu p53 a nejvyšší aktivitu kaspázy 3. Bcl-2 a Bax jsou transkripční cíle pro tumor-supresorový protein p53. Exprese proapoptického proteinu Bax může být indukovaná také cytostatiky (Basu 1998). Protein Bax podporuje aktivitu efektorové kaspázy 3 a tím i apoptózu. Bax jako člen BCL2 rodiny proteinů je aktivátorem apoptózy. Exprese Bax byla signifikantně snížena u buněk ovlivněných karboplatinou. Toto koreluje s aktivitou kaspázy 3, která byla u buněk A2780 nejnižší právě po ovlivnění karboplatinou.

Aktivace kaspáz je asociovaná s indukcí apoptózy. Kaspáza 3 jako jedna z efektorových kaspáz indukuje proteolytickou aktivaci mnoha buněčných proteinů, s apoptózou asociovanou migraci chromatinu, fragmentaci DNA a fragmentaci buněčného jádra (Slee 2001). Měřitelné markery apoptózy, jako aktivace kaspázy 3, mají potenciál pro predikci klinické odpovědi k chemoterapii (Flick 2004).

Detekovali jsme signifikantně zvýšené hladiny aktivované kaspázy 3 v buňkách A2780 po ovlivnění testovanými cytostatiky 24 hodin po ovlivnění. Nejvyšší aktivita kaspázy 3 byla detekovaná po ovlivnění topotekanem, dále pak gemcitabinem, etoposidem a cisplatinou. U paklitaxelu, který vykazuje nejvyšší anti-proliferační aktivitu detekovanou MTT testem, měřením impedance pomocí xCELLigence systému a také sledováním morfologie časosběrnou mikroskopií, jsme neprokázali její zvýšenou aktivitu u ovlivněných buněk. Nejnižší aktivita kaspázy 3 byla pozorovaná u buněk ovlivněných karboplatinou, což odpovídá i výsledkům nalezeným v literatuře (Ludwig 2004a; Ludwig 2004b).

Kaspáza 3 byla detekovaná také pomocí fluorescenční mikroskopie. Její nejvyšší aktivita byla zaznamenána po ovlivnění gemcitabinem, topotekanem a etoposidem, méně pak u cisplatinu a paklitaxelu. Shodně byla aktivita kaspázy 3 nejnižší v případě karboplatiny.

Několik studií srovnávalo reaktivitu platinových derivátů a paklitaxelu (cytostatika používaná v první linii chemoterapie ovariálního karcinomu) na senzitivních i rezistentních modelových buněčných liniích (Behrens 1985; Godwin 1992; Debernardis 1997). A2780 jako cisplatina-senzitivní buněčná linie se používá jako model pro *in vitro* studie ovariálního karcinomu, které testují anti-proliferační účinky platinových derivátů (Henkels 1997), paklitaxelu (Vikhanskayaa 1998) a kombinací těchto cytostatik (Jones 1998).

Výsledky našeho *in vitro* testování chemosenzitivity na modelu buněčné linie A2780 ukázalo, že nejvyšší anti-proliferační efekt vykazuje topotekan. Ten v porovnání s ostatními testovanými cytostatiky také indukuje nejvyšší expresi proteinu p53, nízkou expresi XIAP a také nejvyšší detekovanou aktivitu efektorové kaspázy 3. Topotekan jako inhibitor topoizomerázy I se používá k léčbě rekurentního metastatického ovariálního karcinomu a dalších typů nádorových onemocnění. Topotekan vykazuje protinádorovou aktivitu v platina-senzitivních, platina-rezistentních i paklitaxel-rezistentních nádorech (Creemers 1996; Kudelka 1996; Swisher 1997). Účinnost topotekanu na naší modelové linii koreluje s výsledky naší předchozí práce, kdy byly testované klinické vzorky ovariálních karcinomů (Brigulová 2010).

V předkládané práci jsme na souboru klinických vzorků sledovali účinnost širšího panelu cytostatik, který zahrnuje cytostatika používaná v první a druhé linii chemoterapie ovariálního karcinomu v klinické praxi. Sledovali jsme případné změny v reaktivitě po kryokonzervaci vzorků, srovnávali reaktivitu solidních nádorů a ascitů téže pacientky a reaktivitu vzorků v čase při recidivách onemocnění. Účinnost testovaných cytostatik jsme také hodnotili na modelové buněčné linii A2780. Výsledky práce by mohly přispět k cílenější volbě terapie a tím i její vyšší účinnosti v případě pacientek s recidivami onemocnění. Je také možné, že hodnocením dalších klinických vzorků dojdeme časem k závěru, že by bylo potřeba upravit schéma primární chemoterapie při léčbě ovariálního karcinomu ke většímu prospěchu léčených pacientek.

