

METODIKY TESTOVÁNÍ CHEMOSENSITIVITY/CHEMOREZISTENCE NÁDORŮ *IN VITRO* METHODS FOR THE EVALUATION OF HUMAN TUMOR DRUG RESISTANCE *IN VITRO*

JITKA CHUMCHALOVÁ¹, JAN KOVAŘÍK²

BIOLOGICKÝ ÚSTAV LF MÚ, BRNO¹, ODDĚLENÍ BUNĚČNÉ A MOLEKULÁRNÍ ONKOLOGIE MASARYKOVA ONKOLOGICKÉHO ÚSTAVU, BRNO²

Korespondující autor: Jitka Chumchalová, Oddělení buněčné a molekulární onkologie Masarykova onkologického ústavu, Zlутý kopec 7, Brno 656 53, telefon: 05-43133302, e-mail: jchumch@med.muni.cz

Souhrn: Chemoterapie zhoubných nádorů představuje jednu ze základních modalit léčby lidských neoplasií. Ve většině případů je však volba farmak, jejich kombinace a dávkovací schémata, založena na empirických zkušenostech a výsledcích bezpočtu multicentrických studií, aniž by byla respektována biologická individualita nádoru a jeho nositele. Ukazuje se, že zlepšení léčebných výsledků, ale i snížení nežádoucích účinků chemoterapie, může přinést individualizovaná léčba prováděná na základě *in vitro* predikce rezistence, resp. citlivosti daného nádoru na spektrum cytostatik. V práci autoři podávají přehled a charakteristiku *in vitro* metodik, které jsou využívány pro výběr chemoterapeutik s předpokládaným terapeutickým efektem *in vivo* a které umožňují vyřadit léky na něž je daný nádor rezistentní. Práce rovněž analyzuje četné metodické a interpretační problémy *in vitro* predikce protinádorové účinnosti cytostatik, zejména v souvislosti s klinickou validitou testů.

Klíčová slova: Testy chemorezistence/chemosensitivit *in vitro*, klonovací metoda, MTT, histokultury

Summary: Cancer continues to cause significant mortality and the use of standard cytotoxic chemotherapy has reached a therapeutical plateau. Currently, the process of selecting chemotherapy is a source of trial and error neglecting biological individuality of each tumor and its bearer. The improvement of treatment results is expected from *ex vivo* drug sensitivity testing which may allow to choose the most effective drugs for individual patient and to exclude agents to which the tumor cells exert resistance. The paper reviews current methods used to test index *in vitro* conditions the sensitivity of tumors to a panel of anticancer agents. It also does a bit of thinking on some limitations and drawbacks of each technique. Special attention is paid to the clinical relevance of the individualized cancer therapy based on *in vitro* drug selection.

Key words: Chemoresistance/chemosensitivity assays *in vitro*, clonogenic assay, MTT, histocultures

Úvod

Protinádorová chemoterapie prodělala v minulých desetiletích boulivý rozvoj. Původně byla pouze doplňkovou léčbou, ale postupně nabývala významu standardní léčebné metody a stala se rovnocennou léčbě chirurgické a radioterapii. Prvotní období skepse bylo vystřídáno nadšením a nekritickým přeceňováním možností chemoterapie. Dnešní pohled na problematiku chemoterapie už není tak nekritický. Statistika posledních 20 let ukazuje, že chemoterapie dosáhla určitého maxima a nová cytostatika neovlivňují zásadním způsobem přežití nemocných s nejfrekventovanějšími nádory. Dnes je zřejmé, že účinnost chemoterapie je ovlivňovaná řadou faktorů, které sehraávají významnou úlohu v léčebné strategii a spolurozhodují o výsledku léčby. Máme na mysli zejména histologický typ nádoru, stupeň pokročilosti onemocnění, vaskularizaci nádorového ložiska, klonální heterogenitu maligní populace, primární či sekundární (indukovanou) chemorezistenci a konečně celkový stav nemocného. Jelikož účinek cytostatik není přísně specifický pro nádorové buňky, ale působí více či méně toxicky i na normální buňky, jsou vedlejší účinky řady cytostatik dalším limitujícím faktorem chemoterapie a ve svých důsledcích mohou vést i k závažnému poškození nemocného. Současná onkologická chemoterapie je založena převážně na empirických zkušenostech a generalizaci výsledků rozsáhlých klinických studií, aniž by respektovala individualitu nemocného a biologickou odlišnost každého nádoru. Je více než pravděpodobné, že respektování faktorů individuality a možnosti jejich posouzení může do značné míry optimalizovat výběr protinádorových farmak, jejich dávky což ve svých důsledcích příznivě ovlivní terapeutický efekt a sníží riziko nežádoucích účinků. Jedním z přístupů individualizované chemoterapie je výběr cytostatik s maximální účinností pro daný nádor a současně eliminace těch, na něž je nádor vysoce rezistentní, na základě hodnocení chemosensitivity/chemorezistence nádorové populace v *in vitro* podmínkách. V našem sdělení bychom rádi seznámili čtenáře s metodikami *in vitro* testů citlivosti nádorové populace na cytostatika a s některými metodickými a interpretačními problémy se zaměřením na „solidní“ malignity.

