

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



Význam testování chemosenzitivity buněk ovariálních nádorů.

Adam Řezáč

**Autoreferát disertační práce
Doktorský studijní program: Gynekologie a
porodnictví**

**Hradec Králové
2014**

Disertační práce byla vypracována v rámci *kombinovaného* studia doktorského studijního programu Gynekologie a porodnictví na Porodnické a gynekologické klinice Lékařské fakulty UK v Hradci Králové.

Autor:

MUDr. Adam Řezáč; Porodnická a gynekologická klinika Lékařská fakulta UK v Hradci Králové.

Školitel:

doc. MUDr. Jindřich Tošner CSc.; Porodnická a gynekologická klinika Lékařská fakulta UK v Hradci Králové.

Oponenti:

Doc. MUDr. Zdeněk Novotný CSc.; Gynekologicko-porodnická klinika, FN Plzeň.

Prim. MUDr. Josef Chovanec, PhD.; Masarykův onkologický ústav, oddělení gynekologické onkologie.

Obhajoba dne: 26.9.2014 v 11:00, posluchárna Porodnické a gynekologické kliniky Fakultní nemocnice Hradec Králové

Tato práce vznikla za podpory grantu: IGA MZ ČR 8768-3 a IGA MZ ČR 9737-3 Ministerstva zdravotnictví České republiky.

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)

Doc. MUDr. Jiří Špaček PhD., IFEPAG

.....

Jméno, příjmení, tituly

Předseda komise pro obhajoby disertačních prací
v doktorském studijním programu: Gynekologie a porodnictví

OBSAH

1	SOUHRN.....	4
2	SUMMARY.....	5
3	ÚVOD DO PROBLEMATIKY.....	6
4	CÍLE DIZERTAČNÍ PRÁCE.....	9
5	MATERIÁL A METODIKA.....	10
6	SOUBOR NEMOCNÝCH.....	11
7	STATISTICKÁ ANALÝZA.....	11
8	VÝSLEDKY.....	12
9	DISKUZE.....	13
10	ZÁVĚR.....	18
	LITERATURA.....	19
	PUBLIKAČNÍ AKTIVITA AUTORA.....	23

1 SOUHRN

Karcinom ovaria je nejčastější příčinou úmrtí na gynekologické malignity. Většina karcinomů ovaria je diagnostikována v pokročilém stádiu nemoci. Chirurgická léčba v kombinaci s chemoterapií dosahuje vysoké léčebné odpovědi, avšak u dvou třetin pacientek dochází k relapsu onemocnění, rozvoji chemorezistence a následně k úmrtí. Biologická odlišnost jednotlivých typů nádorů je tak pestrá, že jeden léčebný režim nemůže být optimální variantou pro všechny pacientky. Stále více prací se zaměřuje na individualizaci nádorové léčby. Tato práce se zaměřila na *in vitro* testování citlivosti ovariálního karcinomu na vybraná cytostatika pomocí MTT testu a její využitelnost v klinickém rozhodování.

U 55 pacientek s karcinomem ovaria, jsme v letech 2006-2010 odebrali vzorek nádorové ovariální tkáně anebo vzorek maligního ascitu pro testování *in vitro* chemosenzitivity / chemorezistence pomocí MTT testu. Cílem práce bylo porovnat výsledky MTT testování s klinickými parametry.

In vitro chemosenzitivita se vyskytla v 67 % na cisplatinu, v 22 % na karboplatinu a v 16 % na paklitaxel. Význam *in vitro* chemosenzitivity u cisplatinu byl zaznamenán u období bez progresu a u celkového přežití. Multivariantní analýzou jsme u pacientek *in vitro* chemosenzitivních na karboplatinu s nulovým nebo mikroskopickým nádorovým reziduem prokázali nejdelší dobu bez progresu i nejdelší dobu celkového přežití. Shoda výsledků MTT testování mezi čerstvě zpracovanou nádorovou tkání a ascitem prokázala uspokojivé výsledky pouze u testování na cisplatinu. Shoda výsledků MTT testování mezi čerstvě zpracovanou a zmraženou tkání nebyla uspokojivá.

In vitro testování chemosenzitivity by mělo být součástí komplexu vyšetřovacích metod u pacientek s karcinomem ovaria před podáním cytostatické léčby a tím snížit riziko neúspěchu, zabránit vzniku nežádoucích účinků léčby a přispět tím k její individualizaci.

2 SUMMARY

Ovarian cancer is a leading cause of death from gynecologic malignancies. Most ovarian carcinomas are diagnosed in an advanced stage. Surgical treatment promotes a high response rate combined with chemotherapy. However, two-thirds of patients experience a relapse, followed by a development of chemoresistance, and, subsequently, death. The biological diversity of individual types of ovarian carcinoma is so varied, that a single treatment regimen can not be considered as a fitting treatment for all patients. Various studies focus on the individualisation of cancer treatment. This study targets the *in vitro* sensitivity testing in ovarian carcinoma cells on cytostatics using the MTT test. We presume that this method could be utilised in clinical decision-making process.

Between the years 2006 and 2010, we have acquired tumor tissue and malignant ascites from a total of 55 patients enrolled in our study and analyzed those samples *in vitro* for chemosensitivity / chemoresistance using the MTT test. The aim of this research work was to assess chemosensitivity of ovarian carcinoma cells and compare these results with clinical parameters.

Carcinoma cells displayed *in vitro* chemosensitivity to cisplatin in 67% of patients. Tumor cells of 22% patients proved to be sensitive to carboplatin and 16% to paclitaxel. *In vitro* chemosensitivity to cisplatin prolonged both the period without progression and, overall, the longest survival. Results of multivariate analysis suggested that patients whose carcinoma cells were *in vitro* sensitive to carboplatin and who had no residual tumor or just microscopic residual tumor showed the longest period without progression and longest survival. When comparing fresh tumor samples and ascites, we found correlation only in chemosensitivity to cisplatin. However, there was no concordance in sensitivity between fresh and frozen tissue samples.

In vitro chemosensitivity testing should be incorporated in examination methods for ovarian cancer patients before any cytostatic therapy administration. This method would contribute to personalized therapy by enhancing the probability of successful treatment while decreasing side effects.

3 ÚVOD DO PROBLEMATIKY

Karcinom ovaria je nejčastější příčinou úmrtí na gynekologické malignity. Tvoří 5 % mezi všemi nádory u žen. Dle ústavu zdravotnických informací a statistiky České republiky, byl vrchol incidence onemocnění v ČR v roce 2003, kdy bylo diagnostikováno celkem 1 290 nových případů, což odpovídá incidenci 24,63 / 100 000 žen. Od roku 2004 je patrné snižování incidence onemocnění, v roce 2010 incidence 20,64 / 100 000 žen. V absolutních číslech se jedná o 1 107 nových případů za rok 2010. Přestože se o karcinomech ovaria mluví jako o jedné entitě, jedná se o skupinu onemocnění s různou morfológií, s rozdílným biologickým chováním a s různou prognózou.

Dle histologických charakteristik se karcinom ovaria dále dělí na několik podtypů. 50 % všech ovariálních malignit je představován serózním adenokarcinomem. Další histologické subtypy tvoří endometroidní adenokarcinom, mucinózní adenokarcinom, světlobuněčný karcinom. Vzácněji se vyskytují karcinomy z přechodních buněk, Brennenův nádor, dlaždicobuněčný karcinom, karcinosarkom (mülleriánský nádor) a nediferencovaný karcinom (1, 2).