7. ZÁVĚRY

7.1 Klinické vzorky

1. Soubor klinických vzorků vykazoval nejvyšší vnímavost na topotekan a cisplatinu, naopak nejnižší byla vnímavost na gemcitabin a etoposid. Účinek cisplatinu a karboplatiny nebyl identický, na karboplatinu byla výrazně častěji zjištěná rezistence. A na paklitaxel byla nejčastěji zjištěná jen hraniční vnímavost.

2. Chemosenzitivita čerstvě izolovaných buněk a buněk po jejich kryokonzervaci se statisticky významně nelišila na hladině významnosti $p < 0,05$. Tyto výsledky však mohou být ovlivněné malým počtem vzorků v souboru.

3. Nebylo také statisticky potvrzeno, že by se lišila reaktivita buněk izolovaných ze solidního nádoru a ascitu téže pacientky na hladině významnosti $p < 0,05$. Tyto výsledky však mohou být také ovlivněné malým počtem vzorků v souboru.

4. Na otázku rozdílu reaktivity v průběhu času u opakovaných odběrů vzorků téže pacientky při recidivě onemocnění nelze jednoznačně odpovědět bez znalosti histologie a dalších charakteristik jednotlivých vzorků nádorů a také pacientek.

7.2 Buněčná linie A2780

- Testovaná cytostatika inhibovala proliferaci a indukovala buněčnou smrt u modelové buněčné linie A2780 v závislosti na koncentraci a době působení. Toxicita na úrovni EC50 byla stanovená pro koncentraci c_4 u každého z testovaných cytostatik. Tuto koncentraci jsme dále používali k ovlivnění buněk A2780 a testování dalších mechanismů působení cytostatik.
- Cytostatika měnila distribuci fází buněčného cyklu a expresi proteinů spojených s buněčným cyklem. Cytostatika inhibovala buněčný cyklus v různých fázích, podle jejich mechanismu účinku.
- Testovaná cytostatika u sledovaných buněk indukovala programovanou buněčnou smrt, apoptózu. Detekovali jsme apoptické markery a vysoké hladiny efektorové kaspázy 3.
- Buňky sledované buněčné linie A2780 byly nejvíce citlivé na gemcitabin, topotekan a paklitaxel, což ve srovnání s klinickými vzorky představuje shodu jen v případě topotekanu. Na gemcitabin vykazovaly klinické vzorky nejčastěji rezistenci a v případě paklitaxelu to byla jen hraniční vnímavost.

Práce byla řešena v rámci grantu NR/8768-3/06, jehož hlavním řešitelem byl pan doc. MUDr. Jindřich Tošner, CSc. a dále pak v rámci grantu IGA MZ NS/9737-3/2008, jehož hlavním řešitelem byla paní MUDr. Iva Sedláková, Ph.D.

8. SEZNAM LITERATURY

1. Agarwal, R., Kaye, S. B. (2003). "Ovarian cancer: strategies for overcoming resistance to chemotherapy." *Nat Rev Cancer* 3: 502-516.
2. Albertini, D. F. (1995). "The cytoskeleton as a target for chilling injury in mammalian cumulus oocytes complexes." *Cryobiology* 32: 551–552.
3. Asselin, E., Mills, G. B., Tsang, B. K. (2001). "XIAP regulates Akt activity and caspase-3-dependent cleavage during cisplatin-induced apoptosis in human ovarian epithelial cancer cells." *Cancer Res* 61: 1862–1868.
4. Baka, S. G., Toth, T. L., Veeck, I. L. Jr, Jones, H. W., Muasher, S. J., Lanzendorf, S. E. (1995). "Evaluation of the spindle apparatus of in-vitro matured human oocytes following cryopreservation." *Hum Reprod.* 10: 1816–1820.
5. Basu, A., Haldar, S. (1998). " The relationship between bcl-2, bax and p53: Consequences for cell cycle progression and cell death." *Mol Hum Reprod* 4: 1099-1109.
6. Behrens, B. C., Grotzinger, K. R., Hamilton, T. C. et al. (1985). "Cytotoxicity of 3 cisplatin (CP) analogues in a drug-sensitive and a new CP resistant human ovarian cancer (OC) cell line." *Proc. Am. Assoc. Cancer Res* 26: 262.
7. Bharadwaj, R., Yu, H. (2004). "The spindle checkpoint, aneuploidy, and cancer." *Oncogene* 23(11): 2016–2027.
8. Black, M. M., Speer, F. D. (1954). "Further observations on the effects of cancer chemotherapeutic agents on the in vitro dehydrogenase activity of cancer tissue." *J Natl Cancer Inst* 14: 1147-1158.
9. Black, M. M., Speer, F. D. (1953). "Effects of cancer chemotherapeutic agents on dehydrogenase activity of human cancer tissue in vitro." *Am J Clin Pathol* 23: 218–227.
10. Boise, L. H., Gonzales-Garcia, M., Postema, C. E., et al. (1993). "Bcl-x, a Bcl-2-related gene that functions as a dominant regulator of apoptotic cell death." *Cell* 74: 597.

