

**Univerzita Karlova v Praze
Lékařská fakulta v Hradci Králové**



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

Kateřina Caltová

Autoreferát disertační práce

Doktorský studijní program Lékařská biologie

Hradec Králové

2013

Disertační práce byla vypracovaná v rámci kombinovaného studia doktorského studijního programu Lékařská biologie na Ústavu lékařské biologie a genetiky Lékařské fakulty UK v Hradci Králové.

Autor: Mgr. Kateřina Caltová
Ústav lékařské biologie a genetiky Lékařské fakulty UK v Hradci
Králové

Školitel: prof. MUDr. RNDr. Miroslav Červinka, CSc.
Ústav lékařské biologie a genetiky Lékařské fakulty UK v Hradci
Králové

Oponenti: prof. RNDr. Jiřina Hofmanová, CSc.
Biofyzikální ústav Akademie věd ČR v Brně

doc. MUDr. Jaroslav Vaňásek, CSc.
Oddělení klinické a radiační onkologie Pardubické krajské nemocnice

Obhajoba se koná před Komisí pro obhajoby disertačních prací v doktorském studijním programu Lékařská biologie dne 11. prosince 2013 v 11 hodin v zasedací místnosti děkanátu Lékařské fakulty UK v Hradci Králové.

Tato práce vznikla za podpory grantů IGA MZ NR/8768-3 a NS/9737-3.

S disertační prací je možno se seznámit na studijním oddělení děkanátu Lékařské fakulty v Hradci Králové, Univerzity Karlovy v Praze, Šimkova 870, 500 38 Hradec Králové (tel. 495 816 131).

Prof. MUDr. RNDr. Miroslav Červinka, CSc.

Předseda komise pro obhajoby disertačních prací
v doktorském studijním programu Lékařská biologie

OBSAH

SOUHRN	4
SUMMARY	5
1. ÚVOD	6
2. CÍLE PRÁCE	9
2.1 Testování chemosenzitivity u buněk izolovaných ze vzorků lidských ovariálních karcinomů v podmínkách in vitro	9
2.2 Testování chemosenzitivity in vitro na modelovém systému lidské ovariální nádorové buněčné linie A2780.....	9
3. MATERIÁL A METODIKA	10
Soubor klinických vzorků	10
Izolace buněk ze solidního nádoru.....	10
Izolace buněk z ascitu	10
Ovlivnění buněk.....	11
MTT test.....	11
Hodnocení reaktivity buněk.....	11
Zamrazení buněk izolovaných z EOC.....	12
Rozmrazení buněk izolovaných z EOC	12
Buněčná linie A2780 a její kultivace	13
WST-1 a stanovení celkového množství proteinů v buňkách (barvení Coomassie Brilliant Blue) ..	13
Dynamické měření buněčné proliferace pomocí systému xCELLigence	13
Morfologická studie – fotodokumentace	14
Analýza buněčného cyklu – barvení propidium jodidem.....	14
Detekce proteinů Western blotem	14
Kinetické měření aktivity kaspázy 3	15
Imunofluorescenční detekce kaspázy 3.....	15
Statistické vyhodnocení	16
4. VÝSLEDKY	17
Reaktivita klinických vzorků	17
Porovnání reaktivity čerstvě izolovaných a rozmrazených vzorků solidních nádorů a ascitů	17
Porovnání reaktivity solidního nádoru a ascitu téže pacientky	17
Porovnání reaktivity vzorku téže pacientky v čase	18
MTT	18
WST-1	18
Dynamické měření buněčné proliferace pomocí systému xCELLigence	18
Morfologická studie – fotodokumentace	19
Analýza buněčného cyklu – barvení propidium jodidem.....	19
Detekce proliferčních markerů Western blotem.....	19
Detekce apoptických markerůWestern blotem.....	20
Kinetické měření aktivity kaspázy 3	20
Imunofluorescenční detekce kaspázy 3.....	20
5. DISKUSE	21
6. ZÁVĚRY	28
6.1 Klinické vzorky.....	28
6.2 Buněčná linie A2780.....	28
7. POUŽITÁ LITERATURA	29
8. PŘEHLED PUBLIKAČNÍ ČINNOSTI AUTORA.....	34

SOUHRN

Ovariální karcinom představuje pátou nejčastější malignitu a je také nejčastější příčinou úmrtí mezi gynekologickými malignitami v populaci českých žen. Nejaktuálnější data Národního onkologického registru ČR uvádí incidenci 20,64 a mortalitu 12,58 na 100 000 žen (poslední data z roku 2010). Velký problém představuje pozdní diagnóza, kdy jsou onemocnění velmi často odhalena až v pozdních klinických stádiích a s tím pak souvisí i vysoká mortalita. Limitujícím faktorem onemocnění je jeho vysoká heterogenita, často se rozvíjející rezistence na podávanou cytostatickou léčbu a nedostatečná individualizace léčby.