První testování chemosensitivit/chemorezistence *in vitro* se datují do období přelomu 50. a 60. let, kdy badatelé Black a Speer (1) popsali hodnocení citlivosti nádorů v *in vitro* podmínkách jako nový, vhodný přístup pro výběr neúčinnějších cytostatik pro individuálního nemocného. Jejich práce však nedoznala většího zájmu, ani klinického využití. V průběhu 80. let dochází, zejména v USA a Japonsku, k renezanzi prediktivní individualizované léčby onkologických pacien-

tů. Průlomem v testování chemosensitivit nádorů byla metoda HTCA (Human Tumor Colony Assay), kterou vyvinul Salmon a Hamburger v roce 1977 (2) a která, přestože má mnoho nevýhod, je dodnes používána. Následoval rozvoj dalších technik, hodnotících krátkodobé poškození buněk. Je třeba zmínit, že až na malé výjimky se *in vitro* hodnocení chemosensitivit/chemorezistence koncentruje do soukromých zdravotnických zařízení a že renomovaná onkologická pracoviště mají zatím k této metodice velmi opatrný, často i kritický přístup. Teoretickou bází *in vitro* hodnocení lékové rezistence je představa, že farmakum vysoce účinné proti danému nádoru *in vitro* bude efektivní i v klinické aplikaci. Na druhé straně nelze s jistotou prokázat či dokladovat, že vynechání cytostatik na něž je daný nádor v podmínkách *in vitro* rezistentní, neovlivní negativně *in vivo* léčebnou odpověď. Dnes spíše převládá názor, že tyto metody určí poměrně spolehlivě cytostatika na něž je daný nádor rezistentní, ale určení citlivosti je méně spolehlivé.

Metody testování *in vitro* jsou založeny na dvou odlišných principech, které hodnotí různě stupeň poškození nádorových buněk. Jejich přehled, výhody a nevýhody jsou shrnuty v tabulce číslo 1.

Klonovací metoda

Klonovací metoda je založena na schopnosti nádorových buněk růst na agarovém semisolidním médiu ve formě kolonií. Příkladem je již zmíněný HTCA test, který vypracoval a popsal Salmon a Hamburger (2) a který je v různých modifikacích využíván dodnes (3-6). Metodika je založena na schopnosti nádorových buněk růst na agaru ve formě kolonií, zatímco normální buňky jsou v růstu inhibovány. Buněčné poškození po kontaktu s cytostatikem je hodnoceno srovnáním počtu kolonií v kulturách ovlivněných a kontrolních. Zastánci této metodiky jako její přednost uvádějí eliminaci normálních buněk ve vzorku i když lze polemizovat o reprezentativnosti selektované populace vzhledem k podmínkám *in vivo*. Shimoyama a spol. udávají, že výběr účinných cytostatik na základě klonovacího testu dobře koreluje s jejich terapeutickým efektem na modelových myších nádorech (7). Limitací této techniky, která brání širšímu klinickému využití a může být zdrojem interpretačních omylů, je potřeba velkého počtu izolovaných nádorových elementů, z nichž jen malé procento má schopnost růst v agarovém médiu. Některé práce dokonce uvádějí, že schopnost adaptace na růst v agarovém médiu má pouze méně jak 1% maligních buněk, což negativně ovlivňuje výtěžnost testu a možnost přesné interpretace. Z hlediska známé genotypové i fenotypové heterogenity nádorové populace *in vivo*, jsou závěry klonovacího testu výsledkem odpo-