11. Bolis, G., Scarfone, G., Polverino, G., Raspagliesi, F., Tateo, S. et al. (2004). "Paclitaxel 175 or 225 mg per meters squared with carboplatin in advanced ovarian cancer: a randomized trial." *J Clin Oncol* 22: 686-690.
12. Bown, N. P., Reid, M. M., Malcolm, A. J., Davison, E. V., Craft, A. W., Pearson, A. D. (1994). "Cytogenetic abnormalities of small round cell tumours." *Med Pediatr Oncol* 23: 124–129.
13. Boyd, J. (2003). "Specific Keynote: Hereditary Ovarian Cancer: What We Know." *Gynecologic Oncology* 88: 8-10.
14. Boyd, M. R. (1989). "Status of the NCI preclinical antitumor drug discovery screen." *Princ Pract Oncol*. 3: 1-12.
15. Bradford, M. M. (1976). "A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding." *Anal Biochem* 72: 248-254.
16. Brigulová, K., Červinka, M., Tošner, J. et al. (2010). "Chemoresistance testing of human ovarian cancer cells and its in vitro model." *Toxicol in vitro* 24: 2108-2115.
17. Brito, D. A., Yang, Z., Rieder, C. L. (2008). "Microtubules do not promote mitotic slippage when the spindle assembly checkpoint cannot be satisfied." *The Journal of Cell Biology* 182(4): 623-629.
18. Burger, R. A., et al. (2012). "Phase III trial of bevacizumab (BEV) in the primary treatment of advanced epithelial ovarian cancer (EOC), primary peritoneal cancer (PPC), or fallopian tube cancer (FTC): A Gynecologic Oncology Group study " *J Clin Oncol* 28(Suppl;abstr LBA1): 18.
19. Candy, C. J., Wood, M. J., Whittingham, D. G. (1995). "Follicular development in cryopreserved marmoset ovarian tissue after transplantation." *Hum Reprod*. 10: 2334–2338.
20. Candy, C. J., Wood, M. J., Whittingham, D. G. (1997). "Effect of cryoprotectants on the survival of follicles in frozen mouse ovaries." *J Reprod Fertil*. 110: 11–19.
21. Cibula, D., Petruželka, L. et al. (2009). "Oncogynecology." Grada Publishing, Prague: 614.

22. Cloven, N. G., Kyshtoobayeva, A., Burger, A. R. et al. (2004). "In vitro chemoresistance and biomarker profiles are unique for histologic subtypes of epithelial ovarian cancer." *Gynecologic Oncology* 92: 160-166.
23. Conklin, K. A. (2004). "Cancer chemotherapy and antioxidants." *J. Nutr.* 134(11): 3201-3204.
24. Cook, J. (2002). "Family history of ovarian cancer." *Current Obstetrics Gynecology* 12: 47-51.
25. Cree, I. A. (2009). "Chemosensitivity and chemoresistance testing in ovarian cancer." *Gynecol Cancer* 21: 39-43.
26. Creemers, G. J., Bolis, G., Gore, M. et al. (1996). "Topotecan, an active drug in the second-line treatment of epithelial ovarian cancer: results of a large European phase II study." *J Clin Oncol* 14: 3056-3061.
27. Cwierotka, K., Hajdúch, M., Pilka, R., Nosková, V., Švébišová, H. et al. (2000). "Chemoterapie ovariálního karcinomu s ohledem na stanovení in vitro chemosenzitivity – vybrané kazuistiky " *Klinická onkologie* 13: 58-59.
28. Dean, M., Rzhetsky, A., Aliknets, R. (2001). "The human ATP-binding cassette (ABC) transporter superfamily." *Genome Res.* 11: 1156-1166.
29. Debernardis, D., Siré, E. G., Feudis, P. et al. (1997). "p53 status does not affect sensitivity of human ovarian cancer cell lines to paclitaxel." *Cancer Res* 57: 870.
30. Deng, C., Zhang, P., Harper, J. W. et al. (1995). "Mice lacking p21CIP1/WAF1 undergo normal development, but are defective in G1 checkpoint control." *Cell* 82: 675-684.
31. Denizot, F., Lang, R. (1986). "Rapid colorimetric assay for cell growth and survival. Modifications to the tetrazolium dye procedure giving improved sensitivity and reliability." *J Immunol Methods* 89: 271-277.
32. Deveraux, Q. L., Reed, J. C. (1999). "IAP family proteins – suppressors of apoptosis." *Genes Dev.* 13(3): 239-252.
33. Deveraux, Q. L., Takahashi, R., Salvesen, G. S., Reed, J. C. (1997). "X-linked IAP is a direct inhibitor of cell-death proteases." *Nature* 388: 300–304.