V současné době existuje několik hypotéz popisujících etiologii vzniku sporadicky se vyskytujících karcinomů ovaria. Žádná z uvedených teorií jednoznačně nevysvětluje všechny zaznamenané aspekty vzniku karcinomu ovaria. Předpokládá se tedy multifaktoriální vliv jednotlivých rizikových faktorů (3). Mimo většiny sporadických karcinomů ovaria se 5-10 % karcinomů vyskytuje familiárně.

Dle biologického chování a molekulárně genetických analýz rozlišujeme dva typy ovariálních epiteliálních karcinomů. Epiteliální ovariální karcinom typu I vzniká postupným vývojem z benigního a borderline nádoru, tedy z definované prekursorové léze, která obvykle roste pomalu. Patří sem tzv. „low-grade“ karcinomy, které se vyznačují příznivou prognózou s vyšším pětiletým přežitím než u karcinomů typu II. U nádorů typu II, bez prokazatelné prekursorové léze, se předpokládá, že vznikají rychle a jsou často diagnostikovány až v pokročilém stádiu onemocnění. Jsou charakteristické vyšším gradem a nepříznivou prognózou. V naprosté většině případů těchto nádorů se prokáže mutace tumor supresorového genu p53.

Více jak 1/3 pacientek s ovariálním karcinomem má přítomný maligní ascites již v době diagnózy a téměř většina při progresi onemocnění (4). Vznik ascitu nejenom snižuje kvalitu života pacientek, ale také podporuje růst samotného nádoru a zvyšuje jeho schopnost metastazovat. V maligní ascitické tekutině jsou přítomné solubilní faktory a buněčné komponenty, které zajišťují prozánětlivé prostředí, tedy ideální mikroprostředí pro přežití

a růst nádorových buněk. Jsou zde přítomné i nádorové stem-like buňky, které fungují jako rezervoár nádorových buněk pro metastatický rozsev (5).

Z klinické praxe víme, že úskalí diagnostiky spočívá ve vyhledání co do incidence málo častého onemocnění, které nemá v počátečních stádiích specifické klinické příznaky a zároveň anatomická lokalizace je nepříznivá pro detekci onemocnění v subklinickém stádiu. Diagnostika se opírá o komplex vyšetřovacích metod, jejichž kombinací se snažíme selektovat skupinu pacientek, u nichž je reálné riziko onemocnění. Definitivní diagnóza je založena na odběru tkáně a jeho histopatologickém vyšetření s jasně definovanými morfologickými kritérii jednotlivých maligních subtypů.

I přes pokroky v diagnostice je detekce onemocnění v časných stádiích obtížná a onemocnění je stále diagnostikováno více než v 70 % v pokročilém stádiu (stádia FIGO III a IV). Dosud neexistuje plošný efektivní screening zhoubných ovariálních nádorů a ani výsledky screeningu rizikových skupin nepřinesly přesvědčivé výsledky v detekci časných stádií.

V léčbě zhoubných ovariálních nádorů je základní léčebnou modalitou chirurgický výkon, který bývá ve většině případů doplněn systémovou chemoterapií. Současné poznatky jednoznačně ukazují, že operační výkon ve smyslu jeho radikality zásadně ovlivňuje celkovou prognózu nemocných. Standardem léčebného protokolu systémové chemoterapie je 6-8 cyklů kombinace platinového preparátu s paklitaxelem (PAKL) bez rozdílu histologického typu a biologické povahy nádoru. Mezi klinicky využívané platinové preparáty řadíme cisplatinu (cDDP) a karboplatinu (CBDCA). CBDCA se pro její nižší výskyt nežádoucích účinků a lepší tolerabilitu v klinické praxi daleko častěji upřednostňuje před cDDP.

Léčba recidiv je ovlivněna jejich lokalizací, předchozí léčbou, celkovým stavem konkrétní pacientky a dobou záchytu či manifestací recidivy od ukončené předchozí léčby. Systémové podávání chemoterapie je zatíženo nejen narůstající kumulativní toxicitou, rizikem vzniku závažné hypersenzitivní reakce při opakování léčebných cyklů zejména karboplatinou (6, 7), ale také narůstající lékovou resistencí a tím nižším žádoucím účinkům aplikované léčby (8-10). Z hlediska kurability recidivy onemocnění se jednoznačně jako nejvíce problematickou skupinou ukazují pacientky s progresí onemocnění při primární systémové léčbě, či časnou recidivou, nebo progresí onemocnění manifestující se do 6 měsíců od ukončené léčby. Obecně zde mluvíme o platinu rezistentním onemocněním. Kompletní odpověď na primární chemoterapii je vysoká, mezi 50 a 70%. Přesto 50–75 % pacientek s pokročilým onemocněním relabuje, dochází k rozvoji lékové rezistence a to zejména mnohočetné (MDR). MDR také vysvětluje případy necitlivosti některých nádorů k alternativním léčebným režimům obsahujícím nové druhy cytostatik nepoužitých v původní léčbě (8-11).

Nemožnost predikce odpovědi na léčbu vede k volbě terapie a dávkování, které nejsou pro mnoho pacientů optimální. Účinnost léčby je kromě genetických faktorů nádoru a samotného pacienta také ovlivňována vlivy vnějšího prostředí a lékovými interakcemi. Všechny tyto faktory společně utvářejí charakter a intenzitu odpovědi na podávanou léčbu (12, 13). Jednou z možností hodnocení *in vitro* chemosenzitivity je hodnocení na buněčných liniích, které však mají specifické vlastnosti a neodpovídají reálným podmínkám u individuálních pacientek. Chemosenzitivita nádorové linie se může výrazně lišit od chemosenzitivity nádorových buněk izolovaných přímo z nádorové tkáně pacientek (14).

Od roku 1980 bylo vyvinuto několik metod pro *in vitro* testování chemosenzitivity. Tyto metody jsou založeny na hodnocení míry proliferace, metabolismu či počítání přeživších buněk (HTCA, EDR, DiSC a ATP-CRA). Žádná z těchto metod není ideální a každá má své limitace, jako je doba kultivace, komplikace při získávání primární buněčné suspenze, potřeba velkého vzorku nádorové tkáně. Další komplikací je kontaminace testované nádorové suspenze fibroblasty, mezoteliálními či stromálními buňkami. Proliferace nemaligních buněk vytváří šumy při hodnocení chemosenzitivity nádorových buněk (15).

Pro naši práci jsme k *in vitro* hodnocení chemosenzitivity nádorových buněk využili třídenní MTT test. MTT testování využívá k získání nádorové buněčné suspenze mechanickou dezintegraci tkáně a následnou separaci nádorových buněk pomocí centrifugace na hustotním gradientu. Hodnocení přežívajících buněk je založeno na spektrofotometrickém měření vzniklého nerozpustného formázanu, který redukcí vytvoří mitochondriální dehydrogenázy přežívajících buněk z tetrazoliové soli přidané ke kultivovaným buňkám (16).

4 CÍLE DISERTAČNÍ PRÁCE

1. Určit nezávislý prediktivní prognostický faktor z vybraných klinických, laboratorních a histopatologických parametrů pro období bez progresu a celkového přežití u pacientek s karcinomem ovaria.
2. Stanovit *in vitro* chemosenzitivitu z buněk nádorové ovariální tkáně a z buněk maligního ascitu k vybraným cytostatikům (CBDCA; PAKL; cDDP) pomocí metody MTT.
3. Zhodnotit vztah mezi *in vitro* stanovenou chemosenzitivitou nádorových buněk s obdobím do progresu a s celkovým přežitím u pacientek s karcinomem ovaria.
4. Zhodnotit vztah *in vitro* chemosenzitivity nádorových buněk a potvrzených nezávislých prognostických faktorů s obdobím bez progresu a celkovým přežitím.
5. Ověřit shodu výsledků MTT testování z čerstvé nádorové tkáně a čerstvého maligního ascitu.
6. Ověřit shodu výsledků MTT testování z čerstvé nádorové tkáně a zmražené nádorové tkáně.

