

**Dana Mičuchová, Dalibor Doležal, Marián Hajdúch**

Laboratoř experimentální medicíny, Ústav molekulární a translační medicíny, Lékařská fakulta UP v Olomouci

## ÚVOD

V příspěvku jsou prezentovány statistické metody, které se rutinně používají při vyhodnocování protinádorového účinku léčiv. Základní výzkum účinku léčiv na zvířatech je v medicíně prvotním krokem k získání znalostí o chování léčivých látek v těle živých organismů. Při prokázání účinku léčiva následuje preklinický výzkum na tzv. buněčných liniích a posledním krokem je klinický výzkum. Při testování změn po podání léčiva ve vztahu k neléčené skupině se z důvodu častého porušení normality dat využívají zejména neparametrické metody. Další rutinně používanou metodou je analýza přežití, protože přežívání zvířat je v průběhu terapie jedním z nejvýznamnějších ukazatelů účinku léčiva.

## ZDROJOVÁ DATA

Jedním z možných typů experimentálních dat jsou hmotnosti a doby přežívání myši, kterým byl nádor transplantován intraperitoneálně (viz obr. 1), případně objemy nádorů. Jedná se obvykle o 3-4 skupiny myši, jimž je aplikováno vehikulum a jedna nebo dvě léčebné látky. Druhý typ dat obsahuje váhy a doby přežívání myši, kterým byla transplantována dutá vlákna. Cílem experimentu je zjistit množství nádorových buněk rezistentních na podanou léčebnou látku. Obvykle se jedná o 3-4 skupiny po 5-10 myších, z nichž každá má po dvou vlákních transplantovaných intraperitoneálně a podkožně. Testuje se vliv rozpouštědla, testované léčebné látky v plné a poloviční koncentraci a léčebné látky, která je již komerčně používána. Dalším možným typem experimentálních dat jsou obrazová data např. ve formě snímků ze sonografu (viz obr. 2). Tato data se zatím v naší laboratoři systematicky neanalyzují, pouze se převádí na číselné údaje, které se následně podrobují statistickému šetření.

## BIOLOGICKÉ METODY

Při realizaci experimentu se nejdříve stanovuje vhodná výchozí dávka léčebné látky. K tomuto účelu je nutné vzít do úvahy všechny dostupné informace o chemické struktuře látky, jejích fyzikálních a chemických vlastnostech, výsledcích zkoušek toxicity a možnostech očekávaného použití. Dalším krokem výzkumu je nutné vybrat vhodné rozpouštědlo (vehikulum). Látka musí být v daném rozpouštědle dobře rozpustitelná, stabilní a pH roztoku se musí pohybovat v rozmezí 6-8. Následujícím krokem je stanovení maximální tolerované dávky (MTD) pro laboratorní zvíře (myš, potkan, králík aj.). Pak se na základě farmakokinetiky zjistí absorpce, distribuce, biotransformace a exkrece testované látky. Podle výsledků se sestaví základní experimentální terapeutické schéma, tedy kolikrát se bude v průběhu 24 hodin látka aplikovat. Na základě provedených testů se může látka použít do studií protinádorové aktivity.

Ve studii se nejdříve vytvoří nádorový zvířecí model (laboratorním zvířatům se transplantují buňky nádorové linie), tedy jakým způsobem a kterému kmenu zvířete bude nádorová linie transplantována. Jedná se o dva základní zvířecí modely: **syngenní** (nádorová linie je transplantována syngennímu příjemci, který je imunokompetentní) a **xenogenní** (nádorová linie, většinou lidská, je transplantována imunodeficientnímu xenogennímu příjemci).