34. Dolmans, M. M., Jadoul, P., Gilliaux, S., Amorim, C. A., Luyckx, V., Squifflet, J., Donnez, J., Van Langendonck, A. (2013). "A review of 15 years of ovarian tissue bank activities." *J Assist Reprod Genet.* 30(3): 305-314.
35. Dulic, V., Kaufman, W. K., Wilson, S. J. et al. (1994). "p53-dependent inhibition of cyclin-dependent kinase activities in human fibroblasts during radiation-induced G1 arrest." *Cell* 76: 1013-1023.
36. El Maalouf, G., Le Tourneau, C., Batty, G. N., Faivre, S., Raymond, E. (2009). "Markers involved in resistance to cytotoxics and targeted therapeutics in pancreatic cancer." *Cancer Treat Rev.* 35: 167-174.
37. Essers, J., Theil, A. F., Baldeyron, C. et al. (2005). "Nuclear dynamics of PCNA in DNA replication and repair." *Mol. Cell. Biol.* 25(21): 9350–9359.
38. Fabbri, R., Porcu, E., Marsella, T., Primavera, M. R., Seracchioli, R., Ciotti, P. M., et al. (1998). "Oocyte cryopreservation." *Hum Reprod.* 13(4): 98–108.
39. Fínek, J. (2012). "Pátá jistota v léčbě ovariálního karcinomu." *Medical Tribune* 13: B4-B5.
40. Flick, M. B., O'Malley, D., Rutherford, T. et al. (2004). "Apoptosis-Based Evaluation of Chemosensitivity in Ovarian Cancer Patients." *Reproductive Sciences* 11(4): 252-259.
41. Fojo, A. T., Whang-Peng, J., Gottesman, M. M., et al. (1985). "Amplification of DNA sequences in human multidrug-resistant KB carcinoma cells." *Proc Natl Acad Sci USA* 82: 7661-7665.
42. Friesen, C., Fulda, S., Debatin, K. M. (1999). "Cytotoxic drugs and the CD95 pathway." *Leukemia* 13: 1854–1858.
43. Fulda, S., Debatin, K. M. (2006). "Extrinsic versus intrinsic apoptosis pathways in anticancer chemotherapy." *Oncogene* 25: 4798.
44. Gatti, L., Supino, R., Perego, P., Pavesi, R., Caserini, C., Carenini, N., Righetti, S. C., Zuco, V., Zunino, F. (2002). "Apoptosis and growth arrest induced by platinum compounds in U2-OS cells reflect a specific DNA damage recognition associated with a different p53-mediated response." *Cell Death Differ.* 9: 1352–1359.

45. Gayther, S. A., Pharoah, P. D. (2010). "The inherited genetics of ovarian and endometrial cancer. ." *Curr Opin Genet Dev* 20(3): 231-238.
46. Geisler, J. P., Linnemeier, C. G., Thomas, J. A., et al. (2007). "Extreme drug resistance is common after prior exposure to paclitaxel." *Gynecologic Oncology* 106: 538-540.
47. Godwin, A. K., Meister A., O'Dwyer, P. J. et al. (1992). "High resistance to cisplatin in human ovarian cancer cell lines is associated with marked increase of glutathione synthesis." *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 89: 3070-3074.
48. Gordaliza, M., García, P. A., Corral, J. M. et al. (2004). "Podophyllotoxin: distribution, sources, applications and new cytotoxic derivatives." *Toxicol* 44(4): 441-459.
49. Gore, M. E., Fryatt, I., Wiltshaw, E. et al. (1990). "Treatment of relapsed carcinoma of the ovary with cisplatin or carboplatin following initial treatment with these compounds." *Gynecol Oncol* 36: 207-211.
50. Granstrom, C., Sundquist, J., Hemminki, K. (2008). "Population attributable fractions for ovarian cancer in Swedish women by morphological type." *Br J Cancer* 98(1): 199-205.
51. Green, J. A., Vistica, D. T., Young, R. C. et al. (1984). "Potentiation of melphalan cytotoxicity in human ovarian cancer cell lines by glutathione depletion." *Cancer Res* 44: 5427-5431.
52. Greenberger, L. M., Sampath, D. (2006). "Resistance to Taxanes." *Cancer Drug Resistance*, Humana Press: 329-351.
53. Hamburger, A. W., Salmon, S. E. (1977). "Primary bioassay of human tumor stem cells." *Science* 197: 461-463.
54. Hamburger, A. W., Salmon, S. E. (1981). "Use of in vitro tests in predictive cancer chemotherapy." *J Natl Cancer Inst* 66: 981-988.
55. Han, S. S., Choi, S. H., Lee, Y. K. et al. (2008). "Predictive value of individualized tumor response testing by ATP-based chemotherapy response assay in ovarian cancer." *Cancer Invest* 26: 426-430.
56. Haselberger, K., Peterson, D. C., Thomas, D. G., Darling, J. L. (1996). "Assay of anticancer drugs in tissue culture: Comparison of a tetrazolium-based assay