Ve spolupráci s Porodnickou a gynekologickou klinikou Fakultní nemocnice v Hradci Králové jsme testovali vzorky solidních nádorů a ascitů pacientek s ovariálním karcinomem za účelem predikce odpovědi na cytostatickou léčbu v podmínkách *in vitro*. Testovaný byl panel šesti cytostatik (cisplatina, paklitaxel, karboplatina, gemcitabin, topotekan, etoposid), který zahrnoval také cytostatika používaná v primární léčbě ovariálního karcinomu. Použili jsme také modelový systém buněčné linie A2780 k porovnání efektivity testovaných cytostatik.

Výsledky práce zahrnují zjištění, že nejvyšší vnímavost vykazují buňky, izolované z klinických vzorků ovariálních karcinomů a ascitů pacientek s ovariálním karcinomem, na topotekan a cisplatinu. Na karboplatinu byla nejčastěji zjištěna rezistence a na paklitaxel jen hraniční vnímavost. Přitom standardní schéma primární terapie ovariálního karcinomu zahrnuje právě podávání platinového derivátu, karboplatiny nebo cisplatinu, v kombinaci s paklitaxelem.

Modelová buněčná linie A2780 byla k testovaným cytostatikům citlivější. Testovaná cytostatika inhibovala proliferaci a indukovala buněčnou smrt v závislosti na jejich koncentraci a době působení. Použitými metodami jsme dospěli k závěru, že nejúčinnějším cytostatikem inhibujícím proliferaci buněk linie A2780 je topotekan.

SUMMARY

Ovarian cancer is the fifth most common cancer and the most frequent cause of the death among gynaecological cancers in population of Czech women. The latest data from the National oncological register of Czech Republic show the incidence 20,64 and mortality 12,58 in 100 000 women (2010). A serious problem is represented by a late diagnosis of cancer, when the disease is diagnosed in the late stadium and finally this causes high mortality from this kind of cancer. Most complicated factors include high heterogeneity of the disease, frequent appearance of resistance to cytostatics and low individualization of chemotherapy.

In cooperation with a Clinic of gynaecology and obstetrics, Faculty hospital in Hradec Kralove, we have tested solid tumors and ascites samples of patients with ovarian cancer diagnosis to predict answers to chemotherapy within *in vitro* conditions. A panel of six cytostatics (cisplatin, paclitaxel, carboplatin, gemcitabine, topotecan, etoposide), which are also used in primary chemotherapy of ovarian cancer, has been tested. We have also used a model system, a human ovarian cancer cell line A2780, to compare the reactivity to tested cytostatics.

Our results show the highest sensitivity of cells isolated from clinical samples of solid tumors and ascitic fluid to topotecan and cisplatin. Most frequently there has been discovered a resistance to carboplatin whereas only a marginal reactivity to paclitaxel has been revealed. But in fact a standard scheme of primary chemotherapy of ovarian cancer includes just administration of platinum derivative, carboplatin or cisplatin, in a combination with paclitaxel.

A model human ovarian cancer cell line A2780 has showed a higher sensitivity to tested cytostatics. These cytostatics inhibited proliferation and induced a cell death depending on their concentration and time of action. The most effective cytostatic was evaluated topotecan.

1. ÚVOD

Ovariální karcinom představuje pátou nejčastější malignitu a je také nejčastější příčinou úmrtí mezi gynekologickými malignitami v populaci českých žen. Incidence tohoto onemocnění není zanedbatelná, každý rok je diagnostikováno asi 1200 nových případů onemocnění a 700 žen v jeho důsledku zemře [1]. Všeobecné životní riziko vzniku ovariálního karcinomu 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.

Velký problém tak představuje pozdní diagnóza, kdy jsou onemocnění velmi často odhalena až v pozdních klinických stádiích 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.

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 diagnostikovaných až v pokročilých stádiích (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 % [2, 3].

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 neepiteliálních asi 33 let. Incidence tohoto onemocnění roste s věkem [4]. Ovariální tumory lze rozlišit na benigní, maligní či hraniční (borderline). Jasně ovariální prekancerózy nejsou definované.

Patogeneze ovariálního karcinomu není jednoznačně objasněná. Celých 90 % ovariálních karcinomů představuje sporadická forma onemocnění, 5-10 % pak připadá na formu hereditární spojenou s mutacemi BRCA 1 a BRCA 2 genů. 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 mezodermy gonád (gonadostromální nádory), nádory ze zárodečných buněk, ostatní a sekundární nádory ovarií, které metastazují [4]. Nádory z povrchového epitelu, tj. epitelální ovariální karcinomy (EOC), jsou nejčastější, tvoří více

než 85 % všech diagnostikovaných nádorů ovaria [5].