Tab.1

Metoda	Výhoda	Nevýhoda
Klonovací metoda	Dobrá korelace s klinickými výsledky.	Dlouhá doba provedení testu. Potřeba velkého množství buněk. Malé procento hodnotitelných vzorků. Nelze hodnotit buňky v G ₀ fázi. Nelze hodnotit velký počet cytostatik. Chyby při odečítáním počtu kolonií.
Metody hodnotící metabolismus buněk	Rychlá metoda. Velké procento hodnotitelných vzorků. Potřeba malého množství buněk. Lze hodnotit velký počet cytostatik. Možnost testování buněk v G ₀ fázi. Dobrá korelace s klinikou.	Přítomnost normálních buněk může ovlivnit výsledek testu.
Histokultury	Lepší simulace podmínek <i>in vivo</i> . Možnost histologického hodnocení změn nádoru po kontaktu s cytostatiky. Nádor má přirozenou architekturu a proliferační aktivitu velmi blízkou <i>in vivo</i> podmínkám.	

vědí pouze malého počtu selektovaných buněk, které jsou schopné růst v agarovém médiu. Navíc v daném provedení test není schopen postihnout odpověď buněk v G₀ fázi, které jsou, byť v malém procentu vždy přítomny v *in vivo* nádorové tkáni a následně i v explantované populaci. Vedle poměrně dlouhé doby k provedení testu, může být zdrojem falešně pozitivních výsledků obtížné rozlišení náhodných shluků často mrtvých buněk od pravých kolonií.

Jak upozorňuje Pavlík kol. (8), zdrojem interpretačních chyb mohou být i buňky, které v důsledku transferu do ne zcela fyziologických *in vitro* podmínek přestanou proliferovat, zůstávají však metabolicky aktivní a teprve po adaptační fázi s poměrně dlouhou dobou latence vstupují do buněčného cyklu a jsou schopny růst v koloniích. Literatura uvádí, že část výše uvedených problémů může být eliminována kombinací více metodologických přístupů, ať již hodnocením metabolické aktivity explantovaných buněk nebo stanovením DNA syntézy v buněčných koloniích pomocí inkorporace ³H značeného thymidinu jako markerů replikační aktivity (9-11).

Studie, které se zabývaly korelací s klinickým účinkem uvádí prediktivní hodnotu této metody kolem 80%, s poměrně vysokým procentem (30-48%) neúspěšných kultivací. Autoři Shimoyama a spol. (7) srovnávali klonovací metodu s MTT testem na nádo-rech žaludku, prsu, střeva a plic se 3 cytostatiky, a výsledky obou metod porovnávali s testy *in vivo* na myších. Podle těchto výsledků klonovací metoda měla 90% předpovědní hodnotu a MTT 86,7%. Autoři uvádějí, že lepší výsledky jsou dosaženy kombinací obou metod.

Neklonovací metody

Další skupina metod je založena na stanovení proporce živých a mrtvých buněk. Většina přístupů hodnotí změny v buněčném metabolismu a membránové integritě, které jsou reflexí buněčného poškození po kontaktu s cytostatiky. Jejich společnou předností je poměrně vysoké procento hodnotitelných vzorků, postižení buněk v G₀ fázi a možnost v poměrně krátkém časovém intervalu a za standardních podmínek posoudit účinnost většího počtu protinádorových chemoterapeutik. Diskutovaným problémem těchto testů je možná závislost výsledků na příměsi nenádorových buněk, tedy zda a do jaké míry může proporcionality normálních versus maligních elementů ovlivnit výsledek testu a jeho interpretaci. Součástí explantované monocelulární suspenze připravené z nádorové biopsie jsou i normální diploidní buňky o nichž je známo, že mají *in vitro* růstovou preferenci ve srovnání s buňkami maligními a že v primokultuře jsou stejně, ne-li více vnímavé na poškození farmaky. Na základě uvedeného nelze vyloučit, že stupeň kontaminace maligní populace buňkami normálními může ovlivnit výsledek testu. Vyjdeme-li však ze situace *in vivo*, kde mezibuněčné kanály a buněčné interakce bezesporu spolurozhodují o biologickém chování nádoru, potom lze připustit, že *in vitro* maligní populace s přirozeným zastoupením normálních buněk, je relativně vhodným modelem blízkým situaci *in vivo*. Obecně se jedná o problém, který dosud čeká na své objasnění.

