

Разработка варианта метода оценки чувствительности клеток интракраниальных новообразований к химиотерапевтическим препаратам in vitro

Developing options for method of assessing the sensitivity of cells intracranial neoplasms to chemotherapeutics in vitro

Цитирование: Chernov A.N., Kaljunov V.N., Konoplja N.E. Developing options for method of assessing the sensitivity of cells intracranial neoplasms to chemotherapeutics IN VITRO. Malignant Tumours 2015; 3:40-52

DOI: 10.18027/2224-5057-2015-3-40-52

Введение

Нейроэпителиальные опухоли являются наиболее трудно-излечимыми среди других типов рака, особенно у детей и подростков. Одним из направлений повышения эффективности терапии данного типа новообразований служит переход от групповой к персонифицированной терапии.

Цель

Разработать и апробировать вариант метода оценки in vitro чувствительности клеток нейроэпителиальных опухолей к химиопрепаратам и сопоставить характеристики данного метода с другими методами определения in vitro химиочувствительности клеток различных по гистологическому типу новообразований.

Материалы и методы

На примере первичных культур клеток интракраниальных опухолей детей (90) в возрасте $7,4 \pm 1,1$ лет разработан и апробирован упрощенный вариант анализа их индивидуальной чувствительности и резистивности к химиотерапевтическим средствам. Его сущность сводится к подсчету в камере Горяева пропорции погибших (окрашивающихся трипановым синим) и выживших (прозрачных) клеток после их односуточного экспонирования с цитостатическими препаратами в дозах, близких к 50%-м летальным.

Результаты

На основании градации индексов цитотоксичности химиопрепаратов ex vivo и оценки результатов терапии пациентов цитостатическими средствами по принятым формулам были произведены расчеты чувствительности (67,2%), специфичности (56,8%), положительной (87,3%) и отрицательной (26,6%) прогностической ценности способа.

Выводы

Результаты оказались сопоставимыми с таковыми иных более трудоемких методов, открывая перспективу применения данного варианта при некотором его техническом совершенствовании.

Background

Neuroepithelial tumors are the most intractable to other types of cancer, especially in children and adolescents. One of the ways of increasing the efficacy of this type of tumors, the transition from group serves to a personalized therapy.

Objective

Develop and test version of the method in vitro evaluation of the sensitivity of neuroepithelial tumors cells to chemotherapy drugs and compare the characteristics of this method with other methods of determining the in vitro chemosensitivity of cells of different histological types of tumors.

Subjects and methods

For example, the primary cell cultures of intracranial tumors (ependymomas, anaplastic astrocytoma, glioblastoma, neuroblastoma, medulloblastoma, primitive neuroectodermal and atypical rhabdoid teratoid neoplasias) children (90) at the age $7,4 \pm 1,1$ years, developed and tested uproschnny option the analysis of their individual susceptibility and resistivity to chemotherapeutic drugs. Its essence consist of down to counting chamber Goryaeva proportion of dead (stained with trypan blue) and survivors (transparent) cells after their one-day exposure to cytotoxic drugs in doses that are close to the 50% lethal.

Results

Based on the gradation index of cytotoxicity of chemotherapeutic drugs and ex vivo evaluation of patients with cytotoxic drugs Supervision, according to accepted formulas were made calculations of sensitivity (67.2%), specificity (56.8%), positive (87.3%) and negative (26.6%) predictive value method.

Conclusion

The results were comparable to those of other more labor-intensive methods, opening up the prospect of using this option for some of its technical development.

КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА

химиочувствительность и резистентность клеток, нейроэпителиальные опухоли, прогнозирование терапевтического ответа, персонифицированная терапия

KEY WORDS

chemosensitivity and resistance cell neuroepithelial tumor therapeutic response prediction, individual therapy

КОНТАКТНАЯ ИНФОРМАЦИЯ

Чернов Александр Николаевич – научный сотрудник лаборатории нейрофизиологии Института физиологии НАН Беларуси, Минск, Республика Беларусь, E-mail: al.chernov@mail.ru

Калюнов Владимир Николаевич – д.б.н., профессор, главный научный сотрудник лаборатории нейрофизиологии Института физиологии НАН Беларуси

Конопля Наталья Евгеньевна – д.м.н., доцент, заместитель директора по клинике Республиканского научно-практического центра детской онкологии, гематологии и иммунологии Министерства здравоохранения Республики Беларусь

CONTACT INFORMATION

Chernov Alexander Nikolaevich – a researcher of neurophysiology laboratory of Institute of Physiology of the National Academy of Sciences of Belarus, Minsk, the Republic of Belarus, tel: + 37529-394-10-95, E-mail: al.chernov@mail.ru

Kaljunov Vladimir Nikolaevich – Chief researcher of neurophysiology laboratory of Institute of Physiology of the National Academy of Sciences of Belarus, Minsk, the Republic of Belarus, Doctor of biological sciences (D. Sc), professor

Konoplija Natalya Evgenevna – deputy of director of Belorussian research center for pediatric oncology, hematology and immunology, Doctor of medical sciences (D. Sc), Assistant of professor

На сегодняшний день эксплуатация культур неопластических клеток с целью определения их чувствительности к цитостатическим препаратам еще не вошла в повседневную клиническую практику, но тенденция к тому становится все более явной. Она диктуется растущим пониманием необходимости перехода от существующей групповой к персонифицированной комплексной терапии, учитывающей не только тип опухолей, стадии их прогрессии, пол, возраст, расовую принадлежность пациентов, но и индивидуальные особенности организма [3, 9, 11, 34, 38].

В равной мере к тому же побуждает как многофакторная общая медикаментозная, так и перекрестная резистентность новообразований, подверженная изменениям в ходе их развития, курации и представляющая одну из сложных проблем онкопатологии [9, 34, 37]. Отсюда определение химиочувствительности *in vitro* в сочетании с другими показателями (клинической картиной течения заболевания, результатами цитоморфологического, биохимического, молекулярно-генетического анализов) видится как магистральная линия повышения эффективности противоопухолевой терапии [1, 43]. Благодаря культуральным системам возможно:

- 1) Установить прямое цитотоксическое влияние одного либо комбинации нескольких препаратов (терапевтический индекс) по оценке гибели и/или пролиферативной активности неопластических клеток.
- 2) Провести мониторинг химиочувствительности опухолевых клеток у конкретных лиц на разных этапах химиотерапии, которая выступает в роли интегративного индикатора возможности ответа организма на терапию [9].
- 3) Осуществить скрининг как потенциальных, так и новых противоопухолевых веществ с предсказанием эффективности их применения и исключением неэффективных соединений [9].
- 4) Изучить характер взаимодействия комбинаций фармакологических веществ друг с другом с целью выявления их аддитивных, синергических или антагонистических влияний.
- 5) Выбрать наиболее рациональную схему терапии применительно не только к гистологическому типу новообразования, степени его злокачественности, цитологическому, генно-биохимическому статусу, но и индивидуально-возрастной чувствительности пациентов [9].
- 6) Исследовать механизмы общей медикаментозной и перекрестной толерантности, изменяю-

щиеся в ходе опухолевой прогрессии и лечения, в соответствии со сменой профиля антигенов и осуществить поиск путей преодоления устойчивости ее специфическими ингибиторами, удаление из протоколов заведомо неэффективных соединений.

