Nové možnosti testování chemosenzitivity u nádorových onemocnění

New Approaches for Chemosensitivity Testing in Malignant Diseases

Sommerová L., Michalová E., Hrstka R.

RECAMO, Masarykův onkologický ústav, Brno

Souhrn

Východiska: Vzhledem k nezastupitelné úloze chemoterapie při léčbě nádorových onemocnění se onkologický výzkum zaměřil na zvýšení účinnosti jednotlivých léčiv a maximální zmírnění, ne-li kompletní potlačení nežádoucích účinků. Vhodná léčba je primárně volena podle základních klinicko-patologických diagnostických kritérií, jako je velikost nádoru, stupeň diferenciace a přítomnost či absence standardních markerů. Situaci však komplikuje variabilita mezi jednotlivými pacienty spolu se značnou heterogenitou vlastního nádoru. Detailní charakterizace intratumorální heterogenity a získání spolehlivějších ukazatelů účinnosti léčiv by tak mělo vést k posílení personalizované terapie. Vývoj a výběr spolehlivých modelů tudíž představuje důležitou otázku ve výzkumu zaměřeném na predikci citlivosti nádorových buněk k léčbě. **Cíl:** Práce shrnuje poznatky o testovacích systémech zaměřených na stanovení citlivosti či rezistence nádorových buněk k chemoterapii a jejich zavádění do onkologické praxe od prvních dnes již historických pokusů až po současnost se snahou posoudit jejich uplatnění ve stávající klinické praxi či blízké budoucnosti. Značný důraz je kladen na porovnání 2D a 3D *in vitro* buněčných modelů, neboť jejich význam a popularita konstantně narůstá. Pozornost je též věnována systémům *in vivo*, které v poslední době zaznamenaly nemalý progres a jsou v rámci klinických studií testovány k predikci odpovědi na podávanou terapii. **Závěr:** Práce uvádí stručný přehled testů chemosenzitivity a hodnotí význam jednotlivých testů vzhledem k jejich zapojení do rozhodovacího procesu a stratifikace pacientů s cílem predikovat klinickou odpověď konkrétních pacientů a přispět tak k rozvoji cílené personalizované terapie.

Klíčová slova

techniky tkáňových kultur – individualizovaná medicína – screening léčiv – biologické modely – nádorové buněčné linie – karcinom – cytotoxické testy

Summary

Background: Due to the irreplaceable role of chemotherapy in cancer treatment, research has focused on improving the efficacies of individual drugs and minimizing, or completely suppressing, their negative side effects. Based on long-term experience and the results of clinical trials, the selection of appropriate treatment is currently based on classical clinical diagnostic criteria, such as tumor size, grade, and the presence or absence of standard markers. However, complications arise due to variability between patients and tumor heterogeneity. Characterization of intratumoral heterogeneity and acquisition of more reliable drug performance indicators should improve personalized therapy. Development and selection of suitable models are therefore important issues in cancer research focused on predicting sensitivity to therapy. **Aim:** This work provides an overview of various chemosensitivity tests that have been previously employed and those that are currently used. Great emphasis is placed on comparing 2D and 3D cell culture models, since their importance and popularity are increasing. Particular attention is paid to *in vivo* systems, which have significantly improved recently and are tested in clinical trials to predict responses to therapy. **Conclusion:** This work provides a brief overview of chemosensitivity tests, focusing on the importance of individual tests and their application in decision-making and patient stratification to improve the clinical responses of patients and the development of targeted personalized therapy.

Key words

cell culture techniques – personalized medicine – drug screening – biological models – tumor cell lines – carcinoma – cytotoxicity assays

Práce byla podpořena projektem MŠMT – NPU I - LO1413 a GAČR 17-05838S.

This work was supported by the project MEYS-NPS I-LO1413 and GACR 17-05838S.

Autoři deklarují, že v souvislosti s předmětem studie nemají žádné komerční zájmy.

The authors declare they have no potential conflicts of interest concerning drugs, products, or services used in the study.

Redakční rada potvrzuje, že rukopis práce splnil ICMJE kritéria pro publikace zaslané do biomedicínských časopisů.

The Editorial Board declares that the manuscript met the ICMJE recommendation for biomedical papers.

doc. Mgr. Roman Hrstka, Ph.D.
RECAMO
Masarykův onkologický ústav
Žlutý kopec 7
656 53 Brno
e-mail: hrstka@mou.cz

Obdrženo/Submitted: 21. 9. 2017
Přijato/Accepted: 20. 12. 2017

doi: 10.14735/amko2018117

Úvod

Za ideálních podmínek ošetřující lékař správně diagnostikuje onemocnění a nasadí vhodnou léčbu, která bere v potaz celkový zdravotní stav pacienta a je současně maximálně účinná, avšak pokud možno bez nežádoucích vedlejších účinků (NÚ). V případě nádorových onemocnění je situace mnohem komplikovanější, neboť rakovina je značně heterogenní onemocnění. Jinými slovy i v případě nádorů nacházejících se ve stejné tkáni nemusí být tatáž léčba vždy rovnocenně účinná. Kromě toho je stále častěji skloňován i fenomén tzv. intratumorální heterogenity. To znamená, že nádorová masa je tvořena buněčnými populacemi (klony), které se mohou významně lišit v celé řadě vlastností vč. citlivosti k podávané léčbě. Avšak i přes tato úskalí jsou usilovně vyvíjeny testovací systémy, které by umožnily účinně predikovat citlivost nádorů k dostupným léčebným modalitám a zefektivnily by tak vlastní terapeutický efekt za současného minimalizování pro organismus mnohdy značně devastujících NÚ protinádorové léčby.