Testy membránové integrity

První testy hodnotící buněčné poškození byly založeny na sledování membránové integrity buněk. Můžeme je rozdělit na testy vitální a supravitální. Vitální testy jsou založeny na aktivním přijímání barviva živou buňkou přes neporušenou plasmatickou membránu, zatímco mrtvé buňky zůstávají neobarvené. Nejpoužívanějším barvivem pro vitální testy je neutrální červeně. Opakem jsou supravitální testy, kdy přes porušenou plasmatickou membránu mrtvých buněk proniká barvivo do intracelulárního prostoru a živé buňky zůstávají neobarvené. Jako barvivo se využívá např. trypanová modř a methylenová zeleň.

Možnost rozlišit živé buňky od mrtvých je založena na kombinaci ovlivnění membránové integrity a některé z metabolických cest. Příkladem tohoto přístupu je metoda zavedená Pavlíkem (8), v níž viabilní buňky jsou určovány podle aktivity esteráz a jejich schopnosti přeměnit bezbarvý fluorescein diacetát na zelený fluorescein. Mrtvé buňky jsou rozlišeny podle jejich schopnosti přijímat propidium iodid porušenou plasmatickou membránou. Pod mikroskopem se hodnotí proporce živých tj. zeleně a mrtvých tj. červeně zbarvených buněk.

MTT test

Nejrozšířenější metodou testování *in vitro* chemosenzitivity/chemorezistence je tetrazoliový test (MTT test) popsán v roce 1983 Mosmannem (12). Rozlišení živých a mrtvých buněk je založeno na schopnosti živých buněk redukovat žlutou, rozpustnou tetrazoliovou sůl MTT (3-4,5-dimethylazol-2-yl)-2,5-diphenyl tetrazolium) mitochondriálním enzymem sukcinát-dehydrogenázou na nerozpustný modrý formazan (13). Formazan je pak rozpuštěn dimethyl sulfoxidem (DMSO), případně jiným organickým rozpouštědlem. Absorbance barevného produktu je měřena fotometricky při 570 nm a výsledky jsou srovnávány s hodnotami identických kontrolních kultur neovlivněných cytostatiky.

Japonští autoři Kubota a spol. (14-16) použili tuto metodu pro stanovení citlivosti nádorů žaludku, střeva, sliziny, prsu, jícnu a lymfomů na panel cytostatik MMC, 5-FU, ADM a DDP. Studie uvádí 90% hodnotitelných nádorů, u nichž *in vitro* výsledky byly podkladem pro výběr cytostatik pro daného nemocného. Korelace s klinickým efektem byla okolo 83-86%. Za hlavní přednost testu *in vitro* považují autoři možnost poměrně přesně detekovat stupeň rezistence na některou ze zkoušených látek a následně vyřazení neúčinných terapeutik z léčebného protokolu. Podobně příznivé hodnocení MTT testu pro volbu účinných cytostatik uvádí Yamaguche a spol. u kolorektálních karcinomů (17). Cole (18) využil tuto metodu pro stanovení chemosenzitivity/chemorezistence u nádorů plic. Práce akcentuje její význam v určování mnohočetné lékové rezistence a tím eliminace neúčinné, pacienta zatěžující terapie.

Carmichael a spol. (19) srovnávali MTT test s klonovací metodou. Autoři uvádějí, že MTT test detekuje ve větším procentu počet rezistentních kultur k hodnoceným cytostatikům ve srovnání s klonovací metodou.