Vyskytují se mutace dvou skupin klíčových genů – tumor-supresorových genů a protoonkogenů. Mutace tumor-supresorového genu kódujícího protein p53 je u ovariálního karcinomu přítomná přibližně ve 30 %, jiná studie uvádí více než v 50 % nádorů [6, 7]. Nadměrná exprese proteinu p53 byla pozorovaná u 50 % ovariálních nádorů a abnormality p53 bývají přítomné i v inkluzních cystách přilehlých k invazivnímu nádoru [6, 7]. Zdá se, že mutace p53 se objevuje později v průběhu progresu nádoru a je mnohem častější u pozdních stádií ovariálního karcinomu [7, 8]. 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 [7]. A jako onkogeny účastníci se patogeneze ovariálního karcinomu a zároveň možné důležité cíle budoucí molekulární terapie byly identifikované geny RAS, AKT2, C-MYC, HER2/Neu(erb2), PIK3CA a synuklein [6, 8].

Primární terapie ovariálního karcinomu zahrnuje chirurgický zákrok a následnou chemoterapii. Výjimečně se aplikuje i radioterapie [9]. Velikost pooperačního rezidua ovlivňuje dobu přežití pacientek. Čím je nádorové residuum větší, tím je také vyšší riziko recidivy onemocnění a zkrácení doby přežití pacientky. Kombinace paklitaxelu a karboplatiny aplikovaná v 21 denních intervalech v šesti sériích je v současné době standardem pro zahájení chemoterapie u tohoto onemocnění [10]. Ovariální karcinom je klasifikovaný jako chemosenzitivní, ale ne chemokurabilní nádor. Literatura uvádí úspěšnost primární léčby mezi 60 - 80% [11]. Střední doba do progresu onemocnění se pohybuje mezi 16-22 měsíci. Až 85 % pacientek, zejména těch diagnostikovaných s pokročilým nádorem ovaria, v průběhu jednoho až dvou let recidivuje [12]. 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 [5].

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 [13]. Protože je každý nádor pacienta genotypově a fenotypově odlišný [14, 15], 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 [16, 17, 18, 19]. Všechny 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.

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 [20].

V naší práci jsme hodnotili rezistenci/senzitivitu souboru klinických vzorků ovariálních karcinomů pomocí MTT testu. Metoda byla zavedena roku 1953 Blackem a Speerem [21] a Mosmann ji v roce 1983 představil v její poloautomatické formě [22]. MTT test je definovaný jako rychlý, spolehlivý a objektivní, vhodný pro rozsáhlé hodnocení lékové rezistence u leukemií a lymfomů [23]. Později byl upravený na hodnocení lékové rezistence lidských leukemických buněk a buněk jiných typů nádorů [24, 25, 26, 27].

Účinnost testovaných cytostatik jsme hodnotili několika metodami také na modelové buněčné linii A2780 lidského ovariálního karcinomu. Soubor testovaných cytostatik zahrnoval cisplatinu, paklitaxel, karboplatinu, gemcitabin, topotekan a etoposid.

2. CÍLE PRÁCE

V práci jsme si stanovili následující cíle:

2.1 Testování chemosenzitivity u buněk izolovaných ze vzorků lidských ovariálních karcinomů v podmínkách in vitro

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)?

2.2 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 testovanými cytostatiky a srovnání její reaktivity s reaktivitou klinických vzorků.

3. MATERIÁL A METODIKA

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 vedená 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.

Izolace buněk ze solidního nádoru

Vzorek tkáně se mechanicky desintegroval a izolované buňky oddělily od erytrocytů a mrtvých buněk na hustotním gradientu (Ficoll 400, Telebrix 35, destilovaná voda, hustota gradientu 1,077 kg/l) centrifugací (30 min, 2200 rpm, 20 °C). Na rozhraní mezi gradientem a médiem se hromadily živé buňky v podobě prstence. Buňky se sesbíraly do nové zkumavky Pasteurovou pipetou, promyly promývacím médiem a centrifugovaly (5 min, 1600 rpm, 20 °C). Pokud po stočení peleta obsahovala erytrocyty, bylo potřeba je lyzovat (5 ml destilované vody max. 30 s, lýza se zastavila 0,5 ml 10x koncentrovaného roztoku PBS bez iontů). Pelety z jednotlivých zkumavek se nakonec sesbíraly do jedné, promyly promývacím médiem a naposledy centrifugovaly (5 min, 1200 rpm, 20 °C). Po naředění kultivačním médiem byly buňky připravené k testování.

Izolace buněk z ascitu

Ascites se přelil do 50 ml falkonek a centrifugoval (10 min, 1500 rpm, 20 °C). Buňky z ascitu se izolovaly jednoduchou centrifugací. Pokud pelety obsahovaly erytrocyty, bylo třeba je lyzovat (9 ml destilované vody max. 30 s, lýza se zastavila 1 ml 10x koncentrovaného roztoku PBS bez iontů). Pelety z jednotlivých zkumavek se nakonec sesbíraly do jedné, promyly promývacím médiem a centrifugovaly (10 min, 1500 rpm, 20 °C). Po naředění kultivačním médiem byly buňky připravené k testování.