Chemoterapie představuje jednu ze základních modalit při léčbě nádorových onemocnění. Jedná se o systémovou terapii, při níž jsou podávána tzv. cytostatika, jejichž cílem je usmrtit nádorové buňky. Přípravují se nejčastěji synteticky, případně se jedná o deriváty pocházející z rostlin či plísní. Cytostatika obecně zasahují do průběhu buněčného cyklu a brání dalšímu dělení buněk. Proto jsou k nim velmi citlivé právě rychle se dělící nádorové buňky, případně buňky se sníženou schopností opravovat poškozenou DNA. Je třeba si však uvědomit, že chemoterapie působí nespecificky a účinky cytostatik se manifestují i vzhledem k fyziologicky rychle se dělícím buňkám, a to je spojeno právě s řadou NÚ. Tato skutečnost je jedním z hlavních důvodů neuctahujícího výzkumného úsilí o vývoj nových, selektivnějších a současně účinnějších léků. Nemalý úspěch zaznamenaly např. inhibitory tyrozinkináz interferující s významnými onkogenními signálními dráhami [1]. Renesanci v současné době zažívá imunoterapie, která je efektivní u celého spektra nádorových

onemocnění, a není tudíž omezena jen na specifické skupiny nádorů a především její účinnost je dlouhodobá [2,3]. Dalším důležitým aspektem při léčbě nádorových onemocnění je možnost predikovat účinnost jednotlivých potenciálně aplikovatelných léků a zvolit tak pro daného pacienta co možná nejvhodnější, resp. nejúčinnější léčebný režim. První oficiální snahy v tomto směru se datují již ke konci první poloviny 20. století, kdy byly vyvíjeny a zaváděny první *in vitro* testy [4]. Přestože se jedná o značně atraktivní aplikovaný výzkum se zjevným praktickým uplatněním, dosud nebyl vytvořen, schválen ani systematicky zaveden univerzální protokol umožňující personalizovanou predikci chemosenzitivity u nádorových onemocnění.

Cílem této práce je shrnout poznatky o testovacích systémech založených na kultivaci nádorových buněk, příp. nádorových xenotransplantátů umožňujících stanovení citlivosti/rezistence nádorových onemocnění k chemoterapii vč. snahy o jejich zavádění do onkologické praxe od prvních dnes již historických pokusů až po současnost a posoudit jejich uplatnění ve stávající klinické praxi či blízké budoucnosti.

Historie testování chemosenzitivity nádorových onemocnění

Od 50. let minulého století byly vyvíjeny přístupy umožňující testování citlivosti lidských nádorových buněk k cytostatikům v podmínkách *in vitro* s cílem najít jednodušší alternativu k testům aktivity tehdy dostupných účinných látek prováděným především na hlodavcích.

První pokus popsali Black a Speer v roce 1954 [5]. Inkubovali řezy nádorové tkáně s cytostatiky a pozorovali inhibici metabolické aktivity buněk pomocí tetrazoliové soli. V několika následujících desetiletích byla publikována řada studií srovnávajících na podobném principu vyvinuté *in vitro* testy (ať již buňky kultivované v monovrstvě, nebo tkáňové řezy) s hodnocením citlivosti orgánových kultur *in vivo* s obecným cílem optimalizovat *in vitro* testy a přiblížit se stavu *in vivo*. Závěry mnoha z nich však připsaly, že korelace výsledků není abso-

lutní, přičemž testy *in vitro* jsou zatíženy řadou negativních faktorů, které jsou evokovány izolací buněk z původního mikroprostředí [6,7] a promítají se i do hodnocení metabolické aktivity buněk kultivovaných *in vitro*. Z metodických, tehdy zaváděných přístupů k testování životaschopnosti nádorových buněk se ujaly především ty, které byly založené na stanovení metabolické aktivity, jako je např. měření enzymatické aktivity sukcinát dehydrogenázy [5], kyselý fosfatázy [8,9] či založené na analýze inkorporace radioaktivně značených prekurzorů 3H-uridinu/3H-thymidinu během syntézy nukleových kyselin [10–12] v krátkodobých buněčných kulturách. Další skupinu představují metody hodnotící viabilitu testovaných buněk na bázi membránové integrity pomocí selektivního barvení mrtvých buněk. Tyto však byly obecně vnímány jako přístupy produkující nepřesné výsledky a v porovnání s ostatními metodami byly hodnoceny spíše jako nevyhovující [13,14].

V roce 1977 Hamburger a Salmon [15] kultivovali nádorové buňky na měkkém agarovém médiu a ke stanovení jejich chemosenzitivity použili test nazvaný HTCA (Human Tumor Colony Assay), který je založen na selektivním růstu nádorových buněk na médiu umožňujícím vznik kolonií. Přibližně po 10–21 dnech kultivace jsou kultury ovlivněné cytostatiky a kontrolní kultura vzájemně porovnány vzhledem k počtu vytvořených kolonií, z čehož se následně vyvozuje účinek testované látky.

Kangas et al [16] a Sevin et al [17,18] navíc využili k testování chemorezistence *in vitro* měření hladiny adenosin trifosfátu (adenosine triphosphate – ATP) jako základního zdroje energie živých buněk, a to pomocí bioluminiscence. Izolované buňky nádoru/shluky buněk byly kultivovány na agarovém médiu a po 6–7 dnech byl ATP z buněk extrahován, přidán komplex luciferin-luciferáza a hladina bioluminiscence byla měřena luminometrem.

Nejrozšířenější metodou stanovení citlivosti nádorových buněk *in vitro* se však stal tetrazoliový test (MTT test) [5,19,20] vycházející z původního konceptu a postupně zdokonalovaný díky vývoji kulturačních médií a laboratorního vybavení.

Izolované buňky nádoru jsou kultivovány v kultivačních deskách s médiem obsahujícím cytostatikum o různých koncentracích a přežívání buněk v tomto prostředí je hodnoceno na základě zachování jejich metabolické aktivity. Ta je hodnocena mírou schopnosti živých buněk redukovat žlutou rozpustnou tetrazoliovou sůl, MTT (3-[4,5-dimethylazol-2-yl]-2,5-diphenyl-2H-tetrazolium bromid), pomocí mitochondriálních oxidoreduktáz na nerozpustný modrý formazan [21], který je následně rozpuštěn organickým rozpouštědlem [22,23]. Absorbance barevného produktu je následně měřena fotometricky a hodnoty získané u buněk kultivovaných s testovaným cytostatikem jsou srovnány s hodnotami identické kontrolní kultury bez ovlivnění. Následně jsou sestaveny křivky přežití a hodnocena inhibiční koncentrace (IC) nebo též efektivní koncentrace (EC) cytostatika. Tato metoda byla taktéž zavedena v Masarykově onkologickém ústavu v Brně s cílem konsekutivně testovat chemorezistenci u vzorků odebraných v rámci léčby u většiny onkologických diagnóz [24,25]. Výsledky však nebyly uspokojivé a i přes další optimalizace [26] bylo rutinní testování v roce 2009 ukončeno.

Všechny dosud jmenované přístupy představují maximálně zjednodušené metody testování chemorezistence *in vitro* v 2D uspořádání, a to v podstatě až na úrovni jednotlivých separovaných buněk. Na druhou stranu je však třeba si uvědomit, že ve své jednoduchosti systém pomíjí vlastnosti nádorové tkáně (komplexnost a heterogenitu) a 2D uspořádání se značně vzdaluje podmínkám *in vivo*, proto může docházet k nemalému zkreslení dat. Souběžně se tedy objevují první práce pokoušející se kultivovat nádorové buňky v 3D uspořádání a toto využít i k testování chemosenzitivity.