Na základě dosud publikovaných prací lze charakterizovat MTT test jako jednoduchou, rychlou a relativně standardní metodiku

pro predikci chemorezistence, respektive chemosensitivity nádorů v podmínkách *in vitro*. Jako každá metodika má však i MTT test některé limitace jejichž příkladem je nemožnost rozlišit cytostatický od cytotoxického účinku a již zmíněné riziko ovlivnění výsledku přítomností vysokého procenta normálních buněk v kultuře. Problémem, který může ovlivnit spolehlivost výsledků je schopnost některých chemoterapeutik redukovat MTT. Tento faktor však může být eliminován vyšetřením kontrolním testem MTT testem bez buněk.

ATP test

Byl popsán Sevinem v roce 1993 (20). Metoda je založena na kvantitativním měření ATP bioluminiscence s luciferázou-luciferinem. ATP je pro živé buňky primárním zdrojem energie a po smrti buňky je rychle hydrolyzován. Z buněk je extrahováno ATP a po přidání komplexu luciferázy-luciferinu je za přítomnosti ATP emitováno záření jehož intenzita je měřena luminometrem. Bioluminiscence může hodnotit cytostatický i cytotoxický efekt různých látek.

Metoda byla použita pro hodnocení lékové rezistence v kulturách ovariálního karcinomu (5,21). Hodnotitelných bylo 93 % explantátů.

Histokultury

Výše uvedené metody byly prováděny v dvourozměrném uspořádání a tedy v podmínkách značně odlišných od situace *in vivo*. Pozornost se zaměřuje na *in vitro* hodnocení lékové rezistence v trojrozměrných kulturách s využitím různých substrátů, které imitují extracelulární matrix. Z kultivačního hlediska se zdaleka nejedná o novou metodologii. Trojrozměrná kultivace a pojem histokultura se objevuje již na počátku století, kdy Carrel (22) popsal kultivaci fragmentu srdce 18 dní starého kuřete s dlouhodobou proliferací i plně funkční aktivitou.

V 50. letech Leighton (23) zdokonalil Carrelovy histokultury použitím jemně porézních celulóзовých houbiček jako substrátu pro explantované fragmenty tkáně. Tato technika umožňuje udržovat kulturu v její přirozené architektuře a proliferaci aktivitě velmi blízké fyziologickým podmínkám.

Předností kultivace fragmentů tkáně na podpůrné matrix je nižší uplatnění stresových faktorů, kterým jsou buňky vystaveny v případě klasické buněčné explantace. Důsledkem těchto stresových faktorů, jejichž příkladem může být proteolytická dezintegrace buněk nebo eliminace fyziologických buněčných interakcí, je změna buněčné kinetiky (např. změněné parametry času zdvojení či změny v poměru cyklujících versus necyklujících buněk).

Nespornou výhodou fragmentových trojrozměrných kultur pro studium lékové rezistence je možnost jejího histologického zpracování a hodnocení jemných morfoloických změn buněčného poškození pomocí spektra moderních imunohistochemických a molekulárně biologických metodik. V současné době se jako optimální matrix pro trojrozměrné fragmentové primokultury využívají želatinové houbičky (The Upjohn Comp., Kalamazoo, MI, 49001, USA). Podobně jako u monocelulárních kultur se i v histokulturách pro finální hodnocení efektu cytostatik využívá převážně MTT test.

Jiným přístupem je autoradiografická analýza syntézy DNA (6, 24). Z publikovaných prací považujeme za významné studie Furukawu a spol. (14,25), které prokazují 90% shodu rezistence *in vitro* a *in vivo*, ale pouze 67% shodu v citlivosti. Autoři považují tyto testy za spolehlivé pro vyřazení málo účinných nebo neúčinných cytostatik, avšak bez prediktivní hodnoty stupně citlivosti *in vivo*. Podobné výsledky dokumentuje práce autorů Robins a spol. na nádorech hlavy a krku (26).