5 MATERIÁL A METODIKA

Vzorky čerstvé nádorové tkáně byly odebrány peroperačně. Po chirurgickém odstranění nádorově postiženého ovaria, byla část nádoru (cca 1 – 5 cm³) využita pro MTT testování a zbylá tkáň byla využita ke stanovení definitivní histologické diagnózy. Všechny vzorky nádorové ovariální tkáně pro MTT testování vloženy do sterilní 50 ml plastické nádoby na jedno použití s transportním médiem pro tkáň. Odběr maligního ascitu (250-500 ml) probíhal peroperačně, či při punkci dutiny břišní. Ascites byl odebrán do sterilní 500 ml láhve s transportním médiem. Čerstvě odebrané vzorky nádorové tkáně a ascitu byly nejdéle do 1 hodiny transportovány na Ústav lékařské biologie a genetiky, kde byly ihned zpracovány.

Pro hodnocení senzitivity bylo použito třídenního MTT testu. Buněčná suspenze byla pipetována do 96 jamkových destiček (80 μl buněčné suspenze 1 x 10⁶ živých buněk / ml na jamku). K buňkám bylo přidáno 20 μl média v případě kontrolních buněk a 20 μl roztoků cytostatik. Pro určení cytostatické koncentrace daného cytostatika (TCS50), byly nádorové buňky vystaveny působení každým cytostatikem v šesti různých koncentracích po dobu 72 hodin při 37°C 5% CO₂. Pokusy byly pro ověření nasazeny vždy dvakrát. Na závěr kultivace bylo ke každé jamce přidáno 10 μl žluté tetrazoliové soli MTT (5 mg / ml). V případě živých buněk je tetrazoliová sůl redukována mitochondriálními dehydrogenázami na nerozpustný formazan (fialová barva). Po dvou až šesti hodinách, po vytvoření fialových krystalů formazanu, se do každé jamky přidalo 100 μl 10% roztoku SDS (pH 5). Během 10 hodin docházelo k rozpouštění krystalů formazanu. Následující den proběhlo spektrofotometrické vyhodnocení měřením absorbance formazanu na spektrofotometru při 560 nm. Od naměřených hodnot byla odečtena hodnota „pozadí“ (medium) a výsledky byly vyjádřeny jako procenta kontroly.

Stejným způsobem byly zpracovány i odběry ascitu či zamražené vzorky ovariální tkáně z tkáňové ústředny.

Pokud cytostatikum ve vysoké koncentraci způsobilo pokles počtu živých buněk pod 25 %, buňky se označily jako vnímavé k působení léčiva. Pokud došlo k poklesu živých buněk pod 50 %, ale ne více než pod 25 %, označily se jako hraničně vnímavé. Pokud buňky přežily nad 50 %, označily se jako rezistentní.

6 SOUBOR NEMOCNÝCH

Na Porodnické a gynekologické klinice Lékařské fakulty Univerzity Karlovy a Fakultní nemocnice Hradec Králové, jsme v letech 2006-2010 u 59 patientek odebrali čerstvý vzorek nádorové ovariální tkáně anebo maligní ascites pro testování chemosenzitivity pomocí testu MTT.

Na základě definitivního histologického vyšetření byl u 55 patientek diagnostikován karcinom ovaria. Třem patientkám byl diagnostikován borderline tumor ovaria a jedné pacientce granulózový tumor. Tyto čtyři pacientky byly z našeho souboru vyloučeny. Patientky před MTT testováním neprodělaly chemoterapii ani žádnou jinou léčbu pro karcinom ovaria. 28 patientkám byl odebrán pouze vzorek nádorové ovariální tkáně, 15 patientkám pouze ascites a u 12 patientek byl odebrán jak ascites, tak nádorová tkáň. Během sledování došlo u 44 patientek (80 %) k progresi onemocnění a 36 patientek (65 %) zemřelo. Všem patientkám (až na jedenáct patientek, které buď odmítly, nebo jim ze zdravotních důvodů nemohla být nabídnuta chemoterapie) byla podána, podle současných doporučených standardů, chemoterapie první linie (kombinace PAKL a CBDCA).

7 STATISTICKÁ ANALÝZA

Statistická analýza byla provedena pomocí software MedCalc (MedCalc Software, Belgie).

Univariální analýzy přežití byly konstruovány dle Kaplan-Meierovy metody. Výsledky jsou udávány jako medián a rozmezí hodnot. Hodnoty p nižší než 0.05 byly považovány za statisticky významné. Do multivariální analýzy byly zahrnuty jen ty prognostické faktory, které vyšly v univariální analýze jako statisticky významné. Multivariální analýza byla provedena pomocí Coxova modelu proporcionálních rizik (Coxova regrese). Hodnoty p nižší než 0.05 byly považovány za statisticky významné.

Pro statistické zhodnocení kategoriálních proměnných byl použit chi-squared test. Při hodnotách p nižších než 0.05 byl výsledek považován za statisticky významný.

Kombinované analýzy byly konstruovány dle Kaplan-Meierovy metody. Výsledky jsou udávány jako medián a rozmezí hodnot. Hodnoty p nižší než 0.05 byly považovány za statisticky významné.

Shoda výsledků mezi čerstvou tkání a ascitem, resp. čerstvou tkání a zmrazenou tkání byla zhodnocena pomocí „inter-rater agreement“ testu. Síla shody je udávána hodnotou kappa.

8 VÝSLEDKY

Byl ověřen vztah prognostických ukazatelů (věk, BMI, histologie, stádium onemocnění, grade, hodnota CA 125, nádorové reziduum po chirurgické léčbě) s klinickými parametry (období bez progresu a celkové přežití). Byl potvrzen prognostický význam věku pacientek při diagnóze ($p=0.03$), stádia onemocnění ($p<0.0001$), grade ($p=0.02$) a přítomnost nádorového rezidua po chirurgické léčbě ($p<0.0001$) na období bez progresu. Významný vliv na celkové přežití byl potvrzen jen u stádia onemocnění ($p=0.008$) a přítomnosti nádorového rezidua po chirurgické léčbě ($p<0.0001$).

Jako nezávislý prediktivní ukazatel na období bez progresu bylo v multivariální analýze identifikováno stádium onemocnění při diagnóze ($p=0.03$). Pro celkové přežití byly jako nezávislé prediktivní ukazatele nalezeny stádium onemocnění při diagnóze ($p=0.04$) a velikost rezidua ($p=0.02$).

In vitro chemosenzitivita na cDDP se vyskytla u 37 (67 %) pacientek, na CBDCA u 12 pacientek (22 %) a na PAKL u 9 pacientek (16 %), (cDDP vs. CBDCA $p<0.0001$; cDDP vs. PAKL $p<0.0001$). Nebyl prokázán rozdíl výskytu chemosenzitivity mezi CBDCA a PAKL ($p=0.250$).

Pacientky s ovariálním karcinomem, který byl *in vitro* citlivý na cDDP měly delší období bez progresu ($p=0.01$). Celková délka přežití byla také delší, nicméně dosáhla jen hraniční statistické významnosti ($p=0.05$). *In vitro* senzitivita na CBDCA a PAKL neovlivňovala délku období bez progresu onemocnění ani celkové přežití pacientek s ovariálním karcinomem, které byly léčeny těmito cytostatiky.