3D *in vitro* modely

Již na počátku 20. století popsal Carrel [27] úspěšné experimenty s tkáňovými fragmenty dlouhodobě kultivovanými v podmínkách *in vitro*. V 50. letech pak Leighton provedl řadu *in vitro* studií, při nichž nádorové buňky nebo jejich shluky byly kultivovány na pórovité ma-

trix (sponge-matrix) s cílem lépe simulovat 3D prostředí *in vivo* [28,29].

Rotman et al v roce 1988 [30] získali jemnou homogenizací nádoru shluky buněk (označené jako „micro-organs“), které vystavil fluorescein-acetátu s cílem selektovat „živé“ shluky pomocí fluorescence, tzv. fluorescent cytoprinting. Ty následně imobilizoval na matrix z celulózových vláken impregnovaných kolagenem a inkuboval 5–10 dní na ocelové destičce v Petriho misce s kultivačním médiem spolu s přidavkem testovaného cytostatika. Následně byla vyvolána další fluorescence a účinek cytostatika byl hodnocen porovnáním hladin fluorescence před a po vystavení shluků cytostatiku. Vescio [31] vyvinul systém histokultury *in vitro*, tzv. HDRA (Histoculture Drug-response Assay), v níž byly kousky (1–2 mm) nádoru kultivovány na gelu (native-state collagen-sponge gel) odvozeném od extracelulární matrix prasečí kůže podporující 3D růst nádoru, který byl ponořen do kultivačního média s cytostatiky v kultivační misce.

V současné době existuje řada modelových systémů, které se mohou uplatnit nejen v rámci výzkumu zaměřeného na biologii nádorové buňky, ale i prakticky např. při screeningu nových léčivých přípravků. Na druhou stranu však úspěšnost potenciálních protinádorových léků, které se ukazovaly jako velmi slibné v rámci testování v *in vitro* 2D kultivačních systémech, bývá v klinické praxi jen okolo 5–10 % [32–34]. Využití zvířecích modelů, které obvykle představuje navazující fázi v rámci preklinického testování, je naopak finančně i časově značně náročné a navíc ani tyto modelové systémy plně neodpovídají lidské fyziologii [35].

Tato skutečnost tedy nutí k vývoji modelového systému, který by umožnil monitorovat buněčnou proliferaci a životaschopnost (viabilitu) nádorových buněk a současně co možná nejvěrněji napodoboval situaci v lidském těle. V optimálním případě by pak měl současně umožňovat i monitorování migrace a invazivity nádorových buněk do přilehlého okolí, neboť se jedná o významné parametry spojené s tvorbou metastáz, které představují jednu z hlavních příčin

selhání protinádorové terapie [36]. Dalším v dnešní době stále více skloňovaným požadavkem na vhodný buněčný model je možnost analýzy angiogeneze a schopnosti interagovat, resp. uniknout imunitnímu systému organismu, ve kterém se nádor vytvořil [3,35].

Třidimenzionální (3D) kultivační modely řadu výše zmíněných vlastností splňují a představují tak atraktivní nástavbu testování cytotoxicity i efektivnosti a bezpečnosti nových léčiv v 2D *in vitro* podmínkách, a v řadě aspektů dokonce překonávají experimenty na zvířecích modelech [37]. Zavedení 3D *in vitro* modelů tak jednoznačně vedlo k eliminaci málo účinných protinádorových léků a redukcí počtu experimentů na zvířecích modelech [38–40].

3D buněčné kultury jsou pokusem o simulaci prostředí tkání, ve kterých jsou buňky mezi sebou spojeny, interagují spolu a reagují na podněty z okolí [41]. Existuje celá řada variací 3D modelů. Dnes již klasickým a nejjednodušším 3D modelem jsou tzv. multicelulární sféroidy (MCS), ve kterých se adherentní nádorové buňky shlukují do útvarů připomínajících koule. Během přípravy sféroidů je možné využít syntetické buněčné lešení nebo přirozenou schopnost buněk produkovat extracelulární matrix (ECM). Pro vytvoření MCS jsou kritické 3 etapy:

1. Vazba dlouhých řetězců ECM tvořících vlákna na integriny nacházející se na buněčném povrchu, což umožní přiblížení buněk rozptýlených v suspenzi a zajistí tvorbu agregátu. Buněčné shlukování pak aktivuje expresi kadherinů.
2. Kadheriny jsou následně akumulovány na buněčném povrchu.
3. Dochází k vytvoření mezibuněčných homofilických vazeb kadherin-kadherin, čímž vzniká MCS [42].

Důležitým krokem k vytvoření MCS je taktéž nutnost kultivovat buňky v prostředí, kde je adhezivita mezi buňkami silnější než přilnavost buněk k substrátu. Z toho důvodu se využívají kultivační desky se speciálním nepřilnavým povrchem, případně se používá metoda visící kapky, agitační míchaní nebo elektricky/magneticky indukovaná tvorba

Obr. 1. Schematické zobrazení rozdílů 2D a 3D kultivačních metod.

Nádorové buňky kultivované ve 2D podmínkách jsou přichyceny k plastovému podkladu, vykazují stejnou míru proliferace, jsou rovnoměrně vystavené působení látek z vnějšího prostředí a interagují se sousedními buňkami pouze malou částí svého povrchu. Naopak buňky kultivované ve 3D kultivačních podmínkách vytváří několik zón dle schopnosti proliferovat – zónu proliferace, zónu quiescence a nekrotické jádro. Takto uspořádaným nádorovým buňkám je umožněno vytvářet mezibuněčné interakce a interagovat s okolním extracelulárním matrixem (ECM). Kultivace buněčného sféroidu rovněž simuluje vytvoření gradientu léčiv, růstových faktorů, plynů a dalších produktů metabolismu. Různá míra hypoxie a hladovění se pak promítá ve zvýšené rezistenci k podávaným léčivům.

MCS [43]. Na našem pracovišti se nejčastěji používá metoda visící kapky – buňky se nanesou v kapce na víčko kultivační nádoby a po jejím otočení vznikne kapka. Buňky zde nemají možnost přisednout k povrchu a vytvářejí MCS ve spodní části kapky na rozhraní kultivačního média a vzduchu.