Ovlivnění buněk

Koncentrace buněk se upravila 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. Každé cytostatikum bylo testované v dubletu. 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. 1). Buňky se kultivovaly 72 h v inkubátoru při 37 °C a atmosféře 5% CO₂.

Tab. 1 Koncentrační řady testovaných cytostatik

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
c₄	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

MTT test

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

Hodnocení reaktivity buněk

Spektrofotometrické měření absorbance a výpočet hodnoty EC₅₀ pro každé cytostatikum byly základem pro hodnocení reaktivity klinického vzorku. Podle hodnoty EC₅₀ spadající do jednoho z intervalů (Tab. 2) 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 koncentraci léčiva, označují se jako rezistentní [28].

Tab. 2 Hodnocení reaktivity klinických vzorků podle hodnot EC50

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

Zamrazení buněk izolovaných z EOC

Izolované buňky se naředily kultivačním médiem a centrifugovaly v předchlazené centrifuze (5 min, 500 rpm, 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 než byly buňky opět testované na MTT.

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.

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 + 2mM glutamin + 10% fetální bovinní sérum (FBS). Pasážovaly se 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*.

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

Pro stanovení metabolické aktivity buněk linie A2780 byl použitý kit Cell proliferation reagent WST-1 (Boehringer Mannheim-Roche) a celkové množství proteinů bylo stanovené postupem podle Bradfordové. Po skončení inkubačního intervalu 72 h se buňky v mikrotitračních destičkách 2x opláchly PBS a do jamek se přidalo po 100 µl WST-1 v médiu (0,3 mg/ml). Absorbance se měřila při 450 nm proti 650 nm. Poté se destičky inkubovaly v termostatu a po 2 h se provedlo další měření. Po skončení měření se destičky opláchly PBS a fixovaly roztokem metanolu. Následně se buňky barvily roztokem Coomassie Brilliant Blue (0,4 mg/ml) 1 h. Poté se znovu oplachovaly (85 % H₂O, 10 % absolutní etanol, 5 % ledová kyselina octová). Navázané barvivo se rozpouštělo přidáním 100 µl 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).

Dynamické měření buněčné proliferace pomocí systému xCELLigence

Speciální xCELLigence E-destičky se plnily 100 µl RPMI na jamku a determinoval se signál pozadí. Poté se do každé jamky přidalo po 100 µl buněčné suspenze o koncentraci 25 000 buněk/jamku. Buňky se nechaly 30 min adherovat na dna jamek při lab. 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. 1) a sledoval se buněčný index po dobu dalších 72 h. Po uplynutí inkubační doby RTCA software přístroje vypočetl hodnoty EC₅₀ pro každé testované cytostatikum.

Morfologická studie – fotodokumentace

V časových intervalech 0 h – 24 h – 48 h – 72 h byla vybraná zorná pole kontrolních a ovlivněných buněk fotografována za použití Olympus IX70 mikroskopu a JVC barevné videokamery (Victor Company of Japan) při zvětšení 400x.

Analýza buněčného cyklu – barvení propidium jodidem

Kontrolní a ovlivněné buňky v časových intervalech 3 h – 6 h – 12 h – 24 h se seškrabaly ze dna pasážovacích lahví a přenesly do centrifugačních zkumavek, centrifugovaly (10 min, 1000 rpm, 4 °C) a supernatant se slil. Bylo přidáno 10 ml PBS a znovu se centrifugovalo, supernatant se slil a peleta rozklepala. Za mírného vortexování se přikapávaly 2 ml ledově vychlazeného 70 % etanolu. Vzorky se nechaly přes noc fixovat v lednici. Další den se zkumavky centrifugovaly (10 min, 2000 rpm, 4 °C). Supernatant se slil a peleta dobře rozklepala. Obsah zkumavek se oplachoval 10 ml PBS a centrifugoval. 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 Na₂HPO₄, 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 CO₂ 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.

Detekce proteinů Western blotem

Vzorky naředěné 3xSDS vzorkovým pufrům (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 µg/ml spolu s 5 µl markeru molekulových hmotností (Precision Plus ProteinTM Dual Color Standard, Bio-Rad) na 15 % polyakrylamidový gel. Elektroforéza probíhala v pufrůvacím roztoku (25 mM TRIS-HCl pH 8,3, 960 mM glycin, 0,1 % SDS) při 200 V a 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 100 V a 250 mA 60 min. Po ukončení blotování se membrány promyly v destilované vodě a sušily pro následnou imunodetekci. 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 (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. Výsledky byly získané pomocí chemiluminiscenčního detekčního kitu.