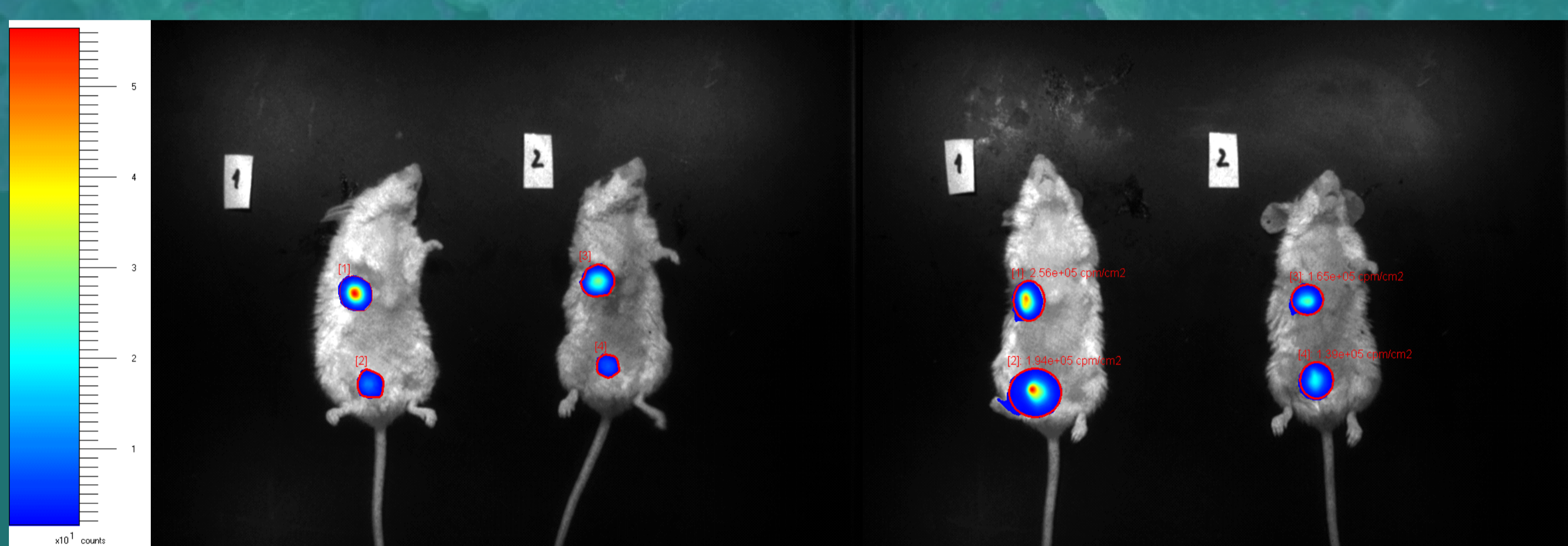
V průběhu studie protinádorové aktivity se hodnotí dynamika nádorového růstu kondiční a výživový stav a parametry přežití.

Protinádorová aktivita testované látky se dá testovat i metodou transplantace tzv. hollowfiber membrány, což je duté mikroporézní syntetické vlákno, které se naplní buněčnou suspenzí tvořenou většinou lidskými liniemi nádorových buněk. V tomto případě je možné použít imunokompetentní zvířata, neboť duté vlákno chrání buňky nádorové linie před buňkami imunitního systému laboratorního zvířete a tak nemožno být buňkami imunitního systému zničeny, ale současně je hollowfiber membrána propustná pro testovanou látku.

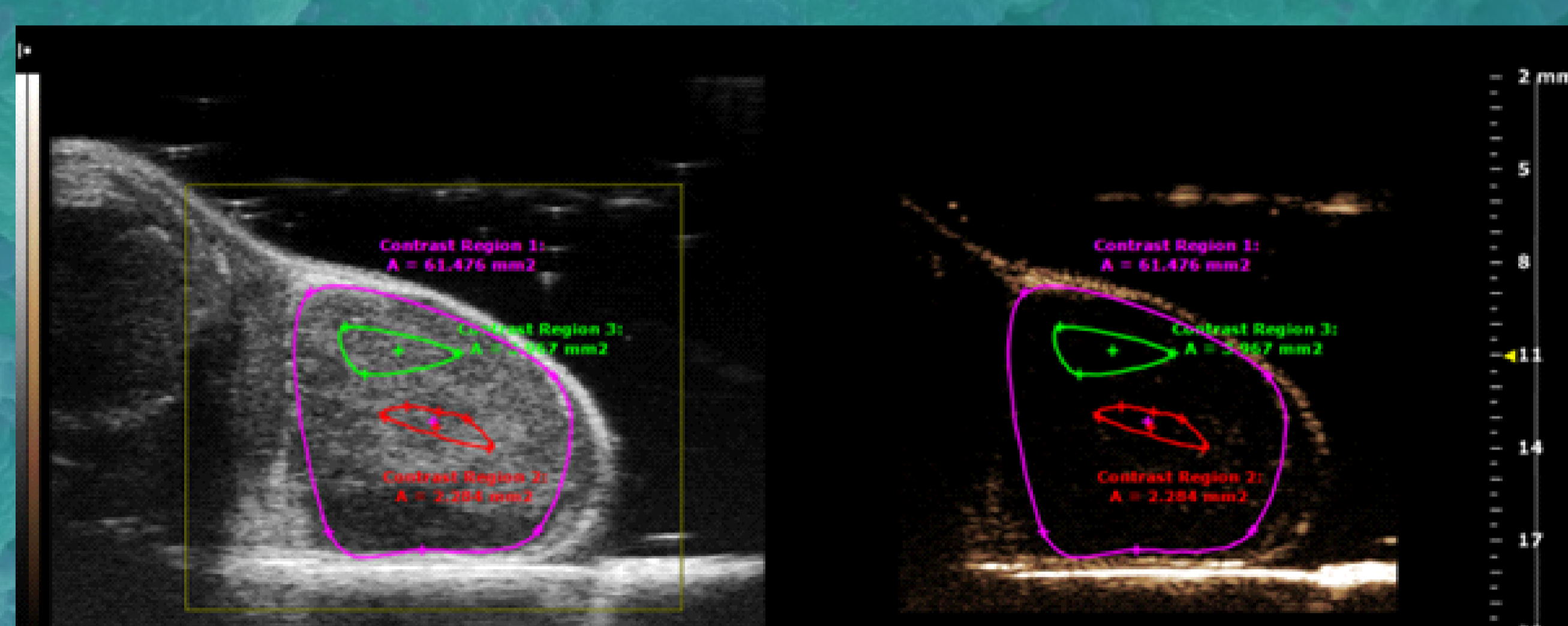
Vlákna naplněná buněčnou nádorovou linií se transplantují podkožně a do břišní dutiny zvířete. Velkou výhodou je, že do jedné myši lze transplantovat čtyři vlákna podkožně a čtyři vlákna do břišní dutiny, čímž získáme větší počet validních výsledků za použití menšího počtu laboratorních zvířat oproti přímé transplantaci nádoru. Dynamika růstu buněčné nádorové linie se stanovuje MTT testem.