- and protein binding dye assay in short-term cultures derived from human malignant glioma." *Anticancer Drugs* 7: 331-338.
57. Hatok, J., Babusikova, E., Matakova, T., Mistuna, D., Dobrota, D., Racay, P. (2009). "In vitro assays for the evaluation of drug resistance in tumor cells. ." *Clin Exp Med* 9(1): 1-7.
 58. Heintz, A. P., Odicino, F., Maisonneuve, P., Beller, U., Benedet, J. L., Creasman, W. T., Ngan, H. Y., Pecorelli, S. (2003). "Carcinoma of the ovary. ." *Int J Gynaecol Obstet* 83(1): 135-166.
 59. Henkels, K. M., Turchi, J. J. (1997). "Induction of apoptosis in cisplatin-sensitive and –resistant human ovarian cancer cell lines." *Cancer Research* 57: 4488-4492.
 60. Hirsh-Yechezkel, G., Chetrit, A., Lubin, F., et al. (2003). "Population attributes affecting the prevalence of BRCA mutation carriers in epithelial ovarian cancer cases in Israel." *Gynecologic Oncology* 89: 494-498.
 61. Hoffman, R. M. (1991). "In vitro sensitivity assays in cancer – a review, analysis and prognosis." *Journal of Clin Labor Analysis* 5: 133-143.
 62. Holloway, R. W., Mehta, R. S., et al. (2002). "Association between in vitro platinum resistance in the EDR assay and clinical outcomes for ovarian cancer patients." *Gynecologic Oncology* 87: 8-16.
 63. Hovatta, O., Silye, R., Krausz, T., Abir, R., Margara, R., Trew, G., et al. (1996). "Cryopreservation of human ovarian tissue using dimethylsulphoxide and propanediol–sucrose as cryoprotectants." *Hum Reprod.* 11: 1268–1272.
 64. Huinink, W. B., Gore, M., Carmichael, J., Gordon et al. (1997). "Topotecan versus paclitaxel for the treatment of recurrent epithelial ovarian cancer." *J. Clin. Oncol.* 15: 2183-2193.
 65. Hwang, W. S., Chen, L. M., Huang, S. H., Wang, C. C., Tseng, M. T. (1993). "Prediction of chemotherapy response in human leukemia using in vitro chemosensitivity test." *Leuk Res* 17: 685–688.

66. Cheng, J. Q., Jiang, X., Fraser, M., Li, M., Dan, H. C., Sun, M., Tsang, B. K. (2002). "Role of X-linked inhibitor of apoptosis protein in chemoresistance in ovarian cancer: possible involvement of the phosphoinositide-3 kinase/Akt pathway." *Drug Resist Updat.* 5: 131–146.
67. Chobanian, N., Dietrich, C. S. (2008). "Ovarian cancer." *Surg. Clin. North Am.* 88(2): 285–299.
68. Chumchalová, J., Dušek, L., Kovařík, J. (2000). "Analýza chemosenzitivity buněčných linií maligního původu a primokultur lidského maligního melanomu na panel protinádorových chemoterapeutik." *Klinická onkologie, zvl. číslo 2*: 49-54.
69. Chumchalová, J., Kovařík, J. (2000). "Metodiky testování chemosenzitivity/chemorezistence nádorů in vitro." *Klinická onkologie* 13: 18-21.
70. Ischida, S., Lee, J., Thiele, D. J. et al. (2002). "Uptake of anticancer drug cisplatin mediated by the copper transporter Ctr1 in yeast and mammals." *Proc Natl Acad Sci USA* 99: 14298-14302.
71. Jain, R. K. (2001). "Delivery of molecular and cellular medicine to solid tumors." *Adv. Drug Deliv. Rev.* 46: 149-168.
72. Johnson, D. G., Walker, C. L. (1999). "Cyclins and cell cycle checkpoints." *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.* 39: 295-312.
73. Johnstone, R. W., Ruefli, A. A., Lowe, S. W. et al. (2002). "Apoptosis: a link between cancer genetics and chemotherapy." *Cell* 108: 153.
74. Jones, N. A., Turner, J., McIlwrath, A. J. et al. (1998). "Cisplatin- and Paclitaxel-Induced Apoptosis of Ovarian Carcinoma Cells and the Relationship between Bax and Bak Up-Regulation and the Functional Status of p53." *Molecular Pharmacology* 53(5): 819-826.
75. Kalábová, R. (2005). "Docetaxel - the use in the treatment of advanced and relapsing ovarian cancer." *Gynekolog* 1: 6-8.
76. Karlan, B. Y., Boyd, J., Strong, L., et al. (2003). "Discussion: Hereditary Ovarian Cancer." *Gynecologic Oncology* 88: 11-13.