Kinetické měření aktivity kaspázy 3

Aktivita kaspázy 3 se měřila v 96ti-jamkových mikrotitračních destičkách za použití kinetické fluorimetrické assay, která je založena 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 detekována. N-acetyl-L- α -aspartyl-L- α -glutamyl-N-(2-karboxyl-1-formylethyl)-L-valinamid, Ac-DEVD-CHO, specifický inhibitor kaspázy 3, byl použitý k potvrzení specifity štěpení kaspázy 3. Fluorescence byla měřená při 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.

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 (37 °C, 5 % CO₂). Poté byly buňky ovlivněné cytostatiky a kultivované ve 24 h – 48 h – 72 h intervalech. Následně se komůrky centrifugovaly (5 min, 500 rpm, 4°C). Buňky se fixovaly čerstvým roztokem 2% paraformaldehydu 20 min, poté se třikrát oplachovaly PBS bez iontů, permeabilizovaly roztokem TRITON-X 3-5 min a následně opět proplachovaly třikrát PBS bez iontů. Následovala blokace buněk v blokačním roztoku (0,5 g sušeného mléka v 10 ml PBS-T; T = Tween 20) 1 h 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 (10 µg/ml) pro barvení jader. Inkubace probíhala 45 min při laboratorní teplotě. Poté se buňky opět oplachovaly. 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., ČR).

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).

4. VÝSLEDKY

Reaktivita klinických vzorků

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

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 84,5 % a cisplatinu 82,0 % vzorků. Naopak nejvyšší rezistence byla zjištěná na etoposid 76,8 %, gemcitabin 61,7 % a vysoká byla rezistence také u karboplatiny 44,3 %. Stejně jako u vzorků solidních nádorů, paklitaxel vykazoval nejčastěji jen hraniční vnímavost a to u 50,8 % vzorků.

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. 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.

Porovnání reaktivity solidního nádoru a ascitu téže pacientky

V souboru pacientek se podařilo vybrat 19 párových vzorků, solidních nádorů a ascitů téže 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. Statisticky významný rozdíl v reaktivitě solidních nádorů a ascitů nebyl pozorovaný. Výsledky však mohou být ovlivněné malým počtem dat v souboru.

Porovnání reaktivity vzorku téže pacientky v čase

Ze souboru pacientek s ovariálním karcinomem se podařilo vybrat celkem 10, 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 zahrnuté. Ostatní vykazovaly shodnou reaktivitu u 33 (62,2 %) párových hodnot nebo postupně v čase zvýšenou 9 (17 %) nebo naopak sníženou 11 (20,8 %) reaktivitu.

Následující metodiky byly použité u modelové buněčné linie A2780.

MTT

Metabolická aktivita buněk A2780 po ovlivnění testovanými cytostatiky byla stanovena pomocí MTT testu. Nejvyšší inhibici proliferace vykazovaly buňky linie A2780 po ovlivnění gemcitabinem, paklitaxelem a topotekanem. Byly méně vnímavé k cisplatině a etoposidu a nejnižší byla vnímavost ke karboplatině. Střední inhibiční koncentrace c_4 pro každé z cytostatik byla vybraná pro další testování právě na základě opakovaně shodných výsledků MTT testů. Bylo provedeno devět nezávislých experimentů v různých pasážích linie A2780.

WST-1

Účinek testovaných cytostatik byl stanovený také měřením metabolické aktivity buněk WST-1 testem a měřením celkového obsahu proteinů metodou barvení Coomassie Brilliant Blue. 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.

Dynamické měření buněčné proliferace pomocí systému xCELLigence

Nejvyšší hodnoty EC50 byly získané RTCA softwarem systému xCELLigence pro buňky ovlivněné karboplatinou. Vysoká hodnota EC50 byla zaznamenána také po ovlivnění

cisplatinou a etoposidem, naopak nejnižší byla u paklitaxelu. Výsledky reprezentují hodnoty ze tří nezávislých experimentů.

Morfologická studie – fotodokumentace

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“, tj. 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 u buněk pozorované po ovlivnění karboplatinou.

Analýza buněčného cyklu – barvení propidium jodidem

Vliv testovaných cytostatik na distribuci fází buněčného cyklu byl stanovený pomocí průtokové cytometrie a barvení propidium jodidem v intervalech 3 h – 6 h – 12 h – 24 h. Cisplatinou, karboplatinou a gemcitabinem zvyšovaly podíl buněk v G1/S fázi buněčného cyklu. Topotekanem a etoposidem indukovaly hromadění buněk v S fázi, efekt byl prodloužený u topotekanu. 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.

Detekce proliferačních markerů Western blotem

Cytostatika testovaná ve střední inhibiční koncentraci c_4 ovlivnila expresi proliferačních markerů u modelové linie A2780. Po 24 h intervalu byla exprese Cdc25A proteinové fosfatázy zvýšená po ovlivnění všemi testovanými cytostatiky, nejvyšší hodnoty byly zaznamenány po ovlivnění topotekanem a gemcitabinem. Exprese cyklinu B1 byla zvýšená po ovlivnění všemi testovanými cytostatiky s výjimkou etoposidu. Nejvýznamnější bylo zvýšení po ovlivnění gemcitabinem. Exprese cyklinu D1 byla zvýšená po ovlivnění topotekanem a etoposidem, naopak snižena po ovlivnění paklitaxelem, karboplatinou a hlavně gemcitabinem. Exprese p21 byla zvýšená po ovlivnění topotekanem, etoposidem, paklitaxelem a gemcitabinem. Exprese PCNA byla zvýšená po ovlivnění gemcitabinem, etoposidem, karboplatinou, topotekanem a mírně po ovlivnění paklitaxelem.