Další možností přípravy 3D kultur je využití trojrozměrných polymerních lešení. Nejčastěji se používají přírodní hydrogely, jako je Matrigel (gelová směs proteinů extracelulární matrix) nebo kolagen, které současně simulují přirozené vytváření spoju mezi nádorovými buňkami a ECM, která rovněž významně ovlivňuje buněčnou signalizaci [44,45].

Společná kultivace nádorového 3D sféroidu s dalšími buňkami jiného typu (např. endoteliální buňky, fibroblasty apod.) umožňuje kopírovat vliv nádorového mikroprostředí na progresi nádorového onemocnění [46]. Oproti nádorovým buňkám majícím při kultivaci v monovrstvě na Petriho misce plochý „rozprostřený“ tvar, vykazují buňky tvořící sféroid morfologii, která mnohem věrněji kopíruje morfologii buněk uvnitř nádoru, ze kterého byly odvozeny [47]. Dále buňky kultivované v monovrstvě proliferují v podstatě rovnoměrně, zatímco vytvořením buněčného sféroidu dochází ke vzniku rozdílných zón tvořených buňkami v různých fázích buněč-

ného cyklu, s čímž je spojena i rozdílná rychlost proliferace [48,49]. Rovněž dochází k vytvoření gradientu živin, růstových faktorů, léčiv, plynů a dalších metabolických produktů a ke změnám v pH, které charakterizují nádor *in vivo*. Naopak buňky v 2D modelech jsou rovnoměrně vystavené působení látek, živin, růstových faktorů a léčiv nacházejících se v kultivačním médiu (obr. 1). Napodobování této vlastnosti nádoru *in vitro* může mít ve svém důsledku nejen stimulační nebo inhibiční efekt na progresi nádoru, ale současně se může podílet i na účinnosti terapie a odpovědi na ni [37,50]. Navíc bylo prokázáno, že v nádorové tkáni dochází vlivem hypoxie, hlado-

vění (z důvodu zhoršeného zásobování živinami) a sníženého pH k indukci exprese proteinů spojených s rezistencí k chemoterapii, např. MRP1 (multidrug resistance protein) nebo LRP (lung resistance-related protein) [51,52].

Rozdíly v intenzitě proliferace spolu s vytvořením gradientu v distribuci léčiva jsou hlavními důvody, proč jsou nádorové buňky kultivované v 3D modelu zpravidla více rezistentní k chemoterapii v porovnání s týmiž buňkami kultivovanými v monovrstvě [53–55]. Příkladem může být:

1. Dvojnásobné snížení citlivosti buněk melanomu kultivovaných v 3D podmínkách vzhledem k působení NPrCAP (4N-acetyl-4S-cysteaminylfenol) [56].
2. Snížení cytotoxického účinku paklitaxelu o 20–40 % u epiteliálních ovariálních buněk kultivovaných ve 3D modelu v porovnání s buňkami kultivovanými ve 2D podmínkách [54].
3. Významně snížená účinnost všech čtyř běžně používaných modalit při léčbě kolorektálního karcinomu (colorectal cancer – CRC) – melfalan, 5-fluorouracil, oxaliplatin a irinotekan – u buněčné linie HCT-116 odvozené od CRC, kultivované ve 3D sféroidech v porovnání s buňkami ve 2D kultivačním modelu, u něhož byly tytéž látky výrazně efektivnější [55].

Klíčovou úlohu při odpovědi na terapii hrají lokalizace a exprese buněčných povrchových receptorů spolu s buněčnými signálními drahami, jejichž aktivita se značně liší při porovnání 2D a 3D modelů, byť jsou tvořeny původně stejnými buňkami. To úzce souvisí se skutečností, že buňky kultivované ve 2D modelech mohou být citlivější k podávané terapii, než je tomu ve skutečnosti [57]. Současné pak může nastat i opačná situace, kdy jsou k terapii senzitivní pouze buňky kultivované v 3D modelu s tím, že *in vitro* 2D model poskytuje falešně negativní výsledky.

Přestože testování chemosenzitivity, resp. chemorezistence založené na trojrozměrných kultivacích teprve vstupuje do povědomí odborné veřejnosti a většina experimentů byla provedena prozatím jen s ustavenými nádorovými buněčnými liniemi, v poslední době

se stále hlasitěji o slovo hlásí příprava a praktické využití primárních buněčných linií (tzv. primokultur) získaných přímo od pacientů. Jednoznačně se jedná o krok směrem k rozvoji personalizované medicíny. Kondo et al [58] ve své studii úspěšně izolovali buňky z CRC od řady pacientů a připravili z nich 3D kultury *in vitro*, které věrně kopírovaly vlastnosti nádoru *in vivo*. Následně na 3D sféroidech analyzovali chemosenzitivitu a aktivaci signálních drah. Podařilo se jim prokázat, že odpověď na terapii 5-fluorouracilem (5-FU) je individuální. U tří pacientů byl růst sféroidů inhibován už při koncentraci 0,1 µg/ml, zatímco ve dvou případech ani koncentrace 10 µg/ml nebyla dostatečně účinná, aby docházelo k inhibici růstu sféroidů.

Vzhledem k obrovskému přínosu 3D kultur je v současné době hlavní snahou ve výzkumu nových protinádorových léků plnohodnotné začlenění trojrozměrně kultivovaných nádorových orgánoidů do preklinického „highthroughput“ screeningu léčiv. S tím úzce souvisí vývoj obecně platných postupů pro přípravu těchto 3D kultur, jejich management a testování citlivosti k léčbě, které musí být aplikovatelné napříč všemi světovými laboratořemi. Jednou z prvních vlašťovek by mohla být příprava uniformních reprodukovatelných sféroidů v 384 jamkovém formátu pomocí metody visící kapky. Tato metoda je plně kompatibilní s automatizovanými robotickými systémy běžně využívanými při velkokapacitním screeningu léčiv a byla nedávno úspěšně využita při testování citlivosti různých 3D kultur k 5-fluorouracilu [59].

Významným aspektem souvisejícím se zdomácněním 3D kultur v aplikovaném výzkumu zaměřeném na testování účinnosti nových nebo již dříve používaných léčiv představuje po jejich zavedení a optimalizaci také automatizace, jež by umožnila rutinní využití 3D kultur v běžné praxi při výzkumu jednotlivých nádorových onemocnění. Jako ilustrativní příklad mohou sloužit nedávno vytvořené platformy pro studium biologie nádorových kmenových buněk získaných z ascitu od pacientek s karcinomem vaječníku [60].