Kombinovanou analýzou chemosenzitivity na CBDCA a velikostí rezidua po chirurgické léčbě jsme prokázali nejdelší dobu bez progresu ($p=0.038$) i celkové přežití ($p=0.048$) u pacientek s nádorovou tkání citlivou na CBDCA *in vitro* a s žádným nebo mikroskopickým reziduem po chirurgické léčbě.

Kombinovanou analýzou chemorezistence na PAKL a velikostí rezidua po chirurgické léčbě jsme neprokázali rozdíly v období bez progresu ani v celkovém přežití u jednotlivých skupin pacientek.

Kombinovanou analýzou chemorezistence na CBDCA / PAKL a stádiem onemocnění jsme neprokázali rozdíly v období bez progresu ani v celkovém přežití u jednotlivých skupin pacientek

U 12 pacientek, kterým byl odebrán vzorek maligního ascitu i nádorové tkáně, se ověřovala shoda výsledků MTT testu mezi těmito materiály Shoda výsledků *in vitro* MTT testování mezi čerstvě zpracovanou nádorovou tkání a ascitem byla nalezena v absolutním a relativním hodnocení pouze u cDDP.

U CBDCA byla zaznamenána pouze relativní shoda.

U 8 pacientek, kterým byla stanovena chemosenzitivita nádorových buněk ovariální tkáně z čerstvého vzorku i ze zamraženého vzorku, se ověřovala shoda výsledků MTT testu mezi těmito materiály.

Shoda výsledků *in vitro* MTT testování mezi čerstvě zpracovanou nádorovou tkání a zmrazenou nádorovou tkání byla nalezena pouze u cDDP v relativním hodnocení.

9 DISKUZE

Karcinom ovaria má nejvyšší mortalitu mezi gynekologickými malignitami (17). Přestože incidence onemocnění za posledních 10 let v ČR mírně klesá, můžeme se pouze domnívat, co se na tomto faktu podílí. Vzhledem k nespecifickým symptomům je většina karcinomů ovaria diagnostikována v pokročilém stádiu nemoci. Základním léčebným přístupem je co nejvíce radikální chirurgický výkon doplněný o chemoterapii založenou na derivátech platiny v kombinaci s paklitaxelem bez rozdílu histologického typu a biologické povahy nádoru. I přes vysoké procento odpovědi na primární léčbu dochází u více než 3/4 případů k časnému relapsu onemocnění. Závažným problémem při léčbě karcinomu ovaria je vznik sekundární rezistence po předchozí chemoterapeutické léčbě (8, 11).

V naší práci jsme potvrdili prognostický význam obecně známých rizikových faktorů karcinomu ovaria. Mezi prognosticky významné ukazatele jsme prokázali věk pacientek při diagnóze, stádium onemocnění a diferenciaci nádoru.

V našem souboru 55 nemocných byl medián věku při diagnóze 64 let, což odpovídá údajům i z rozsáhlé mezinárodní populační studie, kde je průměrný věk 64 let (18).

16,5 % pacientek diagnostikovali ve stádiu I a II a 83,5 % pacientek ve stádium III a IV. Rozložení pacientek dle stádia v naší práci odpovídá i rozložení pacientek v ostatních pracích hodnotících *in vitro* chemosenzitivitu karcinomu ovaria (19, 20). Jako jeden z významných nezávislých prognostických faktorů jsme potvrdili stádium onemocnění, které rozlišuje pacientky dle rozsahu onemocnění, ale jeho prognostický význam je pro většinu pacientek, vzhledem k vysokému procentu nemocných, u kterých je karcinom ovaria diagnostikován v pokročilém stádiu, do jisté míry omezený. Ze stejného důvodu není, pro většinu pacientek, jako stratifikační prognostický faktor vhodný ani grade nádoru, kdy v našem souboru měla většina pacientek (94 %) určený grade 2-4. Také v práci Neubauera a spol. bylo 93 % pacientek s určeným gradem 2-4 (19).

Jako další nezávislý prognostický faktor jsme potvrdili velikost nádorového rezidua po chirurgické léčbě. Proto jsme velikost rezidua po chirurgické

lčbě a stádium onemocněnı zvolili jako vhodné rizikov faktory pro kombinovanou analýzu s výsledky *in vitro* chemosenzitivıty.

Cılem naı práce bylo *in vitro* testovnı primrnı chemosenzitivıty nádorových ovarıalnıch bunek ze solidnıho nádoru a ascitu metodou MTT, kter je založena na izolaci bunek vzorku ndorov tkáně a jejich nsledn kultivaci *in vitro* s vybranými cytostatiky o různých koncentracıch. MTT metoda je relativn rychl, jednoduch a levn, vyuiteln v 90 % ppad (21-23).

V našem souboru pacientek vykazovaly ndorov buňky izolovan ze solidnı tkn nejvı chemosenzitivıtu na cDDP. Podobn výsledky byly zaznamenány i u ostatnıch pracı zabvajıcıch se *in vitro* testovnım chemosenzitivıty nádorových bunek na cDDP, CBDCA a PAKL (14, 20, 24). Zároveň byly publikovány práce, ve kterých je popisován astı vyskyt resistance na CBDCA (24, 25). Vzhledem k tomu, že ze dvou uıvanch cytostatik (platinov derivát / taxan) v prvnı linii chemoterapie, hraje platinov derivát vznamnı roli, stanovenı *in vitro* citlivosti nabıı možnost zohlednit, jak platinov preparát by byl pro konkrtnı pacientku prınosnı (26, 27).

Dalm cılem naı práce bylo zhodnotit vliv výsledku *in vitro* chemosenzitivıty resp. chemorezistence nádorových bunek na jednotliv cytostatika na obdobı bez progresu a celkové pıtı. Testovnı chemosenzitivıty bylo prokázáno jako klinicky vznamn u pacientů s karcinomem plıc, gastrointestinlnım karcinomem, melanomem, ı karcinomem prsu (23, 28-31). Lee a spol. prokázali výhodnost vyuıtı testovnı chemosenzitivıty p výběru individualizovan léčby karcinomu dlonıho hrdla (32). Ballard a spol. prokázali korelaci mezi výsledkem *in vitro* testovnım chemosenzitivıty a klinickou odpovdı na léčbu u pacientek s karcinomem endometria (33).

V našem souboru nemocných byl prokázán vznamn vliv *in vitro* chemosenzitivıty na cDDP na dlku obdobı bez progresu a hraninı vliv na dlku celkového pıtı. Nebyl prokázán vznamn rozdıl v dlce obdobı bez progresu ani na celkové pıtı mezi nemocnými dlenmi dle výsledku *in vitro* chemosenzitivıty nádorových bunek na CBDCA a PAKL. Lee a spol. prokázali, že výsledek *in vitro* testovnı chemosenzitivıty metodou HDRA m jen hranin vznamn vliv na dobu bez progresu a statisticky nevznamn vliv na celkové pıtı pacientek s karcinomem ovaria (20). Konecny a spol. a Holloway a spol. nezávisle prokázali u pacientek s karcinomem ovaria ve stadiu III a IV leench cDDP nebo CBDCA po vspn cytoreduktivnı chirurgick léčbě, že pacientky *in vitro* rezistentnı na cDDP nebo CBDCA majı 2,3 x resp. 4 x kratı obdobı bez progresu n pacientky *in vitro* citliv cDDP nebo CBDCA. Konecny a spol. využili pro *in vitro* testovnı chemosenzitivıty ATP metodu a Holloway EDR metodu (34, 35). Na našem souboru pacientek jsme na rozdıl od jiných studiı

neprokázali vliv samotné přítomnosti primární *in vitro* chemosenzitivity resp. chemorezistence na CBDCA na období bez progresu ani na celkové přežití. Tyto výsledky jsou pravděpodobně ovlivněny velikostí a nesourodostí vyšetřovaného souboru resp. velikostí jednotlivých podskupin pacientek. Pro jednoznačné ohodnocení vlivu *in vitro* chemosenzitivity nádorových buněk na cytostatika bude třeba výsledky ověřit na výrazně větším počtu nemocných (36-38).