77. Karlíková, M., Klečka, J., Kučera, R., Kuntscherová, J., Ňaršanská, A., Pešta, M., Presl, J., Roušarová, M., editor Marie Karlíková (2012). "Biomarkery u karcinomů prsu, ovarií a prostaty." ISBN 978-80-263-0318-3.
78. Kelland, L. (2007). "The resurgence of platinum-based cancer chemotherapy." *Nat Rev Cancer* 7: 573-584.
79. Kelman, Z., O'Donnell, M. (1995). "Structural and functional similarities of prokaryotic and eukaryotic DNA polymerase sliding clamps." *Nucleic Acids Res.* 23: 3613-3620.
80. Kostečka, A., Vagundová, M. (2003). "Prediktivní testy chemorezistence in vitro." *Souhrnná roční zpráva o řešení výzk. záměru MOÚ v Brně:* 36-38.
81. Kudelka, A. P., Tresukosol, D., Edwards, C. L. et al. (1996). "Phase II study of intravenous topotecan as a 5-day infusion for refractory epithelial ovarian carcinoma." *J Clin Oncol* 14: 1552-1557.
82. Lage, H., Helmbach, H., Dietel, M., Schadendorf, D. (2000). "Modulation of DNA topoisomerase II activity and expression in melanoma cells with acquired drug resistance." *Br J Cancer* 82: 488-491.
83. Langdon, S. P. (2004). "Cancer Cell Culture Methods and Protocols." Humana Press, Totowa, New Jersey: 360.
84. Li, J., Feng, Q., Kim, J. M., Schneiderman, D., Liston, P., Li, M., Vanderhyden, B., Faught, W., Fung, M. F., Senterman, M., Korneluk, R. G., Tsang, B. K. (2001). "Human ovarian cancer and cisplatin resistance: possible role of inhibitor of apoptosis proteins." *Endocrinology* 142: 370-380.
85. Lichý, J. H., Dalbergue, F., Washington, C., et al. (2000). "Genetic heterogeneity in ductal carcinoma of the breast." *Lab Invest* 80: 291-301.
86. Ling, V., Thompson, L. H. (1974). "Reduced permeability in CHO cells as a mechanism of resistance to colchicine." *J Cell Physiol* 83: 103-116.
87. Loizzi, V., Chan, J. K., Osann, K., Cappuccini, F., DiSaia, P. J., Berman M. L. (2003). "Survival outcomes in patients with recurrent ovarian cancer who were treated with chemoresistance assay-guided chemotherapy." *Am J Obstet Gynecol* 189: 1301-1307.
88. Lorusso, D., Pietragalla, A., Mainenti, S., Masciullo, V., Di Vagno, G.,

- Scambia, G. (2010). "Review role of topotecan in gynaecological cancers: Current indications and perspectives." *Crit Rev Oncol Hematol*. 74(3): 163-174.
89. Lowe, S. W., Ruley, H. E., Jacks, T. et al. (1993). "p-53 dependent apoptosis modulates the cytotoxicity of anticancer agents." *Cell* 74: 957-967.
90. Ludwig, T., Oberleithner, H. (2004a). "Platinum complex toxicity in cultured renal epithelia." *Cell Physiol Biochem* 14: 431-440.
91. Ludwig, T., Riethmüller, Ch., Gekle, M. et al. (2004b). "Nephrotoxicity of platinum complexes is related to basolateral organic cation transport." *Kidney International* 66: 196–202.
92. Markman, M. (2008). "Pharmaceutical management of ovarian cancer: current status." *Drug* 68: 771–789.
93. Markman, M., Rothman, R., Hakes, T. et al. (1991). "Second-line platinum therapy in patients with ovarian cancer previously treated with cisplatin." *J Clin Oncol* 9: 389-393.
94. Massaro, E. J., Elstein, K. H., Zucker, R. M., Bair, K. W. (1989). "Limitations of the fluorescent probe viability assay." *Mol Toxicol* 2: 271–284.
95. Meyer, U. A. (2000). " Pharmacogenetics and adverse drug reactions." *Lancet* 356: 1667-1671.
96. Michalová, E., Poprach, A., Němečková, I., et al. (2008). "Predikce citlivosti nádorových buněk k chemoterapeutikům ex vivo – úskalí a limitace vlastní metody." *Klinická onkologie* 21: 93 – 97.
97. Modugno, F. (2003). "Ovarian cancer and high-risk woman - implications for prevention, screening, and early detection." *Gynecol Oncol*, 91: 15-31.
98. Möllgård, L., Prenkert, M., Smolowicz, A., Paul, C., Tidefelt, U. (2003). "In vitro chemosensitivity testing of selected myeloid cells in acute myeloid leukemia." *Leuk Lymphoma* 44: 783–789.
99. Morin, P. J. (2003). "Drug resistance and the microenvironment." *Drug Resist Updat* 6: 169.
100. Mosmann, T. (1983). "Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays." *J Immunol*

Methods 65: 55–63.