Nemalý význam je též kladen na vývoj metodik vedoucích k vytváření sféroidů,

kteří by byly reprodukovatelné, snadno proveditelné a přitom cenově dostupné. Jednou z možností mohou být modifikace dříve používaných metod, např. analýza schopnosti nádorových buněk tvořit kolonie po expozici léčivu, která byla již úspěšně převedena do 3D formátu a nyní je ve stavu vývoje plně automatizovaného systému [61]. Nedávno byla publikována studie, v rámci které se podařilo připravit platformu pro jednoduché a současně kvantitativní testování chemosenzitivity buněk v 3D formátu [62]. Byla však pozorována různá míra úspěšnosti tvorby sféroidů pohybující se v rozmezí 50–99 % [63].

Hlavním přínosem testů chemosenzitivity je predikce citlivosti k plánované léčbě a s tím spojená selekce pacientů, kteří budou z léčby profitovat. Pěkným příkladem je tzv. CD-DST (Collagen gel Droplet-embedded culture Drug Sensitivity Test), který byl vyvinut již před 20 lety [64], avšak jeho přednosti v testování chemosenzitivity různých nádorů se využívají i v současnosti. CD-DST byl využit k predikci rezistence pacientů s hepatocelulárním karcinomem k standardně podávané léčbě a v související klinické studii umožnil poměrně spolehlivě stanovit, který z pacientů bude z adjuvantní chemoterapie skutečně profitovat [65,66]. Jen v roce 2017 bylo publikováno hned několik prací, které se zabývaly aplikací CD-DST u dalších malignit, jako je karcinom dutiny ústní, plic nebo nádory trávicího traktu [65,67,68].

Predikce chemosenzitivity s využitím *in vivo* modelů

Historicky tento přístup vychází z tzv. xenogenních (xenograftových) modelů, kdy je nádorová linie (většinou lidská) transplantována imunodeficitnímu xenogennímu příjemci. Nejčastěji se jedná o athymické Nu/Nu myši (chybí brzlík, neprodukují T buňky) nebo SCID myši (severe combined immunodeficiency disease), které nesou autozomalně recesivní mutaci SCID způsobující těžkou kombinovanou imunodeficienci (chybí protilátková i T buněčná imunita) a hodnocena je obvykle dynamika nádorového růstu a parametry přežití. V současnosti se při testování chemosenzitivity *in vivo* uplatňují zejména myší modely,

Obr. 2. Schematické zobrazení přípravy xenogenních myších modelů.

Kousky resekované nádorové tkáně mohou být přímo vneseny do imunodeficitních myší, častěji se však provádí homogenizace a získaná suspenze nádorových buněk je následně aplikována do imunodeficitních myší. Takto připravené xenogenní myší modely pak mohou sloužit buď k získání většího množství téměř identické nádorové masy vhodné pro další testování, nebo v případě dostatečného množství nádorového materiálu jsou přímo vystaveny působení příslušných chemoterapeutik s cílem monitorovat citlivost nádorových buněk k testovaným léčebným modalitám.

kteří vykazují ještě vyšší stupeň imunodeficiency v porovnání s klasickými xenogenními modely. Typickým příkladem je kmen NOD (non-obese diabetic)/SCID, u něhož nedochází k rozvoji diabetu, avšak myši vykazují sníženou aktivitu NK (natural killer) buněk a vrozené imunity vůbec, což až 10násobně zvyšuje toleranci vůči lidským hematopoetickým buňkám. Jiným příkladem je inbrední kmen nesoucí homozygotní mutaci IL2rg^{-/-} (interleukin-2 receptor), která potlačuje tvorbu T a B lymfocytů a brání vzniku NK buněk. Křížením těchto dvou kmenů vznikl hybridní kmen NOD/SCID IL2rg^{-/-}, který svými vlastnostmi umožňuje a zároveň významně zvyšuje úspěšnost uchycení a růstu nádorových buněk, a dokonce i dalších lidských tkání vč. kmenových a progenitorových buněk izolovaných z pupečnickové krve nebo kostní dřeně.

Imunodeficitní myši nesoucí lidské xenogenní nádory představují velice účinný nástroj v rámci preklinických studií zaměřených na screening potenciálních léčiv a identifikaci potenciálních terapeutických cílů. Současné mohou být

i přímo využity v rámci konceptu tzv. personalizované terapie. Zjednodušeně jsou nádorové buňky/tkáně jednotlivých pacientů vneseny do vhodných imunodeficitních myší, kterým jsou následně podávány protinádorové léčebné modalitativy s cílem vybrat co nejvhodnější lék, případně kombinaci vybraných léků.

Metodicky jsou xenogenní myší modely připravovány vnesením malého kousku nádoru nebo buněčné suspenze získané z krve pacienta či excizi nádorové tkáně. Při tomto procesu je bezpodmínečně nutná sterilita vnášené tkáně [69]. Nádorové buňky nebo kousky tkáně bývají často před vlastní injikací do myší smíchány s Matrigelem, který zefektivní růst xenogenního nádoru a přispívá k udržení původního fenotypu nádoru. Ze stejného důvodu bývají nádorové buňky často koinjikovány s dalšími buňkami, např. endoteliálními, stromálními, fibroblasty apod. V případě malého množství vstupního materiálu je nádorový materiál implantován subkutánně do omezeného počtu myší. Jakmile jsou xenogenní nádory dostatečně veliké, jsou odebrány a je z nich připra-

vena buněčná suspenze, jež se následně aplikuje do další generace myší.

Další nemalou výhodou xenogenních myších modelů je možnost implantace nádorových buněk či tkání dvěma způsoby – ortotopicky nebo heterotopicky. Hlavními výhodami heterotopické implantace je jednoduchost a snadné monitorování růstu nádoru, přičemž v případě solidních tumorů se většinou jedná o subkutánní aplikaci, zatímco v případě krevních malignit o aplikaci intravenózní. Technicky mnohem náročnější je ortotopická implantace, při které se nádorové buňky vnášejí do stejného typu tkáně, resp. orgánu, ze kterého původně pocházejí. Tím se pro lidské nádorové buňky vytváří přívětivější okolní mikroprostředí, které mnohem věrněji simuluje vnější nádorové milieu v lidském těle. U ortotopických implantací je obvykle pozorována zvýšená incidence metastáz, čehož lze využít k predikci účinnosti léčby metastatického onemocnění, příp. k identifikaci buněčných populací, resp. molekulárních biomarkerů, které jsou s procesem vzniku metastáz asociovány [70]. Xenogenní myší model lze případně vytvořit i z cir-

kulujících nádorových buněk pocházejících z krve pacientů s nádorovým onemocněním. Předpokládá se, že cirkulující nádorové buňky se oddělily z primárních nádorových ložisek a volně cirkulují ve vaskulárním systému, dokud se neuhnízdí na příhodném místě a nezačnou nekontrolovaně proliferovat, aby daly vzniknout sekundárnímu ložisku – metastázi. Takto připravené modelové xenogenní systémy pak mohou sloužit nejen k testování chemosenzitivity, ale obecně i ke studiu tumorigenicity a k molekulární charakterizaci cirkulujících nádorových buněk. Zjednodušený postup přípravy xenogenních myších nádorových modelů je schematicky znázorněn na obr. 2.