Práce, které podávali chemoterapii na základě výsledku *in vitro* chemosenzitivity neprokázali významné rozdíly v klinické odpovědi, či v celkovém přežití od pacientek léčených empiricky (36, 39). Naopak Rutherford a spol. prokázali, že využití cytostatického preparátu k léčbě pacientek s karcinomem ovaria, u kterého byla prokázána *in vitro* chemosenzitivita významně prodlužuje období bez progresu i celkové přežití v porovnání s pacientkami, u kterých byl podán preparát s prokázanou *in vitro* chemorezistencí (40).

Prokázali jsme, že kombinovaná analýza chemosenzitivity nádorových buněk na CBDCA a velikost nádorového rezidua po chirurgické léčbě odlišuje podskupinu nemocných s nejpříznivější prognózou. Nejdelší období bez progresu i celkové přežití jsme prokázali u pacientek s nádorovou tkání citlivou na CBDCA *in vitro* a s žádným nebo mikroskopickým reziduem. U těchto pacientek by se podání CBDCA mohlo považovat za individualizovaný léčebný přístup. V praxi by tato kombinovaná analýza mohla mít význam u pacientek s žádným nebo mikroskopickým reziduem a prokázanou rezistencí CBDCA *in vitro*. U těchto pacientek by bylo vhodné zvolit jiný typ primární chemoterapeutické léčby, zvýšit pravděpodobnost úspěchu chemoterapie a vyhnout se tak nežádoucím účinkům pravděpodobně neúčinné léčby.

Dále jsme se zaměřili na porovnání výsledků *in vitro* reaktivity nádorových buněk izolovaných ze solidního nádoru s buňkami získanými z maligního ascitu pacientek. Zpracování vzorku a tedy i izolace buněk z ascitu je výrazně jednodušší než zpracování vzorku nádorové tkáně. Není zde potřeba mechanického rozmělnění tkáně a nedochází k poškozování buněk při samotném zpracování, jako dochází při izolování buněk ze solidní tkáně. Životnost buněk z maligního ascitu vyšla u našich pacientek vyšší než životnost izolovaných buněk z nádorové tkáně stejné pacientky (14). Relativní i absolutní shodu výsledků *in vitro* MTT testování jsme prokázali u cDDP. Relativní shoda výsledků byla prokázána také u CBDCA.

Nádorové buňky obsažené v maligním ascitu nemusí, vzhledem k jedinečnému nádorovému mikroprostředí, vykazovat identické vlastnosti s primárním nádorem. Nádorová buněčná suspenze získaná z ascitu nemůže pro MTT testování nahradit nádorovou buněčnou suspenzi získanou ze solidní tkáně. Testování nádorových buněk z ascitu může mít ale svůj význam u pacientek s refrakterním ascitem, u nichž se plánuje aplikace

intraperitoneální chemoterapie. Některé práce potvrzují, že pacientky s prokázanou *in vitro* chemosenzitivitou nádorových buněk izolovaných z ascitu mají delší období bez progresu i celkové přežití v porovnání s pacientkami s prokázanou *in vitro* rezistencí (41, 42).

Porovnávali jsme rovněž výsledky MTT testu mezi čerstvě zpracovanou nádorovou tkání a zmraženou nádorovou tkání. Stanovení chemosenzitivity nádorových buněk z čerstvé tkáně a zároveň zmražené tkáně bylo provedeno jen u 8 resp. 6 pacientek. Mezi těmito materiály jsme prokázali pouze uspokojivou shodu při relativním hodnocení výsledků.

Největší limit MTT testování na rozmražených nádorových buňkách je dán životností buněčné suspenze po rozmražení. Pro stanovení chemosenzitivity nádorových buněk z čerstvé tkáně byly využity jen ty buněčné suspenze, u kterých byla prokázána vyšší jak 90% životnost. Pro stanovení chemosenzitivity nádorových buněk z rozmražené buněčné suspenze byly využity jen ty vzorky, u kterých byla prokázána alespoň 80% životnost nádorových buněk. Většina rozmražených suspenzí nádorových buněk však vykazovala nižší jako 80% životnost a z tohoto důvodu u nich nebylo MTT testování provedeno. Podle našich výsledků, i když jen na velmi omezeném počtu vzorku vyplývá, že rutinní MTT testování na rozmražených nádorových buňkách tedy není vhodnou metodou k určení chemosenzitivity nádorových buněk k jednotlivých cystostatikům.

Hlavní význam stanovování *in vitro* chemosenzitivity přímo na nádorových buňkách izolovaných z nádorů jednotlivých pacientek je v předpokladu, že léčebný účinek jednotlivých cytostatik se liší na základě vnitřní genetické diverzity a rozvoji rozdílných subklonů nádoru s rozdílným fenotypem mezi jednotlivými pacientkami (43, 44). Výsledky hodnocení *in vitro* chemosenzitivity na buněčných liniích neodpovídají reálným podmínkám u individuálních pacientek (14).

In vitro metody stanovení chemosenzitivity rozlišují individuální reaktivitu jednotlivých nádorů na cytostatika a umožňují určit neefektivní cytostatické preparáty, které by jen poškozovaly pacientku nežádoucími účinky. *In vitro* testování chemosenzitivity představuje zdánlivě jednoduchý proces pro stanovení citlivosti izolovaných nádorových buněk k jednotlivým cytostatickým preparátům *in vitro*. Práce, které se zabývají *in vitro* testováním chemosenzitivity buněk izolovaných z nádorové tkáně a jejího vlivu na klinický výsledek léčby není mnoho. Hodnocení a porovnatelnost výsledků z jednotlivých pracovních skupin je limitováno nejednotným výběrem metody testování chemosenzitivity, nejednotným hodnocením výsledků citlivosti a nejednotným testováním cytostatik. V některých pracích, včetně naší práce, testovali jednotlivá cytostatika zvlášť (20, 30, 32, 35, 45), v jiných pracích testovali cytostatika v kombinacích (19, 33, 34).

Další častou komplikací je také kriticky malý počet testovaných pacientek, krátká doba sledování a výrazná různorodost testovaného souboru pacientek. Metoda MTT je do značné míry, stejně jako ostatní metody *in vitro* testování chemosenzitivity, negativně ovlivňována několika faktory. Mezi nejvýznamnější negativní faktor patří vysoká úmrtnost nádorových buněk v prostředí média bez žádného cytostatika. Vysoká úmrtnost je způsobena pravděpodobně zvýšenou citlivostí nádorových buněk na stresové podmínky změny prostředí. Mezi negativně ovlivňující faktory dále patří vlastní proces izolace buněk, který nedostatečně selektuje nádorové buňky. Suspenze buněk použitá pro *in vitro* testování je vlastně heterogenní směs nádorových buněk, mezotelií, stromálních buněk či fibroblastů, které ovlivňují svým metabolismem výsledné hodnoty absorbance a tedy i hodnocení výsledku. Možné metody purifikace pro získání pouze nádorové suspenze buněk jsou však kvůli své nízké výtěžnosti nepoužitelné (46-48).