Po 48 h inkubace s cytostatiky byla exprese Cdc25A proteinové fosfatázy snižena po

ovlivnění všemi testovanými cytostatiky. Expres cyklinu B1 byla snížena po ovlivnění paklitaxelem, gemcitabinem a topotekanem, naopak byla zvýšena po ovlivnění etoposidem. Expres cyklinu D1 byla snížena u všech testovaných cytostatik. Výrazně zvýšená expres p21 se objevila po 48 h u cisplatinu. Expres PCNA byla nepatrně zvýšena po ovlivnění cisplatinou, paklitaxelem a karboplatinou.

Detekce apoptických markerů Western blotem

Cytostatika testovaná ve střední inhibiční koncentraci c_4 ovlivnila také expresi apoptických markerů u modelové linie A2780. Po 24 h intervalu byla expres Bax snížena po ovlivnění karboplatinou a paklitaxelem. Expres p53 byla zvýšena po ovlivnění topotekanem. Expres XIAP byla zvýšena 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, snížila se naopak u paklitaxelu a karboplatiny. Expres XIAP byla zvýšena po ovlivnění cisplatinou, karboplatinou a etoposidem, naopak snížena u paklitaxelu, topotekanu a gemcitabinu. Expres p53 byla výrazně zvýšena po ovlivnění gemcitabinem a topotekanem.

Kinetické měření 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 72 h inkubace. Nejnížší 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 cytostatiky.

Imunofluorescenční detekce kaspázy 3

Testovaná cytostatika ve střední inhibiční koncentraci c_4 v průběhu 72 h u buněk indukovala apoptózu a tedy i produkci efektorové kaspázy 3, kterou jsme detekovali pomocí specifické protilátky anti-myši Ig Alexa Fluor[®] 488 jako zelenou fluorescenci. Gemcitabin, topotekan a etoposid indukovaly nejvyšší aktivitu kaspázy 3. Cisplatin a paklitaxel indukovaly aktivitu kaspázy 3 jen slabě a to v intervalu 48 h po ovlivnění. Minimální fluorescence byla detekovaná po ovlivnění karboplatinou. V případě paklitaxelu a etoposidu byla zachycena morfologie tzv. "mitotické katastrofy", kdy se v preparátech vyskytovalo velké množství fragmentovaných buněčných jader.

5. DISKUSE

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 u pacienta [20]. „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 [29]. 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 [28].

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 [29]. 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 [30].

Naším cílem bylo na souboru klinických vzorků sledovat jejich reaktivitu na panel šesti testovaných cytostatik v podmínkách *in vitro*. 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 [31].

Testovaná cytostatika mají rozdílný mechanismus účinku. Alkylační látky, cisplatina a karboplatina, vytváří inter- a intra-řetězcové překřížení [32]. 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 [33, 34]. Ovlivněné buňky jsou zastavené v G2/M fázi buněčného cyklu. Pyrimidinový analog, gemcitabin, inhibuje proces potřebný pro syntézu DNA [35]. 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 [36]. 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 [37]. 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 [38, 39, 40]. 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 [40, 41, 42]. 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 cisplatině v porovnání s karboplatinou, jak také zmiňuje práce našich kolegů [43]. 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 [44]. 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 [45]. 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 [46]. 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 [47].

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 [41].

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 prokázané 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 [48].

Dalším cílem práce bylo 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 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.

Dílčím cílem práce bylo také srovnání reaktivity buněk izolovaných ze solidního nádoru a ascitu téže 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, hodnot reaktivity solidního nádoru a ascitu téže pacientky, 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 téže 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 erythrocyty, 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 patientek 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 závislostí bude potřeba většího počtu vzorků patientek s recidivami ovariálního karcinomu a data budou následně interpretována našimi klinickými kolegy. V těchto případech je pravděpodobně reaktivita na podávaná cytostatika závislá na počtu cyklů prodělané chemoterapie, případně počtu recidiv onemocnění, klinickém stavu pacientky 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* [20]. 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 [49]. Je potřeba mít na paměti, že snaha interpretovat výsledky *in vitro* testů chemosenzitivity musí být brána v kontextu biologie nádorového onemocnění [31], 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.

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 [50]. 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 [51].

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 našich klinických vzorků řídili.