Závěr

Vzrůstající množství nových, poměrně bezpečných protinádorových léků cílených proti specifickým signálním drahám a procesům i na subcelulární úrovni dává naději, že v drtivé většině případů bude k dispozici vhodný a dostatečně účinný lék pro daného onkologického pacienta. V současné době kurativní onkologická terapie obecně vychází především z tradičních klinicko-patologických parametrů, jako je histologický typ a rozsah (staging) nádorového onemocnění. Toto pak může být dle typu nádoru doplněno dalšími testy zaměřenými na vybrané molekulárně biologické determinanty a genetickým vyšetřením umožňujícím detekci specifických mutací. Značně atraktivní možnost pak nabízí funkční testování, při kterém jsou buňky pocházející z biopsie daného nádoru testovány *ex vivo* na citlivost k potenciálním léčebným modalitám, přičemž ošetřující lékař pak může na základě výsledku rozhodnout o vhodném a co možná nejúčinnějším léčebném režimu.

Na druhou stranu je však třeba si uvědomit komplexitu nádorových onemocnění, kdy se i v rámci jednoho nádoru můžeme setkat s výraznou heterogenitou a léčba aplikovaná vůči dominantnímu buněčnému klonu nemusí být vždy dostatečně účinná vzhledem k dalším minoritním buněčným populacím, které se nacházejí v rámci jednoho nádoru. Je třeba také vzít v potaz tzv. kme-

nové nádorové buňky, které se obecně mnohem méně dělí, a jsou tedy i mnohem méně citlivé k chemoterapii a následně mohou být příčinou recidivy onemocnění.

V podstatě nejhorší prognóza je v onkologii spojena s přítomností vzdálených metastáz, které jsou také obvykle hlavní příčinou úmrtí na onkologická onemocnění. Při tvorbě metastáz dochází k transformaci epiteliálních buněk primárního nádoru na mezenchymální buňky, které vykazují mnohem agresivnější fenotyp co do invazivity a schopnosti migrovat. Takto pozměněné buňky se mohou uvolnit do vaskulárního systému a volně cirkulovat v těle, současně se však tyto buňky nacházejí ve stavu dormance, neboť mají transientně pozastavený buněčný cyklus, což způsobuje jejich rezistenci k systémově podávaným cytostatikům. Po ukončení léčby pak může dojít k reaktivaci těchto buněk a vytvoření sekundárního nádorového ložiska.

V kontextu výše uvedeného tedy ani funkční testování prováděné komplexně s rutinním klinicko-patologickým vyšetřením a dalšími sofistikovanými molekulárně biologickými metodami nemusí být dostatečné a jasně naznačuje potřebu nových dostupných individualizovaných přístupů umožňujících komplexní vyšetření na úrovni jednotlivých pacientů.

Literatura

1. Workman P, Brunton VG, Robins DJ. Tyrosine kinase inhibitors. *Semin Cancer Biol* 1992; 3(6): 369–381.
2. Scott AM, Wolchok JD, Old LJ. Antibody therapy of cancer. *Nat Rev Cancer* 2012; 12(4): 278–287. doi: 10.1038/nrc3236.
3. Chen L, Han X. Anti-PD-1/PD-L1 therapy of human cancer: past, present, and future. *J Clin Invest* 2015; 125(9): 3384–3391. doi: 10.1172/JCI80011.
4. Su YZ. Cancer chemosensitivity testing: Review. *J Cancer Ther* 2014; 5(7): 672–679. doi: 10.4236/jct.2014.57076.
5. 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): 1147–1158.
6. Kondo T, Imamura T, Ichihashi H. *In vitro* test for sensitivity of tumor to carcinostatic agents. *Gan* 1966; 57(2): 113–121.
7. Ichihashi H, Sasaki S, Kondo T. Colorimetric estimation of succinic dehydrogenase activity by neotetrazolium chloride as a tumor sensitivity test to chemotherapeutic agents. *Nagoya J Med Sci* 1971; 33(3): 247–256.
8. Imaizumi M. Study on the sensitivity test of carcinostatic agents by acid phosphatase activity. *Nagoya J Med Sci* 1972; 34(4): 315–333.