- 7) Идентифицировать среди находящихся на лечении пациентов с повышенным риском рецидива, учитывая клиническую картину, цитологические, иммунохимические, биохимические и молекулярно-генетические показатели [3, 7, 9, 34, 40, 42, 45].

Перечисленные обстоятельства инициировали создание множества методов определения лекарственной чувствительности, устойчивости опухолевых клеток и прогнозирования их реакции на химиотерапию [7, 17, 33]. Будучи отличными по принципиальным подходам, ориентирам и технологиям исполнения, они тем не менее включают одни и те же базовые принципы: выделение клеток из образцов опухолей, инкубацию посевов с химиопрепаратами, оценку выживаемости, митотического, клоногенного потенциала, ферментативной активности и интерпретацию полученных данных. Среди существующих методов наибольшее распространение получили следующие:

1. Пролиферативный тест (proliferative test – PT). Он показывает степень снижения митотического индекса по включению меченных аминокислот и оснований (³H-тимидина, – уридина, – лейцина, – метионина, ¹³⁵I-метионина, ¹³⁵I-бромдеоксиуридина) во вновь синтезируемую ДНК готовящимися к делению клетками, расположенными в микротитрационных 96-плоскостных или луночных планшетах, с последующим сцинтилляционным подсчетом импульсов на β- и γ-счетчиках, привлечением автордиографии, абсорбционного ридера или метода проточной цитометрии [1, 7, 12, 20, 21, 33].
2. Метод тетразолиевого окрашивания (method tetrazolium test – MTT) дает количественное представление об индексе цитотоксичности (ИЦ). Он основан на способности митохондриальных лактат- и сукцинатдегидрогеназ живых клеток конвертировать проникающие в них в течение 1–6 ч инкубации растворимые соли тетразолия, а именно натриевую соль [2,3-бис-(2-метокси-4-нитро-5-сульфофенил)-2Н-тетразолий]-5-карбоксинилидина – ХТТ или 3-[(4,5-диметил-2-тиазол-2,5-дифенил)тетразолий] бромида – МТС в нерастворимый продукт – фармазан в присутствии электрон

сцепленного реагента феназинмоносulfата (PMS). С помощью солубилизаторов его кристаллы переводят в растворимую форму, оптическая плотность которых улавливается спектрофотометрически при длине волн 540–690 нм. Реагируют только живые метаболически активные клетки [3, 7, 9, 12, 21, 28, 43]. Чувствительность метода лежит в диапазоне от 1000 до 50 000 клеток/лунку.

3. Колониеформирующий анализ (colonic formation assay – CFA) опирается на клоногенные свойства стволовых клеток, т.е. их способность образовывать колонии в монослое, насчитывающие по 40–60 клеток. Метод обладает высокой прогностической ценностью для тестирования химиочувствительности стандартных и экспериментальных противоопухолевых средств [12, 29, 33, 40, 41, 42].
4. Дифференцированное окрашивание клеток на цитотоксичность (differential staining cytotoxicity assay – DiSC) основано на неодинаковой инкорпорации гематоксилин-эозина в нормальные и трансформированные живые клетки, а также прочного зеленого (fast green-Nigrosin) в погибшие, сообразно статусу проницаемости их мембран. Интактная плазмолемма препятствует поглощению красителей. Таким образом, удастся идентифицировать долю погибших клеток при влиянии цитостатических препаратов [3, 14, 29, 40]. Лекарственная восприимчивость измеряется соотношением выживших клеток в обработанных препаратами посевах к их количеству в необработанных контролях, которое должно составлять не менее 80% жизнеспособных клеток.
5. Оценка выживаемости клеток по уровню аденозинтрифосфорной кислоты (adenosine triphosphate cell viability assay – ATP assay) способствует количественному подсчету выживших клеток в культурах, обработанных химиопрепаратами, поскольку апоптотические клетки по причине утраты своей целостности демонстрируют выраженное снижение содержания АТФ. Добавляют реагент – люцеферин/люцеферазу, который катализирует испускание света при распаде АТФ до АДФ или АМФ и люцеферина, интенсивность которого пропорциональна метаболической активности субстрата и улавливается люминометром или β-счетчиком. Уменьшение АТФ указывает на лекарственную чувствительность, а отсутствие снижения – на устойчивость к тестируемым препаратам [27].

Неся в себе позитивные моменты, рассмотренные методы вместе с тем не лишены технических и теоретических проблем, нуждающихся в их решении. МТТ дает сопоставляемые показатели при наличии в образцах не менее 80% опухолевых клеток. Результат признается надежным, когда через 4 сут пребывания *in vitro* в контроле сохраняется 70% живых клеток [41]. Наконец, для МТТ анализа пригодны только адгезионные культуры, причем определенные условия культуральной среды подбираются для каждой клеточной линии индивидуально [35]. Хотя DiSC анализ (в отличие от МТТ) позволяет использовать материал со значительной примесью нормальных клеток (однако не более 30%), он остается трудоёмким [3]. Проблемность CFA сводится к следующим моментам. Имеется вероятность того, что истинные опухолевые клетки в большинстве не делятся (G_0), тогда как клетки, образующие колонии, реплицируются. Не исключается вероятность и того, что клоногенные единицы могут оказаться не подлинно стволовыми клетками. CFA в состоянии оценивать численность погибших клеток в сверхузком диапазоне (2 порядка), тогда как полновесные клинические ответы требуют, чтобы гибель клеток находилась в широком диапазоне. Это обстоятельство предписывает испытание нереально низких концентраций лекарственных соединений во избежание избыточного ложного положительного результата. В целом метод затратен по расходу времени (имеет продолжительный период роста клонов до 14 сут), материальных затрат, изнурительности подсчетов, сложности математических исчислений, неспособности варьировать условия культуральной среды, оказавшие влияние на удорожание его стоимости. Использование CFA ограничивается плохой клоногенной способностью многих клеточных линий, например бластных клеток крови, сквамозно-клеточной карциномы [35].