Experimenty protinádorové aktivity jsou vždy tvořeny skupinou laboratorních zvířat, kterým je aplikováno dle experimentálního terapeutického schématu rozpouštědlo (vehikulum) a skupinou, nebo skupinami laboratorních zvířat, kterým je aplikována testovaná látka v různých dávkách. V experimentu bývá většinou zařazena i látka s již známým protinádorovým účinkem, tzv. cytostatikem, které je běžně používáno v klinické praxi při léčbě onkologických pacientů (komerčně vyráběné léčivo).

K prokázání protinádorového účinku léčiva jsou následně použity statistické metody, které testují rozdíl ve vlivu rozpouštědla na nádorové buňky a vlivu podávané léčebné látky jak testované, tak již běžně používané.



Obr. 1  
Bioluminescenční snímek myši s transplantovaným nádorem  
Myši č. 1 bylo podáno pouze vehikulum bez léčiva, myši č. 2 bylo aplikováno léčivo A. Snímek vlevo byl pořízen první den po transplantaci, snímek vpravo osmý den od transplantace.



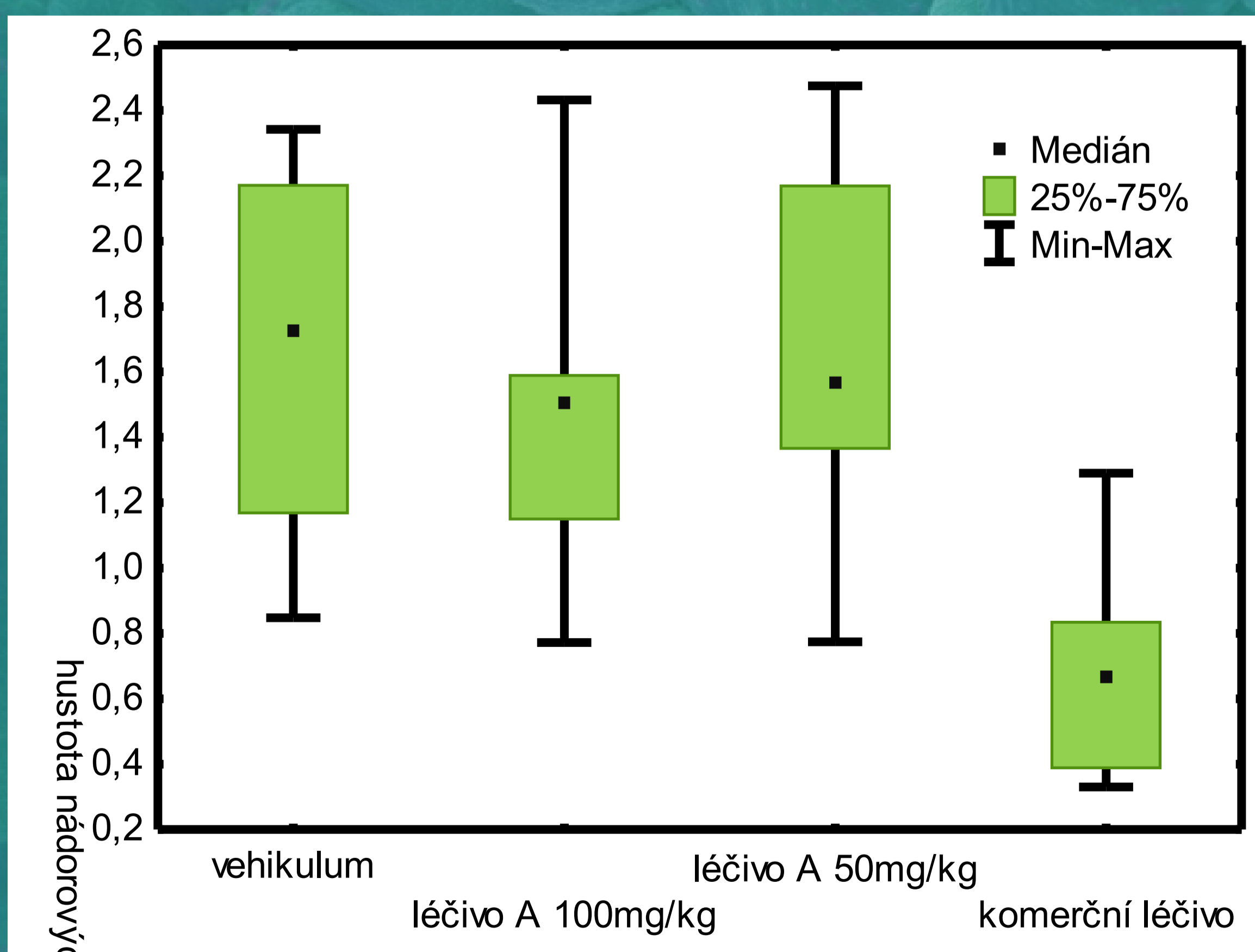