Limitací MTT testu je, že neumí rozlišit cytotoxický a cytostatický účinek testovaných látek a výsledky testu jsou ovlivněny přítomností normálních buněk [29]. 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 $p < 0,033$ [27].

Studie vedená kolegy z Porodnické a gynekologické kliniky Fakultní nemocnice v Hradci Králové se zaměřila také 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 [52].

Pro srovnání s primárními klinickými vzorky byla v další práci použita modelová ovariální nádorová buněčná linie A2780. Je definovaná jako cisplatina-senzitivní a sloužila nám jako modelový systém ovariálního karcinomu v podmínkách *in vitro*. 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 [53]. 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 c_4 měnila distribuci buněčného cyklu v průběhu 24 h od ovlivnění podle mechanismu jejich účinku. Měnila také expresi markerů buněčné proliferace a apoptózy. 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 výrazně zvýšenou aktivitu u ovlivněných buněk. Nejnižší aktivita kaspázy 3 byla pozorovaná u buněk ovlivněných karboplatinou, což odpovídá i výsledkům nalezeným v literatuře [54, 55].

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.

A2780 jako cisplatina-senzitivní buněčná linie se používá jako model pro *in vitro* studie ovariálního karcinomu, které testují anti-proliferační účinky platinových derivátů [56], paklitaxelu [57] a kombinací těchto cytostatik [58].

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 [59, 60, 61]. Účinnost topotekanu na modelové linii A2780 koreluje s výsledky naší předchozí práce, kdy byly testované klinické vzorky ovariálních karcinomů [53].

6. ZÁVĚRY

6.1 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 nádorů a pacientek.

6.2 Buněčná linie A2780

1. Testovaná cytostatika inhibovala proliferaci a indukovala buněčnou smrt u modelové buněčné linie A2780 v závislosti na koncentraci a době působení. Toxicita na úrovni EC_{50} 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.

2. Cytostatika měnila distribuci fází buněčného cyklu a expresi proteinů spojených s buněčným cyklem. Cytostatika inhibovala buněčný cyklus v různých fázích, podle jejich mechanismu účinku.

3. Testovaná cytostatika u sledovaných buněk indukovala programovanou buněčnou smrt, apoptózu. Detekovali jsme apoptické markery a vysoké hladiny efektorové kaspázy 3.

4. 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.

7. POUŽITÁ LITERATURA

1. Cibula, D., Petruželka, L. et. al. (2009). "Oncogynecology." Grada Publishing, Prague: 614.
2. Modugno, F. (2003). "Ovarian cancer and high-risk woman - implications for prevention, screening, and early detection." *Gynecol Oncol*, 91: 15-31.
3. Urban, N. (2003). "Specific Keynote: Ovarian Cancer Risk Assessment and the Potential for Early Detection." *Gynecol Oncol*. 88: 75-79.
4. 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.
5. Agarwal, R., Kaye, S. B. (2003). "Ovarian cancer: strategies for overcoming resistance to chemotherapy." *Nat Rev Cancer* 3: 502-516.
6. 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.
7. Karlan, B. Y., Boyd, J., Strong, L., et al. (2003). "Discussion: Hereditary Ovarian Cancer." *Gynecologic Oncology* 88: 11-13.
8. Ozols, R. F. (2003). "Progress in ovarian cancer: an overview and perspective." *EJC Supplements* 1: 4355.
9. Chobanian, N., Dietrich, C. S. (2008). "Ovarian cancer." *Surg. Clin. North Am.* 88(2): 285–299.
10. Markman, M. (2008). "Pharmaceutical management of ovarian cancer: current status." *Drug* 68: 771–789.
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. 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.
13. Cree, I. A. (2009). "Chemosensitivity and chemoresistance testing in ovarian cancer." *Gynecol Cancer* 21: 39-43.
14. 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.
15. 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.
16. Hamburger, A. W., Salmon, S. E. (1981). "Use of in vitro tests in predictive cancer chemotherapy." *J Natl Cancer Inst* 66: 981–988.
17. 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.
18. 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.
19. Möllgård, L., Prekert, 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.
20. 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.
21. 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.
22. Mosmann, T. (1983). "Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays." *J Immunol Methods* 65: 55–63.
23. Veerman, A. J., Pieters, R. (1990). "Drug sensitivity assays in leukaemia and lymphoma." *Br J Haematol* 74: 381–384.
24. 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.
25. 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.
26. 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.
27. 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.
28. 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.
29. 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.
30. Lichý, J. H., Dalbergue, F., Washington, C., et al. (2000). "Genetic heterogeneity in ductal carcinoma of the breast." *Lab Invest* 80: 291-301.
31. Talač, R., Žaloudík, J., Hajdúch, M., et al. (2000). "Hodnocení lékové rezistence in vitro a její klinické implikace." *Klinická onkologie* 13: 2-3.
32. Conklin, K. A. (2004). "Cancer chemotherapy and antioxidants." *J. Nutr.* 134(11): 3201-3204.
33. Bharadwaj, R., Yu, H. (2004). "The spindle checkpoint, aneuploidy, and cancer." *Oncogene* 23(11): 2016–2027.
34. 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.
35. 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.
36. 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.
37. Gordaliza, M., García, P. A., Corral, J. M. et al. (2004). "Podophyllotoxin: distribution, sources, applications and new cytotoxic derivatives." *Toxicon* 44(4): 441–459.
38. Cwiertka, 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.
39. Kostečka, A., Vagundová, M. (2003). "Prediktivní testy chemorezistence in vitro." *Souhrnná roční zpráva o řešení výzk. záměru MOÚ v Brně:* 36-38.
40. 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.
41. 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.
 42. Saitou, M., Isonishi, S., Hamada, T. et al. (2009). "Mitochondrial ultrastructure-associated chemotherapy response in ovarian cancer." *Oncology Reports* 21: 199-204.
 43. 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.
 44. 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.
 45. 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.
 46. Meyer, U. A. (2000). "Pharmacogenetics and adverse drug reactions." *Lancet* 356: 1667-1671.
 47. 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.
 48. 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.
 49. Langdon, S. P. (2004). "Cancer Cell Culture Methods and Protocols." Humana Press, Totowa, New Persey: 360.
 50. 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.
 51. 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.
 52. Sedláková, I., Tošner, J., Červinka, M., Brigulová, K., Řezáč, A., Špaček, J., Laco, J., Škapinec, P. (2011b). "Primary drug resistance/sensitivity in vitro and clinical outcome in ovarian cancer patients." *Česká Gynekol.* 76(3): 184-189.