Vyazuje-li nádor chemorezistenci *in vitro* na testované cytostatikum, lze předpokládat, že daný preparát bude neúčinný i *in vivo*. Vyazuje-li nádor chemosenzitivitu *in vitro* na testované cytostatikum, však nutně neznamená, že nádorové buňky budou na dané cytostatikum citlivé *in vivo*. Účinek léčby neovlivňuje jen genetická diverzita samotného nádoru, ale velký význam je v individuálních rozdílech jednotlivých pacientek v biotransformaci a biodistribuci léčiva. Při *in vitro* testování je léčivo v přímém kontaktu s nádorovými buňkami, ale po intravenózním podání léčiva dochází k rozdílnému metabolismu léčiva díky odlišným polymorfismům a aktivitě enzymů jednotlivých pacientek (49). Biodistribuce aktivního léčiva závisí také na vaskularitě nádoru (50).

Výsledky naší práce jsou ovlivněny velikostí vyšetřovaného souboru resp. velikostí jednotlivých podskupin pacientek. Pro jednoznačné ohodnocení vlivu *in vitro* chemosenzitivity nádorových buněk na cytostatika na období bez progresu a na celkové přežití bude třeba výsledky ověřit na výrazně větším počtu nemocných.

MTT in vitro testování chemosenzitivity nádorových buněk izolovaných ze solidního nádoru pacientek patří, i přes veškeré své nedostatky, mezi jednu z mála metod hodnotící reálný vztah nádorových buněk pacientek k jednotlivým cytostatickým preparátům. *In vitro* testování chemosenzitivity by mohlo sloužit jako významná část hodnocení chemorezistence spolu se stanovováním ostatních farmakodynamických, genetických a imunologických faktorů, ovlivňují účinek léčby u jednotlivých pacientek nejenom s karcinomem ovaria.

10 ZÁVĚR

V naší práci jsme došli k následujícím poznatkům:

Jako nezávislé prediktivní ukazatele na celkové přežití byly v multivariální analýze identifikovány stádium onemocnění při diagnóze a velikost nádorového rezidua

Nejčastější výskyt *in vitro* chemosenzitivity byl prokázána u cDDP.

Pacientky s prokázanou *in vitro* chemosenzitivitou na cDDP mají delší období bez progresu i celkové přežití než pacientky s prokázanou chemorezistencí. Tento vliv jsme neprokázali u CBDCA ani u PAKL.

Nejdelší období bez progresu i celkové přežití mají pacientky s optimálně provedeným chirurgickým výkonem a zároveň s *in vitro* chemosenzitivními nádorovými buňkami na CBDCA.

Shoda výsledků MTT testování mezi čerstvě zpracovanou nádorovou tkání a ascitem prokázala uspokojivé výsledky pouze u testování na cDDP.

Shoda výsledků MTT testování mezi čerstvě zpracovanou nádorovou tkání a zmrazenou tkání nebyla uspokojivá.

In vitro testování chemosenzitivity nádorových buněk nám dává informaci o jejich citlivosti na jednotlivá cytostatika. Klinický význam je zejména u prokázané chemorezistence na konkrétní preparáty a tím předpoklad neúspěchu plánované léčby. *In vitro* MTT testování je metoda hodnotící citlivost nádorové tkáně individuálních pacientek na konkrétní cytostatikum. Problematika *in vitro* testování je zejména v různorodosti používaných metodik, v potřebě dostatečného množství tkáně a různorodosti vyseparované buněčné suspenze.

In vitro testování chemosenzitivity by mělo být součástí komplexu vyšetřovacích metod u pacientek s karcinomem ovaria před podáním cytostatické léčby a tím přispět k její individualizaci.

LITERATURA

1. Cibula D, Petruželka L. Histopatologická klasifikace. *Onkogynekologie: Grada*, 2009:503-05.
2. Prat J. Ovarian carcinomas: five distinct diseases with different origins, genetic alterations, and clinicopathological features. *Virchows Arch* 2012;460(3):237-49.
3. Cibula D, Petruželka L. Molekulární genetika některých gynekologických malignit. *Onkogynekologie: Grada*, 2009:54-62.
4. Kipps E, Tan DS, Kaye SB. Meeting the challenge of ascites in ovarian cancer: new avenues for therapy and research. *Nat Rev Cancer* 2013;13(4):273-82.
5. Ahmed N, Stenvers KL. Getting to Know Ovarian Cancer Ascites: Opportunities for Targeted Therapy-Based Translational Research. *Front Oncol* 2013;3:256.
6. Koshiba H, Hosokawa K, Kubo A a spol. Incidence of Carboplatin-related hypersensitivity reactions in Japanese patients with gynecologic malignancies. *Int J Gynecol Cancer* 2009;19(3):460-5.
7. Rezac A, Jilek P, Rezacova V a spol. [Hypersensitivity reactions to carboplatin and paclitaxel - our five-years experiences]. *Ceska Gynekol* 2013;78(6):514-21.
8. Sedlakova I, Laco J, Tosner J a spol. [Proteins of resistance and drug resistance in ovarian carcinoma patients]. *Klin Onkol* 2012;25(6):457-63.
9. Fruehauf JP, Alberts DS. In vitro drug resistance versus chemosensitivity: two sides of different coins. *J Clin Oncol* 2005;23(15):3641-3; author reply 46-8.
10. Nosková V, Hajduch M, Mihál V a spol. Mechanismy mnohočetné lékové rezistence a jejich význam pro klinickou praxi I. typická MDR. *Klin Onkol* 2000;13:4-9.
11. Ozols RF, Schwartz PE, Eiferl PJ. Ovarian cancer, fallopian tube carcinoma and peritoneal carcinoma. . In: Vita D, ed. *Cancer: principles and practice oncology*. 6.th ed. Philadelphia: Lippincott-Raven, 2001:597-632.
12. Lee W, Lockhart AC, Kim RB a spol. Cancer pharmacogenomics: powerful tools in cancer chemotherapy and drug development. *Oncologist* 2005;10(2):104-11.
13. Yamayoshi Y, Iida E, Tanigawara Y. Cancer pharmacogenomics: international trends. *Int J Clin Oncol* 2005;10(1):5-13.
14. Brigulova K, Cervinka M, Tosner J a spol. Chemoresistance testing of human ovarian cancer cells and its in vitro model. *Toxicol In Vitro* 2010;24(8):2108-15.