101. Nový, F. (2012). "Antiangiogenní léčba ovariálního karcinomu." *Onkologie* 6(2): 68-70.
102. Overstrom, E. W., Paqui-Platls, D., Toner, M., Cravacho, E. G. (1990). "Cryoprotectant and thermal effects on cryoskeletal organization and IVF rate of mouse oocytes." *Biol Reprod.* 42: 175.
103. Ozols, R. F. (2003). "Progress in ovarian cancer: an overview and perspective." *EJC Supplements* 1: 4355.
104. Pavlik, E. J., Flanigan, R. C., Vannagell, J., Hanson, M. B., Donaldson, E. S. et al. (1985). "Esterase-activity, exclusion of propidium iodide, and proliferation in tumor-cells exposed to anticancer agents – phenomena relevant to chemosensitivity determinations." *Cancer Investigation* 3: 413-426.
105. Perren, T. J. et al. (2011). "A phase 3 trial of bevacizumab in ovarian cancer." *N Engl J Med.* 365(26): 2484-2496.
106. Peterson, G. L. (1979). "Review of the Folin phenol protein quantitation method of Lowry, Rosebrough, Farr and Randall." *Anal Biochem* 100: 201-220.
107. Pieters, R., Huismans, D. R., Leyva, A., Veerman, A. J. (1988). "Adaptation of the rapid automated tetrazolium dye based (MTT) assay for chemosensitivity testing in childhood leukemia." *Cancer Lett* 41: 323–332.
108. Pieters, R., Loonen, A. H., Huismans, D. R., Broekema, G. J., Dirven, M. W., Heyenbrok, M. W., Hählen, K., Veerman, A. J. (1990). "In vitro drug sensitivity of cells from children with leukemia using the MTT assay with improved culture conditions." *Blood* 76: 2327–2336.
109. Pluen, A. et al. (2001). "Role of tumor-host interactions in interstitial diffusion of macromolecules: cranial vs subcutaneous tumors." *Proc. Natl Acad. Sci. USA* 98: 4628-4633.
110. Plunkett, W., Huang, P., Xu, Y. Z. et al. (1995). "Gemcitabine: metabolism, mechanisms of action, and self-potential." *Semin Oncol.* 22(4, suppl. 11): 3-10.
111. Pujade-Lauraine, E., Wagner, U., Aavallundquist, E., et al. (2010). "Pegylated liposomal doxorubicin and carboplatin compared with paclitaxel and

- carboplatin for patients with platinum-sensitive ovarian cancer in late relapse." *J Clin Oncol* 28: 3323–3329.
112. Rabik, C. A., Dolan, M. E. (2007). "Molecular mechanisms of resistance and toxicity associated with platinating agents." *Cancer Treat Rev.* 33(1): 9-23.
 113. Roche (2005). "Technical guide to cell proliferation and apoptosis methods." Roche Diagnostics Corporation (Roche)(3rd edition): 58-78.
 114. Roztočil, A. a kol. (2011). "Moderní gynekologie." Grada Publishing, a.s.: 351-353.
 115. Saitou, M., Isonishi, S., Hamada, T. et al. (2009). "Mitochondrial ultrastructure-associated chemotherapy response in ovarian cancer." *Oncology Reports* 21: 199-204.
 116. Sargent, J. M. (2003). "The use of the MTT assay to study drug resistance in fresh tumour samples." *Recent Results Cancer Res.* 161: 13–25.
 117. Sedlakova, I., Brigulova, K., Tosner, J., Cervinka, M. (2012). "Drug Resistance and Sensitivity in Ovarian Cancer." *Horizons in Cancer Research* 47: 287-303. ISBN 978-1-61470-444-7.
 118. Sedláková, I., Laco, J., Tošner, J., Caltová, K., Červinka, M., Řezáč, A., Špaček, J., Škapinec, P. (2012). "Proteins of resistance and drug resistance in ovarian carcinoma patients." *Klin Onkol.* 25(6): 457-463.
 119. Sedláková, I., Tošner, J., Červinka, M., Brigulová, K., Řezáč, A., Škapinec, P., Špaček, J., Laco, J. (2011a). "Chemorezistence/chemosenzitivita in vitro u pacientek s karcinomem ovaria." *Gynekolog* 2: 50-57.
 120. Sedláková, I., Tošner, J., Červinka, M., Brigulová, K., Řezáč, A., Špaček, J., Laco, J., Škapinec, P. (2011b). "Primary drug resistance/senzitivity in vitro and clinical outcome in ovarian cancer patients." *Česká Gynekol.* 76(3): 184-189.
 121. Sedláková, I., Tošner, J., Řezáč, A., Červinka, M., Brigulová, K., Špaček, J., Tomšová, M., Škapinec, P. (2010). "Rezistence/senzitivita in vitro u pacientek s karcinomem ovaria." *Čes. Gynek.* 75: 186-191.
 122. Servidei, T., Ferlini, C., Riccardi, A., Meo, D., Scambia, G., Segni, G., Manzotti, C., Riccardi, R. (2001). "The novel trinuclear platinum complex BBR3464 induces a cellular response different from cisplatin." *Eur J Cancer*