Obr. 2  
Snímek nádoru ze sonografu  
Vlevo je neupravený snímek transplantovaného nádoru, vpravo je zobrazen cévní systém téhož nádoru. Odumřelé části nádoru jsou zobrazeny černě, funkční cévy zásobující nádor světle.

## STATISTICKÉ METODY

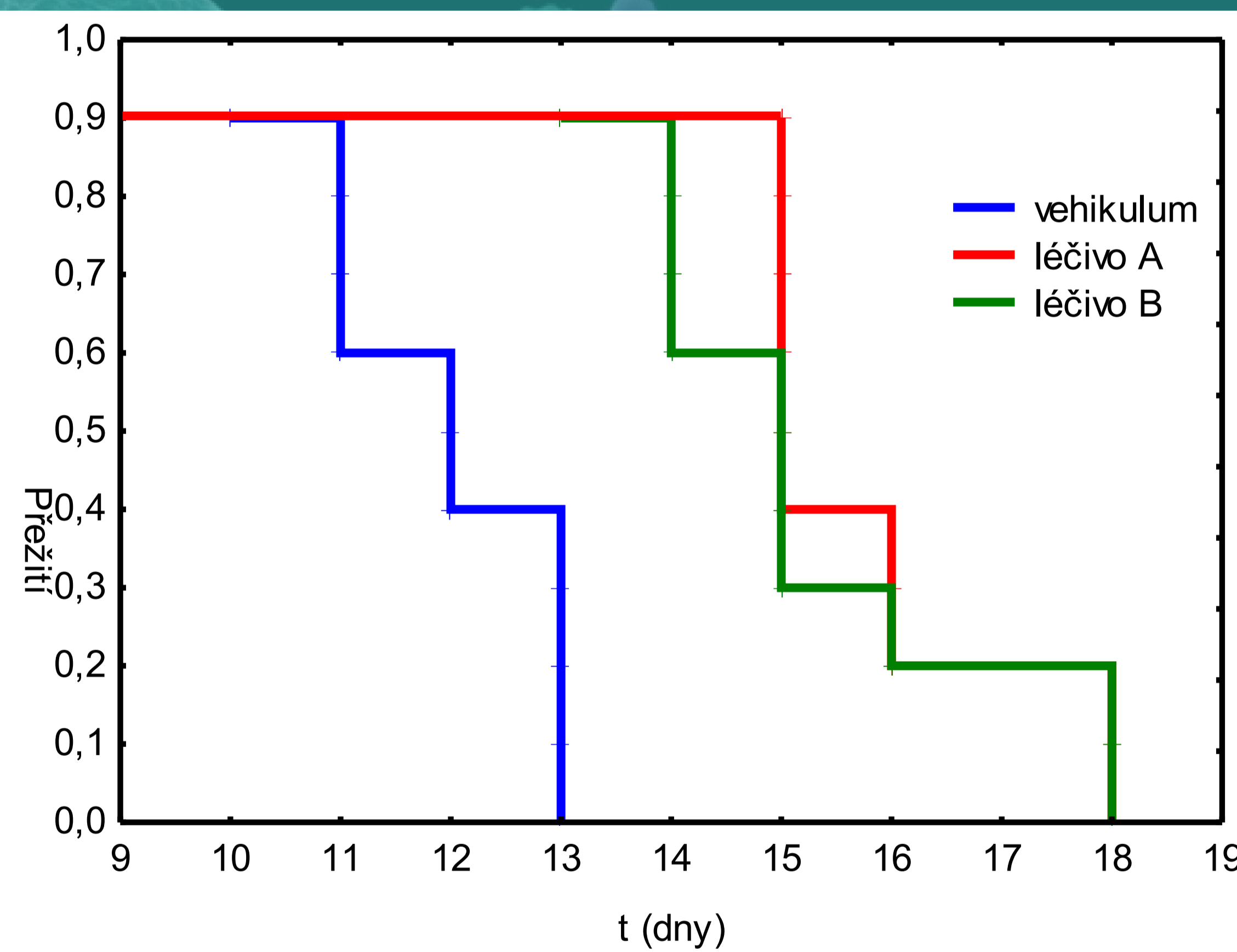
Data jsou zpracována v softwaru STATISTICA 10 (StatSoft, Inc.). Z důvodu malého rozsahu souboru dat a kvůli velmi častému porušení normality se výhradně používají neparametrické metody. Nejčastější úlohou při ověřování účinku léčiv je testování změn velikosti nádorů a hmotností myši v závislosti na podání léčiva. Graficky se tato data znázorňují krabicovými nebo sloupcovými grafy (obr. 3). Při ověřování rozdílů těchto dvou sledovaných parametrů ve skupině myši, jimž bylo aplikováno pouze vehikulum a ve skupinách, kterým byla aplikována léčebná látka, se využívá Kruskalův-Wallisův test, popř. Mannův-Whitneyův test. Vždy se testuje protinádorový účinek rozpouštědla a léčebných látek.