Je zajímavé, ale z hlediska biologické dostupnosti testovaných cytostatik i pochopitelné, že histokultury vykazují vyšší stupeň rezistence ve srovnání s kulturami jednovrstevnými nebo suspenzními v nichž cytostatika se dostanou do kontaktu s „nahou“ buňkou. V této souvislosti Miller a spol. (27, 28) v testech rezistence na melphalan uvádí až 1000x vyšší rezistenci histokultury ve srovnání s rezistencí jednovrstevné kultury. Upozorňuje, že různé metodické přístupy nejsou srovnatelné a že tkáňová architektura a „buněčný mikroenvironment“ se významně podílejí na výsledcích testů.

Svůj dlouhodobý vývoj prodělala i kultivační média. Teprve v posledním desetiletí jsou k dispozici média, která s komplementací růstovými faktory zajišťují podmínky blízké podmínkám *in vivo*.

Některé problémy *in vitro* prediktivní chemoterapie

Jednou z oprávněných kritik modelu *in vitro* pro volbu individualizované protinádorové léčby je sporná reprezentativnost k reálným poměrům *in vivo*. V této souvislosti se nabízí několik diskutovatelných otázek. Samotný proces přípravy monocelulární suspenze z nádorové tkáně a přenos buněk či tkáňových fragmentů do ne zcela fyziologického prostředí, představuje stresovou situaci, které může výrazně ovlivnit buněčnou kinetiku, metabolickou aktivitu a poměr cyklujících a necyklujících elementů. Uvážíme-li, že v testech lékové rezistence se hodnotí efekt farmaka po krátkodobé 24 až 48 hodinové expozici a že řada z těchto látek je fázově specifická, nelze vyloučit, že výsledek bude ovlivněn počtem cyklujících buněk, které v době kontaktu s cytostatikem projdou fází buněčného cyklu v níž jeho aktivita dominuje. Diskutovanou otázkou je optimální interval pro přidávání farmak po přenesení buněk do *in vitro* podmínek. Jak bezprostřední expozice po explantaci, tak i expozice po kratší či delší adaptační fázi buněk mají svá pro i proti. Zastánci provedení testu co nejdříve po založení primokultury argumentují zachováním profilu buněk, který je relativně blízký situaci *in vivo*, kritici uvádí, že výsledky jsou ovlivněny nefyziologickou manipulací buněk a arteficiálním médiem. Svá pozitivní a negativní mají přístupy v nichž populace buněk přijde do kontaktu s cytostatikem až po několikadenní adaptaci na podmínky *in vitro*. Na jedné straně jsou minimalizovány aktuální stresové faktory, na straně druhé však, čím delší kultivace *in vitro*, tím větší riziko, že do kontaktu s cytostatikem přichází selektovaná, tj. neadaptabilnější populace buněk, genotypově i fenotypově značně odlišná od původního nádoru.

Dalším, neméně závažným problémem je volba koncentrací testovaných látek. V žádném případě nelze ani aproximativně počítávat dávky pro *in vitro* testy z dávek, které se využívají terapeuticky. U *in vitro* systému není biologická dostupnost léku ovlivňovaná vazbou na plasmatické bílkoviny, degradačními, či aktivizačními procesy, biologickým pokačím ani vaskularizací cílových struktur. Chemoterapeutikum zde působí na „nahou“ buňku v koncentraci téměř identické s koncentrací přidanou do kultury. Obecně platí, že čím více koncentrací v rozsahu $ED_{0.1}$ - $ED_{1.00}$ (effective dose) je použito, tím větší možnost přesnější interpretace výsledků.

Orientačním zdrojem pro výběr vhodných koncentrací mohou být křivky závislosti účinků na dávce v modelových buněčných liniích. K diskutovaným problémům *in vitro* prediktivní terapie patří již zmíněné možné ovlivnění výsledků jejich nadměrnou kontaminací normálních diploidních elementů. Tato kontaminace není kritická pro klonovací metody, ale u neklonovacích metod může hrát určitou roli. Zásadní informací o tom, zda pracujeme převážně s maligní populací buněk a do jaké míry je tato kultura kontaminována normálními buňkami, nám může podat imunocytochemická analýza.