9. Kondo T, Ichihashi H, Imaizumi M. Predication of the effect of carcinostatic agents on tumor-bearing host by the sensitivity test using acid phosphatase activity *in vitro*. *Gan* 1976; 67(5): 633–639.
10. Volm M, Kaufmann M, Mattern J et al. Possibilities and limits of pre-therapeutic neoplasm sensitivity cytostatics tests under short-term conditions. *Schweiz Med Wochenschr* 1975; 105(3): 74–82.
11. Volm M, Kaufmann M, Mattern J et al. Sensitivity tests of tumors to cytostatic agents. I. Comparative investigations on transplanted tumors *in vivo* and *in vitro*. *Z Krebsforsch Klin Onkol Cancer Res Clin Oncol* 1975; 83(2): 85–96.
12. Wiskemann A, Schussmann M, Rothmann D et al. *In vitro* and *in vivo* sensitivity of animal and human melanomas to various chemotherapeutic agents. *Arch Dermatol Res* 1978; 262(3): 285–299.
13. Roper PR, Drewinko B. Comparison of *in vitro* methods to determine drug-induced cell lethality. *Cancer Res* 1976; 36(7 PT 1): 2182–2188.
14. Weisenthal LM, Dill PL, Kurnick NB et al. Comparison of dye exclusion assays with a clonogenic assay in the determination of drug-induced cytotoxicity. *Cancer Res* 1983; 43(1): 258–264.
15. Hamburger AW, Salmon SE. Primary bioassay of human tumor stem cells. *Science* 1977; 197(4302): 461–463.
16. Kangas L, Grönroos M, Nieminen AL. Bioluminescence of cellular ATP: a new method for evaluating cytotoxic agents *in vitro*. *Med Biol* 1984; 62(6): 338–343.
17. Sevin BU, Peng ZL, Perras JP et al. Application of an ATP-bioluminescence assay in human tumor chemosensitivity testing. *Gynecol Oncol* 1988; 31(1): 191–204.
18. Sevin BU, Perras JP, Averette HE et al. Chemosensitivity testing in ovarian cancer. *Cancer* 1993; 71 (Suppl 4): 1613–1620.
19. Mosmann T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. *J Immunol Methods* 1983; 65(1–2): 55–63.
20. Carmichael J, De Graff W, Gazdar A et al. Evaluation of a tetrazolium-based semi-automatic colorimetric assay: Assessment of chemosensitivity testing. *Cancer Research* 1987; 47(4): 936–942.
21. Slater TF. Studies on a succinate-neotetrazolium reductase system of rat liver. II. points of coupling with the respiratory chain. *Biochim Biophys Acta* 1963; 77: 365–382.
22. Denizot F, Lang R. Rapid colorimetric assay for cell growth and survival. Modifications to the tetrazolium dye procedure giving improved sensitivity and reliability. *J Immunol Methods* 1986; 89(2): 271–277.
23. Berridge MV, Tan AS, McCoy KD et al. The biochemical and cellular basis of cell proliferation assays that use tetrazolium salts. *Biochemica* 1996; 4(1): 15–19.
24. Kiss I, Žaloudík J, Vyzula R et al. Principal clinical indications for *in vitro* testing of chemoresistance of tumors. *Klin Onkol* 2000; 13 (Speciál 2): 62–64.
25. Žaloudík J, Hajdich M, Vyzula R et al. Results of chemoresistance MTT *in vitro* testing in lung and colorectal carcinomas nad soft-tissue sarcomas. *Klin Onkol* 2000; 13 (Speciál 2): 37–38.
26. Michalova E, Poprach A, Nemeckova I et al. Chemosensitivity prediction in tumor cells *ex vivo*—difficulties and limitations of the method. *Klin Onkol* 2008; 21(3): 93–97.
27. Carrel A. On the permanent life of tissues outside of the organism. *J Exp Med* 1912; 15(5): 516–528.
28. Leighton J. A sponge matrix method for tissue culture; formation of organized aggregates of cells *in vitro*. *J Natl Cancer Inst* 1951; 12(3): 545–561.
29. Leighton J, Kline I, Belkin M et al. The similarity in histologic appearance of some human cancer and normal cell strains in sponge-matrix tissue culture. *Cancer Res* 1957; 17(5): 359–363.