- 37: 930–938.
123. Shaw, J. M., Oranratnachai, A., Trounson, A. O. (2000). "Fundamental cryobiology of mammalian oocytes and ovarian tissue." *Theriogenology* 53: 59–72.
 124. Shivji, K. K., Kenny, M. K., Wood, R. D. (1992). "Proliferating cell nuclear antigen is required for DNA excision repair." *Cell* 69(2): 367–374.
 125. Schlag, P., Flentje, D. (1984). "Chemosensitivity testing of human neoplasm using the soft agar colony assay." *Cancer Treat Reviews* 11: 131-137.
 126. Schneiderman, D., Kim, J. M., Senterman, M., Tsang, B. K. (1999). "Sustained suppression of Fas ligand expression in cisplatin-resistant human ovarian surface epithelial cancer cells." *Apoptosis* 4: 271–282.
 127. Slee, E. A., Adrain, C., Martin, S. J. (2001). "Executioner caspase-3, -6, and -7 perform distinct, non-redundant roles during the demolition phase of apoptosis." *J Biol Chem* 276: 7320–7326.
 128. Song, I. S., et al. (2004). "Role of human copper transporter Ctr1 in the transport of platinum-based antitumor agents in cisplatin-sensitive and cisplatin-resistant cells." *Mol Cancer Ther* 3(12): 1543-1549.
 129. Staker, B. L., Hjerrild, K., Feese, M. D. et al. (2002). "The mechanism of topoisomerase I poisoning by a camptothecin analog." *PNAS* 99(24): 15387–15392.
 130. Swisher, E. M., Mutch, D. G., Rader, J. S. et al. (1997). "Topotecan in platinum- and paclitaxel-resistant ovarian cancer." *Gynecol Oncol* 66: 480-486.
 131. Symonds, H., Krall, L., Remington, L. et al. (1994). "p-53 dependent apoptosis suppresses tumor growth and progression in vivo." *Cell* 78: 703-711.
 132. Talač, R., Žaloudík, J., Hajdúch, M., et al. (2000). "Hodnocení lékové rezistence in vitro a její klinické implikace." *Klinická onkologie* 13: 2-3.
 133. Taylor, C. G., Sargent, J. M., Elgie, A. W., Williamson, C. J., Lewandowicz, G. M., Chappatte, O., Hill, J. G. (2001). "Chemosensitivity testing predicts survival in ovarian cancer." *Eur J Gynaecol Oncol* 22: 278–282.
 134. Tošner, J., Sedláková, I., Červinka, M., Řezáč, A., Špaček, J., Tomšová, M.,

- Čermáková, E., Kacerovský, M. (2009). "Influence of cytostatic agents on ovarian cancer cells obtained from tumour and ascites." *Journal of gynecologists –“ Gynekolog”* 1: 8-13.
135. Trad, F. S., Toner, M., Biggers, J. D. (1999). "Effects of cryoprotectants and ice-seeding temperature on intracellular freezing and survival of human oocytes." *Hum Reprod.* 14: 1569–1577.
136. Urban, N. (2003). "Specific Keynote: Ovarian Cancer Risk Assessment and the Potential for Early Detection." *Gynecol Oncol.* 88: 75-79.
137. Vaita, G., Holm, P., Kuwayama, M., Greve, T., Callesen, H. (1998). "A new way to avoid cryoinjuries of mammalian ova and embryos: the OPS vitrification." *Mol Reprod Dev.* 51: 53–58.
138. Vasey, P. A., Jayson, G. C., Gordon, A., Gabra, H., Coleman, R., Atkinson, R., Parkin, D., Paul, J., Hay, A., Kaye, S. B. (2004). "Phase III randomised trial of docetaxel-carboplatin versus paclitaxel-carboplatin as first-line chemotherapy for ovarian carcinoma." *J Natl Cancer Inst* 96: 1682-1691.
139. Veerman, A. J., Pieters, R. (1990). "Drug sensitivity assays in leukaemia and lymphoma." *Br J Haematol* 74: 381–384.
140. Vigo, E., Müller, H., Prosperini, E. et al. (1999). "CDC25A phosphatase is a target of E2F and is required for efficient E2F-induced S phase." *Mol Cell Biol* 19(9): 6379-6395.
141. Vikhanskayaa, F., Vignatia, S., Beccagliaa, P. et al. (1998). "Inactivation of p53 in a Human Ovarian Cancer Cell Line Increases the Sensitivity to Paclitaxel by Inducing G2/M Arrest and Apoptosis." *Experimental Cell Research* 241(1): 96-101.
142. Zander, S. A. L., Sol, W., Greenberger, L., Zhang, Y., van Tellingen, O. et al. (2012). "EZN-2208 (PEG-SN38) Overcomes ABCG2-Mediated Topotecan Resistance in BRCA1-Deficient Mouse Mammary Tumors." *PLoS ONE* 7(9).
143. Zubor, P., Kajo, K., Stanclova, A., Szunyogh, N., Galo, S., Dussan, C. A., Minarik, G., Visnovsky, J., Danko, J. (2008). "Human epithelial growth factor receptor 2[Ile655Val] polymorphism and risk of breast fibroadenoma." *Eur J Cancer Prev* 17: 33–38.