15. Kitaoka A, Muraoka R, Tanigawa N. Improvement of in vitro chemosensitivity assay for human solid tumors by application of a preculture using collagen matrix. *Clin Cancer Res* 1997;3(2):295-9.
16. Grever MR, Schepartz SA, Chabner BA. The National Cancer Institute: cancer drug discovery and development program. *Semin Oncol* 1992;19(6):622-38.
17. Jemal A, Siegel R, Ward E a spol. Cancer statistics, 2007. *CA Cancer J Clin* 2007;57(1):43-66.
18. Coleman MP, Quaresma M, Berrino F a spol. Cancer survival in five continents: a worldwide population-based study (CONCORD). *Lancet Oncol* 2008;9(8):730-56.
19. Neubauer H, Stefanova M, Solomayer E a spol. Predicting resistance to platinum-containing chemotherapy with the ATP tumor chemosensitivity assay in primary ovarian cancer. *Anticancer Res* 2008;28(2A):949-55.
20. Lee SW, Kim YM, Kim MB a spol. In vitro chemosensitivity using the histoculture drug response assay in human epithelial ovarian cancer. *Acta Med Okayama* 2012;66(3):271-7.
21. Cole SP. Rapid chemosensitivity testing of human lung tumor cells using the MTT assay. *Cancer Chemother Pharmacol* 1986;17(3):259-63.
22. Black MM, Speer FD. Further observations on the effects of cancer chemotherapeutic agents on the in vitro dehydrogenase activity of cancer tissue. *J Natl Cancer Inst* 1954;14(5):1147-58.
23. Kim R, Emi M, Tanabe K a spol. Chemosensitivity testing for gastrointestinal cancer: survival benefit potential and limitations. *Anticancer Drugs* 2003;14(9):715-23.
24. Cloven NG, Kyshtoobayeva A, Burger RA a spol. In vitro chemoresistance and biomarker profiles are unique for histologic subtypes of epithelial ovarian cancer. *Gynecol Oncol* 2004;92(1):160-6.
25. Cwiertka K, Hajduch M, Pilka R. Chemoterapie ovariálního karcinomu s ohledem na stanovení in vitro senzitivity - vybrané kazuistiky. *Klin Onkol* 2000;13:58-59.
26. International Collaborative Ovarian Neoplasm G. Paclitaxel plus carboplatin versus standard chemotherapy with either single-agent carboplatin or cyclophosphamide, doxorubicin, and cisplatin in women with ovarian cancer: the ICON3 randomised trial. *Lancet* 2002;360(9332):505-15.
27. Sedlakova I, Tosner J, Cervinka M a spol. [Primary drug resistance/sensitivity in vitro and clinical outcome in ovarian cancer patients]. *Ceska Gynekol* 2011;76(3):184-9.

28. Brown E, Markman M. Tumor chemosensitivity and chemoresistance assays. *Cancer* 1996;77(6):1020-5.
29. Tanino H, Oura S, Hoffman RM a spol. Acquisition of multidrug resistance in recurrent breast cancer demonstrated by the histoculture drug response assay. *Anticancer Res* 2001;21(6A):4083-6.
30. Ugurel S, Schadendorf D, Pfohler C a spol. In vitro drug sensitivity predicts response and survival after individualized sensitivity-directed chemotherapy in metastatic melanoma: a multicenter phase II trial of the Dermatologic Cooperative Oncology Group. *Clin Cancer Res* 2006;12(18):5454-63.
31. Mehta RS, Bornstein R, Yu IR a spol. Breast cancer survival and in vitro tumor response in the extreme drug resistance assay. *Breast Cancer Res Treat* 2001;66(3):225-37.
32. Lee SW, Kim YM, Kim MB a spol. Chemosensitivity of uterine cervical cancer demonstrated by the histoculture drug response assay. *Tohoku J Exp Med* 2009;219(4):277-82.
33. Ballard KS, Homesley HD, Hodson C a spol. Endometrial carcinoma in vitro chemosensitivity testing of single and combination chemotherapy regimens using the novel microculture kinetic apoptosis assay: implications for endometrial cancer treatment. *J Gynecol Oncol* 2010;21(1):45-9.
34. Konecny G, Crohns C, Pegram M a spol. Correlation of drug response with the ATP tumorchemosensitivity assay in primary FIGO stage III ovarian cancer. *Gynecol Oncol* 2000;77(2):258-63.
35. Holloway RW, Mehta RS, Finkler NJ a spol. Association between in vitro platinum resistance in the EDR assay and clinical outcomes for ovarian cancer patients. *Gynecol Oncol* 2002;87(1):8-16.
36. Cortazar P, Johnson BE. Review of the efficacy of individualized chemotherapy selected by in vitro drug sensitivity testing for patients with cancer. *J Clin Oncol* 1999;17(5):1625-31.
37. Berek J, Taylor P, McGuire W a spol. Oregovomab maintenance monoimmunotherapy does not improve outcomes in advanced ovarian cancer. *J Clin Oncol* 2009;27(3):418-25.
38. Fruehauf JP, Manetta A. Use of the extreme drug resistance assay to evaluate mechanisms of resistance in ovarian cancer: taxol resistance and MDR-1 expression. *Contrib Gynecol Obstet* 1994;19:39-52.
39. Kurbacher CM, Grecu OM, Stier U a spol. ATP chemosensitivity testing in ovarian and breast cancer: early clinical trials. *Recent Results Cancer Res* 2003;161:221-30.
40. Rutherford T, Orr J, Jr., Grendys E, Jr. a spol. A prospective study evaluating the clinical relevance of a chemoresponse assay for

- treatment of patients with persistent or recurrent ovarian cancer. *Gynecol Oncol* 2013;131(2):362-7.
41. Xu X, Dai H, Zhao Y a spol. In vitro chemosensitivity assay of ascites in epithelial ovarian cancer. *Eur J Gynaecol Oncol* 2013;34(6):559-64.
 42. Isogai A, Nagaya M, Matsuoka H a spol. A new chemosensitivity assay for ascites tumor cells using a thermoreversible gelation polymer as a culture medium and the observed clinical responses. *Eur Surg Res* 2007;39(1):41-50.
 43. Goldie JH, Coldman AJ. A mathematic model for relating the drug sensitivity of tumors to their spontaneous mutation rate. *Cancer Treat Rep* 1979;63(11-12):1727-33.
 44. Iyer L, Ratain MJ. Pharmacogenetics and cancer chemotherapy. *Eur J Cancer* 1998;34(10):1493-9.
 45. Koshiyama M, Kinezaki M, Uchida T a spol. Chemosensitivity testing of paclitaxel versus docetaxel in human gynecological carcinomas: a comparison with carboplatin. *Anticancer Res* 2006;26(5B):3655-9.
 46. Yamaue H, Tanimura H, Tsunoda T a spol. Chemosensitivity testing with highly purified fresh human tumour cells with the MTT colorimetric assay. *Eur J Cancer* 1991;27(10):1258-63.
 47. Shimoyama Y, Kubota T, Watanabe M a spol. Predictability of in vivo chemosensitivity by in vitro MTT assay with reference to the clonogenic assay. *J Surg Oncol* 1989;41(1):12-8.
 48. Robbins KT, Connors KM, Storniolo AM a spol. Sponge-gel-supported histoculture drug-response assay for head and neck cancer. Correlations with clinical response to cisplatin. *Arch Otolaryngol Head Neck Surg* 1994;120(3):288-92.
 49. Kim RB, Leake BF, Choo EF a spol. Identification of functionally variant MDR1 alleles among European Americans and African Americans. *Clin Pharmacol Ther* 2001;70(2):189-99.
 50. Chen QR, Zhang L, Gasper W a spol. Targeting tumor angiogenesis with gene therapy. *Mol Genet Metab* 2001;74(1-2):120-7.