Изложенное выше побудило обратиться к наиболее простому по исполнению, оперативному, относительно дешевому и вместе с тем не уступающему по чувствительности способу индикации лекарственной цитотоксичности, каковым является анализ эксклюзии красителя (dye exclusion assay) [44]. Он исходит из принципа непроницаемости цитоплазматической мембраны нормальных клеток для специфических витальных красителей и утрате этой способности пострадавшими в результате дезинтеграции плазмалеммы. Таким образом, удастся подсчитать численность сохранивших и утративших свою жизнеспособность клеток, и по их соот-

ношению судить о степени цитотоксичности испытуемых химиопрепаратов [12, 131, 41]. При данном способе тестирования применяются различные красители (зеленый прочный, кристаллический фиолетовый, нейтральный красный, эозин, нигрозин Б, акридиновый оранжевый и др., в том числе синтезируемый Паулем Эрлихом еще в 1904 г. трипановый синий (trypan blue- ТВ), широко используемый в лабораторной практике как сам по себе, так и в комбинации с проточной цитометрией) [12]. Анализ исключения ТВ относительно скор, прост, малозатратен, обходится небольшим количеством клеток и при содержании ряда условий гарантирует достаточную результативность [12, 41]. Это предопределило предпочтительность выбора в пользу ТВ тестирования. Принимая во внимание перечисленное, в указанный метод были привнесены модификации, позволяющие обойти очерченные «ловушки» и адаптировать его применительно к интракраниальным неоплазиям, поскольку большинство анализов разрабатывалось на основе рака кроветворной и лимфоидной систем [3, 7, 9], тогда как мозговым опухолям уделялось гораздо более скромное внимание [1, 29, 33, 39, 42, 45].

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Эксперименты выполнены на первичных культурах клеток, полученных из фрагментов интракраниальных неоплазий, взятых для гистологического анализа (с информированного согласия родителей) у 98 лиц в возрасте от 3 мес до 17 лет, находившихся на лечении в Республиканском центре детской нейрохирургии на базе ГКБ скорой медицинской помощи г. Минска в 2008–2012 гг. (договор о научном сотрудничестве от 21.11.2008 г.). Полученные из историй болезней данные о гистологических типах и степени злокачественности опухолей позволили сформировать три экспериментальные группы. Первая – включала 18 детей (медиана возраста $9,5 \pm 1,2$ года) с высокозлокачественными глиомами: анапластическими астроцитомами – АА, GrIII ($n=9$) и глиобластомами – ГБ, GrIV ($n=9$). Вторая группа состояла из 16 пациентов, страдающих эпендимомами – ЭП, GrII (медиана возраста $5,2 \pm 1,3$ года). Третья – включала 56 детей с эмбриональными опухолями (GrIV): медуллобластомами – МБ ($n=38$), нейробластомами – НБ ($n=4$), примитивными нейроектодермальными, ПНЭ ($n=6$) и атипичными тератоидно/рабдоидными – АТР ($n=8$) неоплазиями (медиана возраста $5,7 \pm 0,6$ года) [30].

Поступавший из клиники в течение 1–2 ч материал в стерильных условиях ламинарного бокса (Lobsonco, США) отмывали от крови, освобождали от соединительнотканых элементов в растворе Хэнкса (Sigma-Aldrich, США), содержащем 4%-ного сульфата гентамицина (Белмедпрепараты, РБ), и механически измельчали до мелких частиц. Клетки подвергали 10 мин ферментативной обработке смесью 0,25%-ного раствора трипсина и 0,02%-ного ЭДТА в соотношении 1:3 (Sigma-Aldrich, США) при 37°C. Действие фермента нейтрализовали внесением в чашки Петри с посевами 1 мл эмбриональной телячьей сыворотки (Sigma-Aldrich, США). Обработанный таким способом материал подсчитывали в камере Горяева и переносили в количестве 500 тыс клеток/мл в культуральные чашки (d=35 мм, Nuncl, Дания) с 2 мл среды Игла в модификации Дульбекко (DMEM, Sigma-Aldrich, США), содержащей 10% эмбриональной телячьей сыворотки. Клетки нейроэпителиальных неоплазий культивировали на протяжении 2 сут в стандартных условиях CO₂-инкубатора (Heracell, США) при 37°C, 95%-ной влажности и 5% парциальном давлении CO₂ [2, 19, 24] до достижения стадии логарифмического роста культур, которую оценивали визуально по резко возросшему количеству митозов и численности клеток с помощью цифровой фотокамеры Altra 20 (Nikon, Япония), снабженной программным обеспечением Analysis getIT (Olympus, Япония) на инвертированном микроскопе NY-2E (Carl Zeiss, Германия) при ×312,5. Спустя 2 суток, в посеvy клеток вносили растворенные на 0,9%-ном растворе хлорида натрия (рН=7,3) испытуемые химиопрепараты в рабочих концентрациях, рассчитанных из терапевтических: цисплатин (Veropharm, РФ)– $3,3 \times 10^{-6}$ М [7], эпопозид (Ebewe Pharma, Австрия)– $1,6 \times 10^{-6}$ М [7], цитарабин (Белмедпрепараты, РБ)– $4,1 \times 10^{-6}$ М, карбоплатин (Veropharm, РФ)– $10,8 \times 10^{-6}$ М, циклофосамид (Белмедпрепараты, РБ)– $30,6 \times 10^{-6}$ М, винкристин (Veropharm, РФ)– $2,4 \times 10^{-9}$ М, темозоломид (Orion Pharma, Финляндия)– $10,3 \times 10^{-6}$ М и метотрексат (Ebewe Pharma, Австрия)– $11,0 \times 10^{-5}$ М. Посевы клеток, куда не добавляли цитостатические препараты, оставляли в качестве контрольных. По прошествии 1 сут после добавления химиопрепаратов, среду удаляли из чашек Петри, замещая ее 1 мл 0,25%-ного раствора трипсина с ЭДТА, в котором выдерживали культуру в течение 5 мин при 37°C. Затем клетки пипетировали, добавляли к ним 1–2 капли (10 мкл) 0,2%-ного раствора трипанового синего (Alta Aesar,

Германия), приготовленного на 0,9%-ном растворе хлорида натрия и переносили 20 мкл в камеру Горяева (Минимед, РФ). Через 2–3 мин в 15 больших квадратах по диагонали подсчитывали количество мертвых и живых клеток с установлением их соотношения [2]. Полученный эффект – степень подавления роста опухолевых клеток химиопрепаратом [5] – был выражен индексом цитотоксичности (формула 1) и подвергался сравнительному анализу. Рассчитывали ИЦ химиопрепаратов по формуле

$$N\% = (1 - \text{Опыт}/\text{Контроль}) \times 100 \quad (1)$$

где N% – индекс цитотоксичности препаратов, Опыт – выживаемость клеток при действии химиопрепаратов, Контроль – выживаемость клеток в контроле [5].