Na základě našich zkušeností je zřejmé, že závěry o chemosensitivitě/chemorezistenci nádorů z pouhého počtu živých a mrtvých buněk *in vitro* jsou jen hrubým odhadem účinnosti léčiva, aniž by braly v úvahu jemnější buněčné změny. Současné poznatky o mechanismu účinku, rezistenci a reparačních procesech představují možnost lépe charakterizovat stupeň buněčného poškození a rezistence. Přínosem je hodnocení aktivity MDR genů, cyklinu D₁, telomerázy, hladiny onkoproteinu p53 a apoptózy, která je považována za „end point“ účinku většiny protinádorových chemoterapeutik.

I přes řadu uvedených problémů lze souhlasit s příznivci hodnocení lékové rezistence *in vitro* v tom, že přináší informace, které mohou být nápomocné ve volbě protinádorových chemoterapeutik pro individuálního pacienta a že efektivní cytostatikum v *in vitro* testu bude s několikanásobně vyšší pravděpodobností účinnější i *in vivo* než cytostatikum bez účinnosti v *in vitro* podmínkách. Je třeba akceptovat i kritické názory, které pro posouzení klinické validity tohoto vyšetření vyžadují prospektivní randomizované klinické studie v nichž by bylo možné srovnat standardní terapii s volbou léčby na základě *in vitro* testů.

Podrobnější informace je možné získat na pracovištích autorů, jejichž příspěvky jsou publikovány v tomto zvláštním čísle a na klinice nemocí plicní a tuberkulózy FN Plzeň. Ve Slovenské republice je metodika hodnocení lékové rezistence nádorů *in vitro* zaváděna a využívána v Ústavu farmakologie LF UPJŠ v Košicích.