PUBLIKAČNÍ AKTIVITA AUTORA

Publikace s IF:

1. Kacerovsky M, Musilova I, Jacobsson B, Drahosova M, Hornychova H, **Rezac A**, Andrys C. Cervical and vaginal fluid soluble Toll-like receptor 2 in pregnancies complicated by preterm prelabor rupture of membranes. The Journal of Maternal Fetal and Neonatal Medicine; přijato k tisku 11.7.2014. **IF 1.518**
2. Kacerovsky M, Musilova I, Andrys C, Drahosova M, Hornychova H, **Rezac A**, Kostal M, a Jacobsson B. Oligohydramnios in women with preterm prelabor rupture of membranes and adverse pregnancy and neonatal outcomes; přijato k tisku 30.7.2014. **IF 3.73**

Původní články:

1. **Řezáč A**, Řezáčová V, Sedláková I, Tošner J, Špaček J. Vliv lymfocytárních subpopulací v periferní krvi a ascitu na průběh onemocnění ovariálního karcinomu Gynekolog 2014;23(1):7-13.
2. **Rezac A**, Jilek P, Rezacova V, Skapinec P, Sedlakova I, Tosner J, Spacek J. [Hypersensitivity reactions to carboplatin and paclitaxel - our five-years experiences]. Ceska Gynekol 2013;78(6):514-21.
3. Sedlakova I, Laco J, Tosner J, Caltova K, Cervinka M, **Rezac A**, Spacek J, Skapinec P. [Proteins of resistance and drug resistance in ovarian carcinoma patients]. Klin Onkol 2012;25(6):457-63.
4. Sedlakova I, Tosner J, Kopecky O, Vroblova V, **Rezac A**, Skapinec P, Andrys C. [Vascular endothelial growth factor in ovarian cancer patients]. Ceska Gynekol 2012;77(5):415-20.
5. Sedlakova I, Tosner J, Cervinka M, Brigulova K, **Rezac A**, Spacek J, Laco J, Skapinec P. [Primary drug resistance/sensitivity in vitro and clinical outcome in ovarian cancer patients]. Ceska Gynekol 2011;76(3):184-9.
6. Sedlaková I, Tošner J, Červinka M, Brigulová K, **Řezáč A**, Špaček J, Laco J, Škapinec P. Chemorezistence/chemosensitivita in vitro u pacientek s karcinomem ovaria. Gynekolog 2011;20(2):47-50.
7. Sedlakova I, Tosner J, **Rezac A**, Cervinka M, Brigulova K, Spacek J, Tomsova M, Skapinec P. [Resistance/sensitivity in vitro in ovarian cancer patients]. Ceska Gynekol 2010;75(3):182-7.
8. Tošner J, Červinka M, Sedláková I, **Řezáč A**, Špaček J, Skapinec P, Kacerovský M. Testování účinnosti cystostatik s využitím zmražených buněk karcinomu ovaria. Slovenská gynekológia a porodnictvo 2010;17(3-4):121-24.

9. Tošner J, Sedláková I, Červinka M, **Řezáč A**, Špaček J, Tomšová M, Čermáková E, Kacerovský M. Vliv cytostatik na buňky karcinomu ovaria získaných z tumoru a ascitu. *Gynekolog* 2009;18(1):8-13.

Přehledové články a kazuistiky:

1. **Řezáč A**, Sedláková I, Tošner J, Špaček J, Kestřánek J, Kříž J. Význam testování chemosenzitivity u ovariálního karcinomu. *Gynekolog* 2006;15(5):188-92.
2. **Řezáč A**. Diagnostika a léčba zhoubných ovariálních nádorů. *Gynekolog* 2013;22(2):80-83.
3. Spacek J, Laco J, Petera J, Sedlakova I, **Rezac A**. [Can be considered the primary fallopian tube cancer an enigma at the beginning of the third millennium?]. *Ceska Gynekol* 2013;78(6):501-8.
4. Spacek J, Laco J, Petera J, Jilek P, Krepinska E, **Rezac A**, Stipl S. [Prognostic factors of mesenchymal and mixed tumors of uterus]. *Ceska Gynekol* 2009;74(4):292-7.
5. Sedlakova I, Tosner J, **Rezac A**, Cervinka M, Tomsova M, Spacek J. [Chemoresistance/Chemosensitivity of ovarian cancer--a case report]. *Ceska Gynekol* 2008;73(3):140-3.
6. Kříž J, Křepinská E, **Řezáč A**. Chronická pánevní bolest v laparoskopickém obraze. *Gynekolog* 2008;17(5):179-82.

Abstrakta:

1. **Rezac A**, Spacek J, Skapinec P, Sedlakova I, Krepinska E, Tosner J. Risk of nascency of the hypersensitivity reactions associated with carboplatin and paclitaxel treatment of ovarian cancer *Int J Gynecol Cancer* 2010;20(Suppl. 2):1262.
2. **Řezáč A**, Špaček J, Škapinec P, Halada P, Cechová M, Tošner J. Riziko vzniku hypersenzitivní reakce na podání karboplatiny. 15. ročník odborného sympózia na téma Onkologie v gynekologii a mammologii; Brno, Česká republika 2010.
3. Sedlaková I, Tošner J, Červinka M, Caltová-Brigulová K, **Řezáč A**, Laco J, Tomšová M, Škapinec P, Andrýs C, Kopečký O, Vroblová V. Perspektivní metody diagnostiky karcinomu ovaria a jejich vztah k léčebným algoritmům. 17. ročník sympózia onkologie v gynekologii a mammologii; Brno, Česká republika 2012.
4. Sedlakova I, Cervinka M, Tosner J, Laco J, Brigulova K, **Rezac A**, Spacek J, Skapinec P. Drug resistance/sensitivity in vitro and clinical outcomes in ovarian cancer patients. *Int J Gynecol Cancer* 2010;20(Suppl. 2):1304.
5. Špaček J, Tošner J, **Řezáč A**, Křepinská E, Halada P. Jak dále v chirurgické léčbě sarkomů dělohy? 15. ročník odborného

sympózia na téma onkologie v gynekologii a mammologii; Brno, Česká republika 2010.

6. Sedláková I, Tošner J, **Řezáč A**, Červinka M, Brigulová K, Špaček J, Laco J, Škapinec P. Vztah exprese proteinů rezistence MRPI a p170 k rezistenci/sensitivitě in vitro u pacientek s karcinomem ovaria. Edukační sborník Brno: Masarykův onkologický ústav 2010:291.
7. Sedláková I, Červinka M, Tošner J, Laco J, Brigulová K, **Řezáč A**, Špaček J, Škapinec P. Chemorezistence/chemosensitivita in vitro u pacientek s karcinomem ovaria. *Onkologie* 2010;4(Suppl. A; A18).
8. Sedláková I, Červinka M, Tošner J, Brigulová K, Seifertová J, Laco J, **Řezáč A**, Špaček J, Škapinec P. Chemoresistance/chemosensitivity of ovarian cancer cells. *Acta medica (Hradec Králové)* 2010;53(1):62.
9. Tosner J, Cervinka M, Sedlakova I, **Rezac A**, Spacek J, Skapinec P. Clinical aspects of chemosensitivity testing in patients with epithelial ovarian cancer. *Int J Gynecol Cancer* 2009;19(Suppl. 2).
10. Tosner J, Cervinka M, Sedlakova I, **Rezac A**, Spacek J, Tomsova M. In vitro chemosensitivity of the freshly isolated and cryopreserved ovarian cancer cells. 12th Biennial Meeting International Gyneacologic Cancer Society; Bangkok, Thailand 2008.
11. Tosner J, Cervinka M, Sedlakova I, **Rezac A**, Spacek J, Tomsova M. Chemosensitivity to topotecan, cisplatinum, carboplatinum, gemcitabine and paclitaxel in patients with epithelial ovarian cancer. 12th Biennial Meeting International Gyneacologic Cancer Society, Bangkok, Thailand 2008.
12. Tosner J, Cervinka M, **Rezac A**, Sedlakova I, Spacek J. Chemoresistance of ovarian carcinoma cells isolated from solid tumours or ascites. 15th International Meeting of The European Society of Gyneacological Oncology; Berlin, Germany 2007.
13. Špaček J, Tomšová M, Petera J, **Řezáč A**. Primární karcinom vejcovodu. 12. ročník odborného sympózia Onkologie v gynekologii a mammologii; Brno, Česká republika 2007.