30. Rotman B, Teplitz C, Dickinson K et al. Individual human tumors in short-term micro-organ cultures: chemosensitivity testing by fluorescent cytoprinting. *In vitro Cell Dev Biol* 1988; 24(11): 1137–1146.
31. Vescio RA, Connors KM, Kubota T et al. Correlation of histology and drug response of human tumors grown in native-state three-dimensional histoculture and in nude mice. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1991; 88(12): 5163–5166.
32. Ashworth A, Balkwill F, Bast RC et al. Opportunities and challenges in ovarian cancer research, a perspective from the 11th Ovarian cancer action/HHMT Forum, Lake Como, March 2007. *Gynecol Oncol* 2008; 108(3): 652–657. doi: 10.1016/j.ygyno.2007.11.014.
33. van der Worp HB, Howells DW, Sena ES et al. Can animal models of disease reliably inform human studies? *PLoS Med* 2010; 7(3): e1000245. doi: 10.1371/journal.pmed.1000245.
34. Rabacchi SA, Neve RL, Dräger UC. A positional marker for the dorsal embryonic retina is homologous to the high-affinity laminin receptor. *Development* 1990; 109(3): 521–531.
35. Hait WN. Anticancer drug development: the grand challenges. *Nat Rev Drug Discov* 2010; 9(4): 253–254. doi: 10.1038/nrd3144.
36. Chaffer CL, Weinberg RA. A perspective on cancer cell metastasis. *Science* 2011; 331(6024): 1559–1564. doi: 10.1126/science.1203543.
37. Mehta G, Hsiao AY, Ingram M et al. Opportunities and challenges for use of tumor spheroids as models to test drug delivery and efficacy. *J Control Release* 2012; 164(2): 192–204. doi: 10.1016/j.jconrel.2012.04.045.
38. Hirschhaeuser F, Menne H, Dittfeld C et al. Multicellular tumor spheroids: an underestimated tool is catching up again. *J Biotechnol* 2010; 148(1): 3–15. doi: 10.1016/j.jbiotec.2010.01.012.
39. Hutmacher DW. Biomaterials offer cancer research the third dimension. *Nat Mater* 2010; 9(2): 90–93. doi: 10.1038/nmat2619.
40. Hutmacher DW, Loessner D, Rizzi S et al. Can tissue engineering concepts advance tumor biology research? *Trends Biotechnol* 2010; 28(3): 125–133. doi: 10.1016/j.tibtech.2009.12.001.
41. Edmondson R, Broglie JJ, Adcock AF et al. Three-dimensional cell culture systems and their applications in drug discovery and cell-based biosensors. *Assay Drug Dev Technol* 2014; 12(4): 207–218. doi: 10.1089/adt.2014.573.
42. Lin RZ, Chang HY. Recent advances in three-dimensional multicellular spheroid culture for biomedical research. *Biotechnol J* 2008; 3(9–10): 1172–1184. doi: 10.1002/biot.200700228.
43. Cui X, Hartanto Y, Zhang H. Advances in multicellular spheroids formation. *J R Soc Interface* 2017; 14(127). pii: 20160877. doi: 10.1098/rsif.2016.0877.
44. Lu P, Weaver VM, Werb Z. The extracellular matrix: a dynamic niche in cancer progression. *J Cell Biol* 2012; 196(4): 395–406. doi: 10.1083/jcb.201102147.
45. Tibbitt MW, Anseth KS. Dynamic microenvironments: the fourth dimension. *Sci Transl Med* 2012; 4(160): 160ps24. doi: 10.1126/scitranslmed.3004804.
46. Bremnes RM, Dønnem T, Al-Saad S et al. The role of tumor stroma in cancer progression and prognosis: emphasis on carcinoma-associated fibroblasts and non-small cell lung cancer. *J Thorac Oncol* 2011; 6(1): 209–217. doi: 10.1097/JTO.0b013e3181f8a1bd.
47. Gurski LA, Xu X, Labrada LN et al. Hyaluronan (HA) interacting proteins RHAMM and hyaluronidase impact prostate cancer cell behavior and invadopodia formation in 3D HA-based hydrogels. *PLoS One* 2012; 7(11): e50075. doi: 10.1371/journal.pone.0050075.
48. Sutherland RM. Cell and environment interactions in tumor microregions: the multicell spheroid model. *Science* 1988; 240(4849): 177–184.
49. LaRue KE, Khalil M, Freyer JP. Microenvironmental regulation of proliferation in multicellular spheroids is mediated through differential expression of cyclin-dependent kinase inhibitors. *Cancer Res* 2004; 64(5): 1621–1631.
50. Smalley KS, Haass NK, Brafford PA et al. Multiple signaling pathways must be targeted to overcome drug resistance in cell lines derived from melanoma metastases. *Mol Cancer Ther* 2006; 5(5): 1136–1144. doi: 10.1158/1535-7163.MCT-06-0084.
51. Zhu H, Luo SF, Wang J et al. Effect of environmental factors on chemoresistance of HepG2 cells by regulating hypoxia-inducible factor-1 α . *Chin Med J (Engl)* 2012; 125(6): 1095–1103.
52. Xu X, Sabanayagam CR, Harrington DA et al. A hydrogel-based tumor model for the evaluation of nanoparticle-based cancer therapeutics. *Biomaterials* 2014; 35(10): 3319–3330. doi: 10.1016/j.biomaterials.2013.12.080.
53. Fong EL, Lamhamedi-Cherradi SE, Burdett E et al. Modeling Ewing sarcoma tumors in vitro with 3D scaffolds. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2013; 110(16): 6500–6505. doi: 10.1073/pnas.1221403110.
54. Loessner D, Stok KS, Lutolf MP et al. Bioengineered 3D platform to explore cell-ECM interactions and drug resistance of epithelial ovarian cancer cells. *Biomaterials* 2010; 31(32): 8494–8506. doi: 10.1016/j.biomaterials.2010.07.064.
55. Karlsson H, Fryknäs M, Larsson R et al. Loss of cancer drug activity in colon cancer HCT-116 cells during spheroid formation in a new 3-D spheroid cell culture system. *Exp Cell Res* 2012; 318(13): 1577–1585. doi: 10.1016/j.yexcr.2012.03.026.
56. Yamamoto S, Okochi M, Jimbow K et al. Three-dimensional magnetic cell array for evaluation of anti-proliferative effects of chemo-thermo treatment on cancer spheroids. *Biotechnology and Bioengineering* 2015; 20(3): 488–497. doi: 10.1007/s12257-014-0724-y.
57. dit Faute MA, Laurent L, Ploton D et al. Distinctive alterations of invasiveness, drug resistance and cell-cell organization in 3D-cultures of MCF-7, a human breast cancer cell line, and its multidrug resistant variant. *Clin Exp Metastasis* 2002; 19(2): 161–168.
58. Kondo J, Endo H, Okuyama H et al. Retaining cell-cell contact enables preparation and culture of spheroids composed of pure primary cancer cells from colorectal cancer. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2011; 108(15): 6235–6240. doi: 10.1073/pnas.1015938108.
59. Tung YC, Hsiao AY, Allen SG et al. High-throughput 3D spheroid culture and drug testing using a 384 hanging drop array. *Analyst* 2011; 136(3): 473–478. doi: 10.1039/c0an00609b.
60. Raghavan S, Mehta P, Ward MR et al. Personalized medicine-based approach to model patterns of chemoresistance and tumor recurrence using ovarian cancer stem cell spheroids. *Clin Cancer Res* 2017; 23(22): 6934–6945. doi: 10.1158/1078-0432.CCR-17-0133.
61. Lei KF, Kao CH, Tsang NM. High throughput and automatic colony formation assay based on impedance measurement technique. *Anal Bioanal Chem* 2017; 409(12): 3271–3277. doi: 10.1007/s00216-017-0270-5.
62. Lei KF, Liu TK, Tsang NM. Towards a high throughput impedimetric screening of chemosensitivity of cancer cells suspended in hydrogel and cultured in a paper substrate. *Biosens Bioelectron* 2018; 100: 355–360. doi: 10.1016/j.bios.2017.09.029.
63. Jeppesen M, Hagel G, Glenthøj A et al. Short-term spheroid culture of primary colorectal cancer cells as an in vitro model for personalizing cancer medicine. *PLoS One* 2017; 12(9): e0183074. doi: 10.1371/journal.pone.0183074.
64. Kobayashi H, Tanisaka K, Doi O et al. An in vitro chemosensitivity test for solid human tumors using collagen gel droplet embedded cultures. *Int J Oncol* 1997; 11(3): 449–455.
65. Hou J, Hong Z, Feng F et al. A novel chemotherapeutic sensitivity-testing system based on collagen gel droplet embedded 3D-culture methods for hepatocellular carcinoma. *BMC Cancer* 2017; 17(1): 729. doi: 10.1186/s12885-017-3706-6.
66. Tanigawa N, Yamaue H, Ohya S et al. Exploratory phase II trial in a multicenter setting to evaluate the clinical value of a chemosensitivity test in patients with gastric cancer (JACCRO-GC 04, Kubota memorial trial). *Gastric Cancer* 2016; 19(2): 350–360. doi: 10.1007/s10120-015-0506-z.
67. Kanazawa Y, Yamada T, Fujita I et al. In vitro chemosensitivity test for gastric cancer specimens predicts effectiveness of oxaliplatin and 5-fluorouracil. *Anticancer Res* 2017; 37(11): 6401–6405. doi: 10.21873/anticancer.12093.
68. Inoue M, Maeda H, Takeuchi Y et al. Collagen gel droplet-embedded culture drug sensitivity test for adjuvant chemotherapy after complete resection of non-small-cell lung cancer. *Surg Today* 2017; 48(4): 380–387. doi: 10.1007/s00595-017-1594-7.
69. Pavia-Jiménez A, Tcheuyap VT, Brugarolas J. Establishing a human renal cell carcinoma tumorigraft platform for preclinical drug testing. *Nat Protoc* 2014; 9(8): 1848–1859. doi: 10.1038/nprot.2014.108.
70. Lawson DA, Bhakta NR, Kessenbrock K et al. Single-cell analysis reveals a stem-cell program in human metastatic breast cancer cells. *Nature* 2015; 526(7571): 131–135. doi: 10.1038/nature15260.