Literatura

- Black, M. M. and Speer, F. D. Further observations on the effects of cancer chemotherapeutic agents on the *in vitro* dehydrogenase activity of cancer tissue., J Natl Cancer Inst. 14: 1147-1158,1954.
- Hamburger, A. W. and Salmon, S. E. Primary bioassay of human tumor stem cells, Science. 197:461-463,1977.
- Rolhion, C, Penault-Llorca, F., Kemeny, J. L., Kwiatkowski, F., Lemaire, J. J., Chollet, P., Finat-Duclos, F., and Verrelle, P. 0(6)-methylguanine-DNA methyltransferase gene (MGMT) expression in human glioblastomas in relation to patient characteristics and p53 accumulation, Int J Cancer. 84: 416-20, 1999.
- Weisenthal, L. M., Su, Y. Z., Duarte, T. E., and Nagourney, R. A. Non-clonogenic, *in vitro* assays for predicting sensitivity to cancer chemotherapy, Prog Clin Biol Res. 276: 75-92,1988.
- Hoffman, R. M. *In vitro* sensitivity assays in cancer: a review, analysis, and prognosis, J Clin Lab Anal. 5:133-43,1991.
- Tveit, K. M., Gundersen, S., Hoie, J., and Pihl, A. Predictive chemosensitivity testing in malignant melanoma: reliable methodology—ineffective drugs, Br J Cancer. 58:734-7,1988.
- Shimoyama, Y., Kubota, T., Watanabe, M., Ishibiki, K., and Abe, O. Predictability of *in vivo* chemosensitivity by *in vitro* MTT assay with reference to the clonogenic assay, J Surg Oncol. 41: 12-8,1989.
- Pavlik, E. J., Flanigan, R. C., van Nagell, J. R., Jr., Hanson, M. B., Donaldson, E. S., Keaton, K., Doss, B., Bartmas, J., and Kenady, D. E. Esterase activity, exclusion of propidium iodide, and proliferation in tumor cells exposed to anticancer agents: phenomena relevant to chemosensitivity determinations, Cancer Invest. 3:413-26,1985.
- Tanigawa, N., Kern, D. H., Hikasa, Y., and Morton, D. L. Rapid assay for evaluating the chemosensitivity of human tumors in soft agar culture, Cancer Res. 42: 2159-64,1982.
- Schadendorf, D., Worm, M., Algermissen, B., Kohlbus, C. M., and Czarnetzki, B. M. Chemosensitivity testing of human malignant melanoma. A retrospective analysis of clinical response and *in vitro* drug sensitivity, Cancer. 73: 103-8,1994.
- Tveit, K. M., Fodstad, O., and Pihl, A. The usefulness of human tumor cell lines in the study of chemosensitivity. A study of malignant melanomas, Int J Cancer. 28: 403-8,1981.
- Mosmann, T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays, J Immunol Methods. 65:55-63,1983.
- Denizot, F. and Lang, R. Rapid colorimetric assay for cell growth and survival. Modifications to the tetrazolium dye procedure giving improved sensitivity and reliability, J Immunol Methods. 89:271-7,1986.
- Furukawa, T., Kubota, T., Suto, A., Takahara, T., Yamaguchi, H., Takeuchi, T., Kase, S., Kodaira, S., Ishibiki, K., and Kitajima, M. Clinical usefulness of chemosensitivity testing using the MTT assay, J Surg Oncol. 48: 188-93, 1991.
- Saikawa, Y., Kubota, T., Furukawa, T., Suto, A., Watanabe, M., Kumai, K., Ishibiki, K., and Kitajima, M. Single-cell suspension assay with an MTT end point is useful for evaluating the optimal adjuvant chemotherapy for advanced gastric cancer, Jpn J Cancer Res. 85:762-5,1994.
- Suto, A., Kubota, T., Shimoyama, Y., Ishibiki, K., and Abe, O. MTT assay with reference to the clinical effect of chemotherapy, J Surg Oncol. 42:28-32,1989.
- Yamaue, H., Tanimura, H., Nakamori, M., Noguchi, K., Iwahashi, M., Tani, M., Hotta, T., Murakami, K., and Ishimoto, K. Clinical evaluation of chemosensitivity testing for patients with colorectal cancer using MTT assay, Dis Colon Rectum. 39:416-22,1996.
- Cole, S. P. Rapid chemosensitivity testing of human lung tumor cells using the MTT assay, Cancer Chemother Pharmacol. 17: 259-63,1986.
- Carmichael, J., DeGraff, W. G., Gazdar, A. F., Minna, J. D., and Mitchell, J. B. Evaluation of a tetrazolium-based semiautomated colorimetric assay: assessment of radiosensitivity, Cancer Res. 47:943-6,1987.
- Sevin, B. U., Perras, J. P., Averette, H. E., Donato, D. M., and Penalver, M. Chemosensitivity testing in ovarian cancer, Cancer. 71:1613-20,1993.
- Hengstler, J. G., Lange, J., Kett, A., Dornhofer, N., Meinert, R., Arand, M., Knapstein, P. G., Becker, R., Oesch, F., and Tanner, B. Contribution of c-erbB-2 and topoisomerase IIalpha to chemoresistance in ovarian cancer, Cancer Res. 59: 3206-14,1999.
- Carrel, A. On the permanent life of tissue outside the organism, J. Exp. Med. 15: 516-528,1912.
- Leighton, J. The growth patterns of some transplantable animal tumors in sponge matrix tissue culture, J Natl Cancer Inst. 15: 275-293,1954.
- Hoffman, R. M., Connors, K. M., Meerson-Monosov, A. Z., Herrera, H., and Price, J. H. A general native-state method for determination of proliferation capacity of human normal and tumor tissues *in vitro*, Proc Natl Acad Sci U S A. 86: 2013-7,1989.
- Furukawa, T., Kubota, T., Watanabe, M., Kase, S., Takahara, T., Yamaguchi, H., Takeuchi, T., Teramoto, T., Ishibiki, K., Kitajima, M., and et al. Chemosensitivity testing of clinical gastrointestinal cancers using histoculture and the MTT end-point, Anticancer Res. 12:1377-82,1992.
- Robbins, K. T., Connors, K. M., Storniolio, A. M., Hanchett, C., and Hoffman, R. M. Sponge-gel-supported histoculture drug-response assay for head and neck cancer. Correlations with clinical response to cisplatin, Arch Otolaryngol Head Neck Surg. 120: 288-92, 1994.
- Miller, B. E., Miller, F. R., and Heppner, G. H. Factors affecting growth and drug sensitivity of mouse mammary tumor lines in collagen gel cultures, Cancer research. 45:4200-4205,1985.
- Hoffman, R. M. The three-dimensional question: can clinically relevant tumor drug resistance be measured *in vitro*?, Cancer Metastasis Rev. 13:169-73,1994.