Результаты, полученные *in vitro*, сопоставляли с клинической эффективностью терапии. Образцы неоплазий делили на группы по степени чувствительности к химиопрепаратам *in vitro*. Для этого рассчитывали медиальное значения ИЦ химиопрепаратов для астроцитарных (медиальное значение ИЦ $39,0 \pm 2,0\%$) и эмбриональных (медиальное значение ИЦ $38,5 \pm 1,0\%$) опухолей (АА, ГБ, МБ, ПНЭО, АТРО, НБ). Образцы неоплазий, при действии на которые ИЦ химиопрепаратов достоверно ($P < 0,05$) превышал медиальное значение, относили к группе с «высокой чувствительностью». Опухоли, для которых ИЦ химиопрепаратов достоверно не отличался от медиального значения, относили в группу с «умеренной чувствительностью». Образцы неоплазий, при действии на которые ИЦ химиопрепаратов был ниже ($P < 0,05$) медиального значения, относили в группу с «низкой чувствительностью» [9]. Для эпендимом медиальное значение ИЦ химиопрепаратов составило $44,6 \pm 1,8\%$. В соответствии с этим, к группе с «высокой чувствительностью» были отнесены образцы неоплазий, ИЦ которых был достоверно ($P < 0,05$) выше медиального значения. Образцы опухолей, для которых ИЦ химиопрепаратов был ниже ($P < 0,05$) медиального значения, относили к группе с «низкой чувствительностью». Образцы неоплазий, для которых ИЦ химиопрепаратов достоверно ($P < 0,05$) не отличался от медиального значения, относили к группе с «умеренной чувствительностью». Всего протестировано $n = 3089$ посевов.

Пациентов, образцы неоплазий которых подвергались воздействию химиопрепаратов *in vitro*, также распределяли по группам в зависимости от эффективности проводимой химиотерапии. С этой

целью из историй болезни пациентов брали информацию о радикальности хирургического вмешательства: тотальное (резекция 95% и более объема опухоли), субтотальное (резекция 75–94% объема опухоли), частичное (резекция 50–74% объема опухоли) удаление, биопсия (удалении менее 50% объема опухоли) [6, 10, 30], спектре и концентрациях химиотерапевтических средств, применявшихся в течение 1–4 курсов химиотерапии на протяжении (3–6 мес), а также заключения, сделанные специалистами по магнитно-резонансной (МРТ) или компьютерной (КТ) томографии о положительной или отрицательной динамике объема остаточной опухоли, наличии метастазов, рецидивов в ближайших (спинной, головной мозг) и отдаленных регионах. Результаты МРТ или КТ сопоставляли с данными предыдущих исследований, проведенных после хирургической операции.

Эффективность проводимой химиотерапии пациентов оценивали по выраженности ответа опухоли на лечение. Были сформированы три группы: в группу «Ремиссия» (Р) вошли пациенты со всеми формами хирургической резекции новообразования, у которых наблюдали исчезновение или уменьшение размеров контрастирующей части опухоли не менее чем на 50% при двух идентичных КТ или МРТ исследованиях, интервал между которыми составлял не менее 6 недель при отсутствии диссеминации. Группа «Стабилизация» (С) включала пациентов со всеми формами хирургической резекции неоплазий, у которых констатировали отсутствие увеличения размеров опухоли (реакция сохранившейся их части), отсутствие ремиссии и диссеминации. В группу с «Прогрессированием заболевания» (ПЗ) вошли пациенты со всеми формами хирургической резекции неоплазий, у которых наблюдали увеличение объема опухоли на 25% и более или возобновление её роста после химиотерапии, наличие очагов метастазирования в соседние отделы головного мозга или в спинной мозг, диффузный, инфильтративный рост новообразования по данным визуализации МРТ или КТ [1, 6]. На основании этих данных пациенты, прошедшие курсы химиотерапии, а также фрагменты их неоплазий, протестированные *in vitro*, были распределены по двум основным группам: «ответившие» и «не ответившие» на химиотерапию.

Клетки рассматривали как «ответившие» на химиотерапию при попадании в группы образцов с «высокой» и «умеренной» чувствительностью, и «не ответившие», если образцы относились к группе с «низкой» чувствительностью [26]. Па-

циентов считали «ответившими» на терапию при их принадлежности к группам «Ремиссия» и «Стабилизация», «не ответившими» считали пациентов, принадлежащих к группе «Прогрессия» [6].

В порядке выяснения потенциальных возможностей способа сообразно приведенной раскладке были рассчитаны его чувствительность (Se), специфичность (Sp) и прогностическая значимость (PV). Чувствительность определяли как долю образцов в культуре с ИЦ более 31% в группе «с ответом на терапию» по формуле

$$Se = a / (a + c) \times 100\% \quad (2)$$

где Se – чувствительность, а – истинно положительный результат – количество образцов чувствительных клеток в группе пациентов с «ответом на терапию», с – ложноотрицательный результат – число образцов резистентных клеток в группе пациентов с «ответом на терапию». Специфичность выражали как процент резистентных и низкочувствительных образцов *in vitro* в совокупности «без ответа» на терапию неоплазий [25].

$$Sp = d / (b + d) \times 100\% \quad (3)$$

где Sp – специфичность способа, b – ложноположительный результат – количество образцов чувствительных клеток в группе пациентов «без ответа на терапию», d – истинно отрицательный результат – количество образцов резистентных клеток в группе пациентов «без ответа на терапию» [9]. Положительную прогностическую ценность способа (+PV) определяли по формуле

$$(+PV) = a / (a + b) \times 100\% \quad (4)$$

Отрицательную прогностическую ценность способа (–PV) рассчитывали по формуле

$$(-PV) = d / (d + c) \times 100\% \quad (5)$$

Каждый эксперимент проводили в трех-пяти независимых повторях. Результаты представляли как средняя арифметическая плюс/минус стандартная ошибка средней для выборки ($M \pm m$). Для сравнения двух групп по выраженности количественных признаков применяли стандартный t-тест Стьюдента с помощью программы StatPlus2005 пакета Statistica 6.0. Достоверными считали различия при уровне значимости $p < 0,05$.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Итоги оценки чувствительности культивируемых клеток астроцитарных (АА и ГБ) неоплазий в группах «ответивших» и «не ответивших» на химиотерапию приведены в табл. 1.

Из данных таблицы 1 следует, что в группе «с ответом на терапию» наиболее чувствительными *in vitro* клетки опухолей оказались к темозоломиду, циклофосфамиду, карбоплатину, этопозиду и цитарабину, а из препаратов, применявшихся в терапии – к темозоломиду, этопозиду и цисплатину. Данные опухоли относились к группе «с умеренной чувствительностью». В то же время клетки опухолей, принадлежащих к группе «без ответа», продемонстрировали низкую чувствительность ко всему набору тестируемых *in vitro* цитостатических средств (ИЦ < 31%), но особенно к цитарабину. В ряде используемых в лечении цитостатических препаратов максимальные достоверные отличия между группами «ответивших» и «не ответивших» наблюдали при воздействии этопозидом.

Распределение образцов по характеру реакций анапластической астроцитомы и глиобластомы на терапию (табл. 2) позволило по формулам (2–5) рассчитать чувствительность, специфичность и прогностическую значимость предлагаемого

способа оценки химиочувствительности клеток пациентов с астроцитарными опухолями.

Чувствительность способа для пациентов с астроцитарными опухолями составила 64,5% (29 образцов из 45 в группе «ответ на терапию»). Специфичность равнялась 77,8% (7 из 9 образцов в выборке «без ответа на терапию»). Положительная прогностическая ценность способа (+PV) – 93,5% (29 образцов из 31). Отрицательная прогностическая ценность способа (–PV) – 30,4% (7 образцов из 23).