53. 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.
54. Ludwig, T., Oberleithner, H. (2004a). "Platinum complex toxicity in cultured renal epithelia." *Cell Physiol Biochem* 14: 431-440.
55. 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.
56. 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.
57. 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.
58. 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.
59. 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.
60. 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.
61. 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.

8. PŘEHLED PUBLIKAČNÍ ČINNOSTI AUTORA

Monografie a kapitoly v monografiích

Sedláková I., Brigulová K., Tošner J., Červinka M.: Drug Resistance and Sensitivity in Ovarian Cancer. Horizons in Cancer Research. Vol. 47. Nova Science Publishers, 2012, 287-304. ISBN: 978-1-61470-444-7.

Původní články

Králová V., Brigulová K., Červinka M., Rudolf E.: Antiproliferative and cytotoxic effects of sodium selenite in human colon cancer cells. Toxicol In Vitro. 2009; 23(8):1497-503. **IF=2,06**

Brigulová K., Červinka M., Tošner J., Sedláková I.: Chemoresistance testing of human ovarian cancer cells and its in vitro model. Toxicol In Vitro. 2010; 24(8):2108-15. **IF=2,06**

Sedláková I., Tošner J., Řezáč A., Červinka M., Brigulová K., Špaček J., Tomšová M., Škapinec P.: Rezistence/senzitivita in vitro u pacientek s karcinomem ovaria. Česká gynekologie 2010; 75:182-187.

Sedláková I., Tošner J., Červinka M., Brigulová K., Řezáč A., Škapinec P., Špaček J., Laco J.: Chemorezistence/chemosensitivita in vitro u pacientek s karcinomem ovaria. Gynekolog 2011; 2: 50-57.

Sedláková I., Tošner J., Červinka M., Brigulová K., Řezáč A., Škapinec P., Špaček J., Laco J.: Primární rezistence/sensitivita in vitro a klinický průběh onemocnění u pacientek s karcinomem ovaria. Česká gynekologie 2011; 3:184-190.

Caltová K., Červinka M.: Antiproliferative effects of selected chemotherapeutics in human ovarian cancer cell line A2780. Acta Medica 2012; 55(3):116-24.

Sedláková I., Laco J., Tošner J., Caltová K., Červinka M., Řezáč A., Špaček J., Škapinec J.: Proteins of resistance and drug resistance in ovarian carcinoma patients. Klin. Onkol. 2012; 25(6):457-63.

Sdělení na odborných setkáních

Brigulová K., Červinka M., Tošner J.: Chemoresistance testing of cells isolated from ovarian tumors, effects of freezing. 27th Annual Workshop of the Scandinavian Society for Cell Toxicology, Lázně Sedmihorky, 2009.

Brigulová K., Volencová S., Teplá M., Sedláková I., Tošner J.: The use of chemoresistance testing for prediction of behaviour of ovarian carcinoma. XXV. xenobiochemické symposium, Mikulov, 2009.

Caltová K., Červinka M., Sedláková I.: Chemoresistance of human ovarian cancer cells and its model cell line A2780. CELLTOX (In Vitro Toxicology: Achievements and Future Challenges), Řím, 2011.

Caltová K., Červinka M., Sedláková I.: Chemosensitivity testing of human ovarian cancer cells and its in vitro model. XX. biologické dny, Plzeň, 2011.