Химиочувствительность культур клеток эпендимом представлена в табл. 3.

Данные таблицы 3 показывают, что максимальную цитотоксическую эффективность *in vitro* эпендимомы, принадлежащие к группе с «ответом на терапию», проявляли к цисплатину, метотрексату, циклофосфамиду и цитарабину. Данная группа опухолей обладала умеренной восприимчивостью к химиопрепаратам. В то же время опухоли, относящиеся к группе пациентов «без ответа на терапию», обладали умеренной чувствительностью к цитарабину, карбоплатину, метотрексату, цисплатину и этопозиду, тогда как к винкристину, циклофосфамиду и темозоломиду они проявляли низкую химиочувствительность. Чувствительность клеток новообразований у пациентов в группах «с ответом» и «без ответа» на терапию статистически значимо отличалась для циклофосфамида, винкристина и цисплатина. Именно эти химиопрепараты вошли в курсы назначенного пациентам лечения.

Распределение образцов по группам реакции на терапию позволило рассчитать чувствительность, специфичность и прогностическую значимость предлагаемого способа для оценки химиочувствительности клеток эпендимомы (табл. 4).

Чувствительность способа для групп пациентов с эпендимомой составила 77,6% (38 образцов из 49 в группе «с ответом» на терапию). Специфичность – 91,0% (20 из 22 образцов в группе «без ответа» на терапию). Положительная прогностическая ценность способа (+PV) – 95,0% (38 образцов из 40), отрицательная прогностическая значимость (–PV) – 64,5% (20 образцов из 31).

Таблица 1. Чувствительность *in vitro* клеток астроцитарных опухолей к химиопрепаратам в группах пациентов «с ответом» и «без ответа» на терапию

Химиопрепарат	Индекс цитотоксичности, %	
	Ответ на терапию (n= 14)	Без ответа на терапию (n= 4)
Винкристин	35,8±5,3	21,7±7,6*
Карбоплатин	43,9±6,8	25,0±3,5*
Метотрексат	36,1±5,5	27,0±11,1
Темозоломид	47,3±4,7	28,5±3,4*
Циклофосфамид	34,7±14,5	29,7±4,7
Цисплатин	41,2±3,9	21,7±7,6*
Цитарабин	47,4±4,4	8,9±4,1*
Этопозид	50,6±5,4	4,3±3,3*
Медиальное значение	39,7± 1,8	

*Здесь и далее знаком * отмечены достоверные отличия индекса цитотоксичности химиопрепаратов в группе пациентов «без ответа на терапию» от группы «с ответом на терапию».*

*Жирным шрифтом выделен индекс цитотоксичности химиопрепаратов *in vitro*, которыми проводилась химиотерапия по протоколам в каждой группе пациентов*

Таблица 2. Ответ *in vivo* астроцитарных опухолей пациентов на 3–6-месячную химиотерапию и чувствительность клеток к химиопрепаратам *in vitro*

Чувствительность глиальных клеток к химиопрепаратам	Количество образцов астроцитарных опухолей пациентов в зависимости от ответа на курс химиотерапии, %	
	Ответ на терапию (n=14)	Без ответа на терапию (n=4)
Высокая	31,2% (14/45)	–
Умеренная	33,3% (15/45)	22,2% (2/9)
Низкая	35,5% (16/45)	77,8% (7/9)

Примечание:

Здесь и далее за образец принимали клетки опухоли, полученные от одного пациента и экспонированные в культуре с одним из химиопрепаратов. В скобках заключены цифры, указывающие количество образцов с данным показателем чувствительности клеток *in vitro* из общей совокупности тестированных

Таблица 3. Чувствительность *in vitro* клеток эпендимомы к химиопрепаратам в группах пациентов «с ответом» и «без ответа» на терапию

Химиопрепарат	Индекс цитотоксичности, %	
	Ответ на терапию (n=11)	Без ответа на терапию (n=5)
Винкристин	41,6±5,7	21,1±4,1*
Карбоплатин	44,7±3,7	46,2±8,0
Метотрексат	51,1±6,4	44,5±22,4
Темозоломид	43,7±8,4	32,5±18,8
Циклофосфамид	48,0±7,0	29,8±7,2*
Цисплатин	52,0±7,5	38,9±4,7*
Цитарабин	48,7±7,6	52,9±8,0
Этопозид	44,3±6,8	38,3±4,3
Медиальное значение	44,6 ± 1,8	

Таблица 4. Ответ *in vivo* эпендимом пациентов на 3–6-месячную химиотерапию и чувствительность клеток к химиопрепаратам *in vitro*

Чувствительность клеток эпендимомы к химиопрепаратам	Количество образцов эпендимом пациентов в зависимости от ответа на курс химиотерапии, %	
	Ответ на терапию (n=11)	Без ответа на терапию (n=5)
Высокая	32,7% (16/49)	4,5% (1/22)
Умеренная	44,9% (22/49)	4,5% (1/22)
Низкая	22,4% (11/49)	91,0% (20/22)

Химиочувствительность культур клеток эмбриональных неоплазий представлена в табл. 5.

Из данных таблицы 5 следует, что наибольшую эффективность *in vitro* в отношении клеток эмбриональных неоплазий в группе пациентов «с ответом» на терапию проявляли цисплатин, циклофосфамид, цитарабин, метотрексат и карбоплатин. Неопластические клетки обладали умеренной химиочувствительностью к этим химиопрепаратам, а также к винкристину, темозоломиду, цитарабину, этопозиду.

Неоплазии пациентов, принадлежащих к группе «без ответа на терапию», обладали низкой чувствительностью к циклофосфамиду и винкристину, тогда как к другим цитостатическим средствам, среди которых только метотрексат и этопозид применяли для химиотерапии, они проявляли умеренную химиочувствительность. Кроме того, чувствительность клеток эмбриональных неоплазий к метотрексату и циклофосфамиду достоверно отличалась между группами опухолей.

Опухоли «с ответом на терапию» проявляли умеренную чувствительность к двум препаратам (циклофосфамиду и цисплатину), которые были включены в протоколную химиотерапию, а в группе неоплазий «без ответа на терапию» – к метотрексату и этопозиду.

Распределение образцов эмбриональных неоплазий по группам реакции на терапию позволило рассчитать чувствительность, специфичность и прогностическую значимость предлагаемого способа для оценки химиочувствительности клеток (табл. 6).

Чувствительность способа для пациентов с эмбриональными неоплазиями составила 63,2%

(143 образца из 226 в группе с «ответом» на терапию). Специфичность – 44,5% (16 из 36 образцов в группе «без ответа» на терапию). Положительная прогностическая ценность способа (+PV) – 88,1% (148 образца из 168). Отрицательная прогностическая значимость (–PV) – 17,0% (16 образцов из 94).

Низкая специфичность в данной группе опухолей объясняется большим количеством образцов с умеренной и высокой химиочувствительностью в группе «без ответа» на терапию, большой гетерогенностью гистологических типов новообразований. Низкая отрицательная прогностическая значимость (–PV) обусловлена наличием большого количества образцов (78) с низкой эффективностью в группе пациентов с «ответом» на терапию.

Итоговое распределение химиочувствительности культивируемых клеток образцов всех изученных нейроэпителиальных опухолей суммирует табл. 7.

Данные таблицы и формулы 2–5 констатируют следующие характеристики метода для пациентов с нейроэпителиальными новообразованиями: чувствительность – 67,2% (200 образцов из 320 в группе «с ответом» на терапию). Специфичность – 56,8% (38 из 67 образцов в группе «без ответа» на терапию). Положительная прогностическая ценность варианта метода – 87,3% (200 образцов из 229). Отрицательная прогностическая значимость – 26,6% (38 из 143 образцов).

Представленные характеристики способа оценки химиочувствительности *in vitro* сравнили с описанными в литературе. С этой целью было проанализировано 15 статей, где изложены аналогичные параметры различных способов оценки чувствительности клеток разных типов новообразований [9, 26, 29, 32].

Результаты обработки содержащихся в них данных представлены в таблице 8.

Параметры чувствительности и положительной прогностической значимости (+PV) разработанного авторами метода совпадают с данными ли-

Таблица 5. Чувствительность *in vitro* клеток эмбриональных новообразований к химиопрепаратам в группах пациентов «с ответом» и «без ответа» на терапию

Химиопрепарат	Индекс цитотоксичности, %	
	Ответ на терапию (n=47)	Без ответа на терапию (n=9)
Винкристин	35,0±2,9	29,0±4,4
Карбоплатин	37,7±4,2	42,8±7,2
Метотрексат	37,9±3,2	40,1±6,3
Темозоломид	36,8±4,2	39,3±5,0
Циклофосфамид	39,9±3,6*	25,9±2,2*
Цисплатин	43,8±3,5	42,7±8,4
Цитарабин	39,1±3,2	38,9±5,8
Этопозид	35,5±3,2	42,7±7,1
Медиальное значение	38,5±1,0	

Таблица 6. Ответ *in vivo* эмбриональных неоплазий пациентов на 3–6-месячную химиотерапию и чувствительность клеток к химиопрепаратам *in vitro*

Чувствительность клеток эмбриональных опухолей к химиопрепаратам	Количество образцов эмбриональных опухолей пациентов в зависимости от ответа на курс химиотерапии, %	
	Ответ на терапию (n=47)	Без ответа на терапию (n=9)
Высокая	28,7% (65/226)	11,1% (4/36)
Умеренная	36,7% (83/226)	44,4% (16/36)
Низкая	34,5% (78/226)	44,5% (16/36)

Таблица 7. Ответ *in vivo* нейроэпителиальных неоплазий пациентов на 3–6-месячную химиотерапию и чувствительность клеток к химиопрепаратам *in vitro*

Чувствительность клеток мозговых опухолей к химиопрепаратам	Количество образцов нейроэпителиальных опухолей пациентов в зависимости от ответа на курс химиотерапии, %	
	Ответ на терапию (n=72)	Без ответа на терапию (n=18)
Высокая	29,7% (95/320)	9,0% (6/67)
Умеренная	37,5% (120/320)	34,3% (23/67)
Низкая	32,8% (105/320)	56,8% (38/67)

тературы. Значения специфичности и негативной прогностической значимости несколько ниже. Возможным тому объяснением может служить небольшое количество истинно отрицательных образцов (резистентных в группе «без ответа» на терапию) при значительном их количестве среди ложноположительных (чувствительных в группе «без ответа» на терапию) и ложноотрицательных (не чувствительных в группе «с ответом» на терапию). Это связано с неоднозначной степенью гетерогенности различных типов новообразований и наличием среди одного типа опухолей примерно одинаковой численности клеток, проявляющих чувствительность к химиотерапии (ИЦ химиопрепаратов достоверно не отличался и был выше медиальных значений для каждой группы опухолей) и устойчивых к ней (ИЦ химиопрепаратов был ниже медиального значения ИЦ). Количество последних оказалось особенно высоким в образцах от пациентов с эмбриональными опухолями, отличающихся обилием раковых стволовых клеток [13, 18, 36] с выраженной общей лекарственной толерантностью [8, 46]. Принимая во внимание относительную простоту использования метода и скорость получения верифицированных результатов, небезосновательно рекомендовать предложенный вариант метода по окрашиванию трипановым синим для подбора наиболее эффективных химиопрепаратов при злокачественных интракраниальных опухолях.

Методы индивидуальной оценки лекарственной чувствительности и устойчивости пока не используются широко в повседневной медицинской практике. Их преимущества в прогнозировании ответа опухолей на терапию, как и предпочтительность продиктованных *in vitro* персонифицированных режимов перед конвентиальными, активно обсуждаются.

Одни авторы показали преимущества методов персонифицированного определения химиочув-

ствительности перед стандартной химиотерапией и, опираясь на высокую корреляцию культуральных ответов с клиническими (реакция опухолей, состояние пациентов, протяженность безрецидивного и общего выживания), высказались в поддержку развития методов таргетированного подхода [1, 16, 21, 26, 32, 37]. Другие исследователи не смогли выявить преимуществ методов индивидуальной оценки химиочувствительности перед протокольными и заняли отрицательную позицию [22, 27, 28]. Третьи авторы, установив лишь частичные преимущества в персонифицированном тестировании химиочувствительности, заняли промежуточную позицию [22, 27]. Нередко наблюдения по сопоставлению результатов *in vitro* и *ex vivo* были малочисленны, а если и имели представительную выборку, то не были аккуратно спланированы. Порой в них отсутствуют сведения о длительности безрецидивного и общего выживания пациентов, его качестве, неблагоприятных побочных реакциях, а также не фигурируют «слепые» сравниваемые группы [15, 37]. Отсюда проистекает известная сдержанность в общей оценке проблемы. В 2012 г. появился обширный системный обзор [15] членов рабочей группы Американской ассоциации клинической онкологии (American Society of Clinical Oncology – ASCO), посвященный критическому анализу преимуществ, директированных существующими методами определения *in vitro* терапии перед групповой. Резюмирующая часть содержит формулировку: «использование химиотерапевтических препаратов для индивидуализации терапии пациентов не рекомендуется объективной реальностью» пока не будет проверено медицинской практикой. Между тем, по мнению онкологов, поскольку персонифицированная стратегия, опирающаяся на культуральные исследования, несет в себе потенциальную перспективу, право на ее клиническое испытание остается приоритетным. Широкомасштабное внедрение ме-

Таблица 8. Средние значения показателей различных методов анализа химиочувствительности культур клеток, отличных по гистологическим типам типов неоплазий

Метод	Чувствительность (Se), %	Специфичность (Sp), %	Положительная прогностическая ценность (+PV), %	Отрицательная прогностическая ценность (–PV), %
Метод, разработанный авторами	67,2	56,8	87,3	26,6
Данные литературы	65,2 ± 5,9 (16,6–100)	79,1 ± 6,4 (27–100)	78,1 ± 3,2 (42,7–100)	76,9 ± 5,2 (19–97,7)

тодов индивидуальной оценки химиочувствительности на культурах клеток в клиническую практику возможно будет лишь после получения положительных результатов в масштабных, про- и ретроспективных, грамотно спланированных, клинически контролируемых рандомизированных испытаниях. Состоявшееся 3 года назад в Берлине заседание Генеральной Ассамблеи онкологических институтов Европы приняла резолюцию, в которой признала, что достичь успехов в онкотерапии возможно лишь при учете

персональных маркеров опухолевого процесса [11]. Это становится доминирующим направлением проектов в Европе и США. Так как «персонифицированная медицина» имеет больше шансов на успех, чем стандартная, поскольку задействованные в канцерогенезе гены и их продукты отличаются не только сообразно типу и степени злокачественности опухолей, но и персональными особенностями организма пациента [38]. Их учет становится доминирующей стратегией в онкотерапии.

ЛИТЕРАТУРА • REFERENCES

1. Апшкальне Д. Л., Круминя Г. А., Кикут Р. П., Котельников В. М. Результаты клинического применения методов индивидуальной чувствительности химиотерапевтических препаратов для лечения глиом. *Вопр. нейрохирургии им. Н. Н. Бурденко*: 1980; 6: 7–12.

Apshkalne D. L., Kruminya G. A., Kikut R. P., Kotelnikov V. M. Results of clinical application of individual sensitivity methods of chemotherapeutic agents for the treatment of gliomas. *Voprosy Neyrohirurgii im. Burdenko N. N.* [Burdenko N. N. Questions in Neurosurgery], 1980, № 6, pp. 7–12.
2. Божкова В. П., Брежестовский П. Д., Буравлев В. П. и др. Руководство по культивированию нервной ткани. Методы. Техника. Проблемы; под ред.: Б. П. Вепринцева, И. В. Викторова, Б. Я. Вильнера. – М.: Наука, 1988. – 318 с.

Bozhkova V. P., Brezhestovskiy P. D., Buravlev V. P. et al. "Rukovodstvo po kultivirovaniyu nrvnoy tkani. Metody. Tehnika. Problemy." ["Guidelines for culturing neural tissue. Methods. Technics. Problems."]. Moscow. Nauka Publ. 1988. – p. 318.
3. Иншаков А. Н. Фармакодинамическое моделирование чувствительности опухолевых клеток хронического лимфолейкоза и множественной миеломы к химиопрепаратам in vitro: автореф. дис. ... канд. мед. наук: 14.01.12; [Рос. онкол. науч. центр им. Н. Н. Блохина РАМН]. – М., 2012; 26 с.

Inshakov A. N. Farmakodinamicheskoe modelirovanie chuvstvitelnosti opuholevyh kletok hronicheskogo limfoleykoza I mnozhestvennoy mielomy k himiopreparatam in vitro. Cand. Diss. [Pharmacodynamic modeling of the sensitivity of tumor cells of chronic lymphocytic leukemia and multiple myeloma for chemotherapeutic agents in vitro. Cand. Diss.] Moscow, 2012. p. 26.
4. Конопля Н. Е. Лечение медуллобластомы у детей младше четырех лет // *Мед. журн.* – 2009. – № 1. – С. 112–114.

Konoplya N. E. Treatment of medulloblastoma in children younger four years. *Meditinskij Zhurnal* [Medical journal], 2009, № 1, pp. 112–114.
5. Миронов А. Н., Бунатян Н. Д., Васильева А. Н. и др. Руководство по проведению доклинических исследований лекарственных средств. Часть первая; под ред.: А. Г. Муляра, О. Н. Чиченкова. – М.: Гриф и К, 2012; 944 с.

Mironov A. N., Bunatyan N. D., Vasilyeva A. N. et al. "Rukovodstvo po provedeniyu doklinicheskikh issledovaniy lekarstvennyh sredstv. Chast' pervaya; pod red.: A. G. Mulyara, O. N. Chichenkova." [Guidelines for conducting pre-clinical trials of drugs: Part I.]. Moscow. Grif I K Publ. 2012. 944p.
6. Орлов Ю. А. Комбинированное лечение детей с опухолями головного мозга. *Онкология*: 2005; 7 (4): 332–338.

Orlov Yu. A. Combined treatment of children with brain tumors. *Onkologiya* [Oncology]. 2005. № 7(4), pp. 332–338.
7. Свириновский А. И. Методологические исследования лекарственной чувствительности

- лейкозных клеток. Пробл. здоровья и экол.: 2011; 3: 89–91.
- Svirinovskyj A. I. Methodological investigations of drug sensitivity of leukemic cells. Problemy zdorovya i ekologii [Problems of Health and Ecology], 2011, № 3, pp.89–91.
8. Свирновский А. И., Пасюков В. В. Молекулярные основы феномена химио- и радиорезистентности при опухолевых процессах. Мед. новости: 2007; 11: 7–19.
 - Svirinovskyj A. I., Pasyukov V. V. Molecular basis of the phenomenon of chemo- and radio-resistance in the tumor processes. Meditsinskie Novosti [Medical News], 2007, № 11, p.7–19.
 9. Свирновский А. И., Сергиенко Т. Ф., Алейникова О. В. и др. Скрининг лекарственной чувствительности лейкозных клеток как вариант персонализации терапии опухолевых заболеваний лимфоидной ткани. Здравоохранение. 2012; 7: 8–13.
Svirinovskyj A. I., Sergienko T. F., Aleynikova O. V. et al. Screening of drug sensitivity of leukemia cells as an alternative of personalization of treatment of neoplastic diseases lymphoid tissue. Zdravoohranenie [Healthcare], 2012, № 7, pp.8–13.
 10. Талабаев М. В., Конопля Н. Е. Радикальность нейрохирургического вмешательства в лечении нейроэпителиальных опухолей задней черепной ямки. Мед. панорама: 2009; 3: 10–15.
 - Talabaev M. V., Konoplya N. E. Radicalism of neurosurgical intervention in the treatment of neuroepithelial tumors of the posterior cranial fossa. Meditsinskaya panorama [Medical Panorama], 2009, № 3, pp.10–15.
 11. Чехун В. Ф. От системной биологии рака до методологии персонализированного лечения. Онкология: 2012; 14 (2): 84–88.
 - Chekhun V. F. From systemic biology of cancer to methodology of personalized treatment. Onkologiya [Oncology], 2012, № 14(2), pp.84–88.
 12. Banerjee D., Longo-Sorbello G., Saydam J. et al. Cytotoxicity and cell growth assays. Cell Biology, Cell Tissue Culture: 2006; 0: 315–24.
 13. Bertrand J. Begaud-Grimaud G, Bessette B, et al. Cancer stem cells from human glioma cell line are resistant to Fas-induced apoptosis. Intern. J. of Oncology: 2009; 34 (3): 717–27.
 14. Bosanquet AG. Correlations between therapeutic response of leukaemias and in-vitro drug-sensitivity assay. Lancet: 1991; 337 (8743): 711–14.
 15. Burstein H. J., Mangu P. B., Somerfield M. R. et al. American Society of Clinical Oncology clinical practice guideline update on the use of chemotherapy sensitivity and resistance assays. J. Clin. Oncol.: 2011; 29 (24): 3328–30.
 16. Cortazar P., Johnson B. E. 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.
 17. Courtenay V. D. A replenishable soft agar colony assay for human tumour sensitivity testing. Recent Results Cancer Res: 1984; 94: 17–34.
 18. Fan X., Eberhart C. G. Medulloblastoma stem cells. J. of Clinical Oncology: 2008; 26 (17): 2821–27.
 19. Freshney R. I., Masters J. R. W. et al. Animal Cell Culture: a Practical Approach; ed. J. R. W. Masters. 3rd ed. London: Oxford Univ. Press, 2000; 315 p.
 20. Freshney R. I., Morgan D. Radioisotopic quantitation in microtitration plates by an autofluorographic method. Cell Biol. Int. Rep: 1978; 2(4): 375–80.
 21. Galderisi F, Stark L Li J. et al. Flow cytometric chemosensitivity assay as a predictive tool of early clinical response in acute lymphoblastic leukemia. Pediatr Blood Cancer: 2009; 53 (4): 543–50.
 22. Gallion H., Christopherson W. A., Coleman R. L. et al. Progression-free interval in ovarian cancer and predictive value of an *ex vivo* chemoresponse assay. Int. J. Gynecol. Cancer: 2006; 16 (1): 194–201.
 23. Giasson J., Chen Y. Mysterious stones. Clin. Chem: 2014; 60 (1): 274–75.
 24. Gibbons H. M., Dragunow M. Adult human brain cell culture for neuroscience research. Intern. J. Biochem. Cell Biology: 2010; 42: 844–56.
 25. Greenberg R. Daniels S., Flanders D. Medical Epidemiology; Lange Medical Books. NY, 2001; 215 p.
 26. Herzog T. J., Krivak T. C., Fader A. N. et al. Chemosensitivity testing with ChemoFx and overall

- survival in primary ovarian cancer. *Am. J. Obstet. Gynecol.* 2010; 203 (1): 68. e1–6.
27. Hetland T. E., Kærn J., Skrede M. et al. Predicting platinum resistance in primary advanced ovarian cancer patients with an *in vitro* resistance index. *Cancer Chemother. Pharmacol.* 2012; 69 (5): 1307–14.
 28. Jun K. R., Jang S., Chi H. S. et al. Relationship between *in vitro* chemosensitivity assessed with MTT assay and clinical outcomes in 103 patients with acute leukemia. *Korean J. Lab. Med.* 2007; 27 (2): 89–95.
 29. Kimmell D. W., Shapiro J. R., Shapiro W. R. *In vitro* drug sensitivity testing in human gliomas. *J. of Neurosurgery.* 1987; 66 (2): 161–71.
 30. Louis D. N., Ohgaki H., Wiestler O. D. et al. WHO Classification of Tumours of the Central Nervous System / ed.: Louis, D. Lyon: IARC Press, 2007: 309 p.
 31. Macdonald D. R., Cairncross J. G. Surgery for single brain metastasis. *N. Engl. J. Med.* 1990; 323 (2): 132–3.
 32. Matsuo K., Bond V. K., Eno M. L. et al. Low drug resistance to both platinum and taxane chemotherapy on an *in vitro* drug resistance assay predicts improved survival in patients with advanced epithelial ovarian, fallopian and peritoneal cancer. *Int. J. Cancer.* 2009; 125 (11): 2721–7.
 33. Morgan D., Freshney R. I., Darling J. L. et al. Assay of anticancer drugs in tissue culture: cell cultures of biopsies from human astrocytoma. *Br. J. Cancer.* 1983; 47 (2): 205–14.
 34. Pieters R., Huismans D. R., Loonen A. H. et al. Relation of cellular drug resistance to long-term clinical outcome in childhood acute lymphoblastic leukaemia. *Lancet.* 1991; 338 (8764): 399–403.
 35. Ross D. D., Thompson B. W., Ordóñez J. V., Joneckis C. C. Improvement of flow-cytometric detection of multidrug-resistant cells by cell-volume normalization of intracellular daunorubicin content. *Cytometry.* 1989; 10 (2): 185–91.
 36. Ross R. A., Spengler B. A. Human neuroblastoma stem cells. *Seminars in Cancer Biol.* 2007; 17 (3): 241–7.
 37. Samson D. J., Seidenfeld J., Ziegler K. et al. Chemotherapy sensitivity and resistance assays: a systematic review. *J. Clin. Oncol.* 2004; 22 (17): 3618–30.
 38. Sequist L. V., Muzikansky A., Engelman J. A. A new BATTLE in the evolving war on cancer. *Cancer Discov.* 2011; 1 (1): 14–6.
 39. Tomlinson F. H., Lihou M. G., Smith P. J. Comparison of *in vitro* activity of epipodophyllotoxins with other chemotherapeutic agents in human medulloblastomas. *Brit. J. Cancer.* 1991; 64 (6): 1051–9.
 40. von Hoff D. D., Clark G. M., Stogdill B. J. et al. Prospective clinical trial of a human tumor cloning system. *Cancer Res.* 1983; 43 (4): 1926–31.
 41. Weisenthal L. M., Lippman M. E. Clonogenic and nonclonogenic *in vitro* chemosensitivity assays. *Cancer Treat. Rep.* 1985; 69 (6): 615–32.
 42. Wolff J. E., Trilling T., Mölenkamp G. et al. Chemosensitivity of glioma cells *in vitro*: a metaanalysis. *J. Cancer Res. Clin. Oncol.* 1999; 125 (8/9): 481–6.
 43. Xu J. M., Song S. T., Tang Z. M. et al. Neoadjuvant chemotherapy in inoperable, locally advanced, and inflammatory breast carcinoma: a pilot study of MTT assay *in vitro* and outcome analysis of 10 patients. *Am. J. Clin. Oncol.* 2001; 24 (3): 259–63.
 44. Yataganas X., Strife A., Perez A. et al. Microfluorimetric evaluation of cell kill kinetics with 1-beta-D-arabinofuranosylcytosine. *Cancer Res.* 1974; 34 (10): 2795–806.
 45. Yung W. K. *In vitro* chemosensitivity testing and its clinical application in human gliomas. *Neurosurgical Rev.* 1989; 12 (3): 197–203.
 46. Yang Z., Wu D., Bui T. et al. A novel human multidrug resistance gene *MDR1* variant *G571A* (G191R) modulates cancer drug resistance and efflux transport. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 2008; 327 (2): 474–81.