V experimentech s dutým vláknem se data analyzují zejména Mannovým-Whitneyovým testem a graficky zakreslují do krabicového grafu (obr. 3).

Při testování rozdílů v dobách přežívání jednotlivých skupin se používá nejčastěji log-rank test. Graficky se doby přežívání znázorňují pomocí křivek přežití, které se konstruují Kaplanovou-Meierovou metodou (obr. 4). Z důvodu možného zásahu do léčebného plánu v případě nežádoucích účinků léčiv se uvedené analýzy provádí vždy v den měření objemů nádorů a vah myši a vždy při úmrtí aspoň jedné z myši.



Obr. 3  
Krabicový graf hustoty nádorových buněk v dutém vlákně  
Komerčně prodávané léčivo prokazatelně snížilo množství nádorových buněk ( $p = 0,00013$ ). Léčivo A nemá statisticky významný účinek na snížení počtu nádorových buněk ani v plné koncentraci ( $p = 0,97$ ) ani v poloviční koncentraci ( $p = 0,247$ ).



Obr. 4  
Kaplanovy-Meierovy křivky přežití  
Doba přežití myši po podání léčiva A i B je delší než doba přežití neléčených myši, tj. byl prokázán účinek obou léčiv ( $p < 0,0001$ ).

## ZÁVĚR

V základním biomedicinském výzkumu hraje významnou roli statistické zpracování dat. V příspěvku jsou prezentovány pouze vybrané, v naší laboratoři rutinně používané statistické metody.

Testování protinádorového účinku léčiv se většinou omezuje jen na měření vah laboratorních zvířat a objemů jejich nádorů, případně na přežívání zvířat během experimentu. Přesto nezanedbatelnými faktory jsou také chování a výživa zvířat, případně i výsledky krevních testů. Problémem bývá odlišná reakce zvířecího těla na léčbu nádoru od reakce v lidském těle.

Experimenty s laboratorními zvířaty jsou velmi finančně náročné, proto je možné realizovat experimenty jen s malým množstvím zvířat. Z důvodu úspory financí se v některých experimentech transplantují dva nádory jednomu zvířeti, což vede při statistických analýzách k problémům spojených s nezávislostí pozorování. Častým problémem ve zvířecích experimentech je vykoušávání nádorů, tj. znehodnocení výsledků pozorování.

## DEDIKACE

Poster vznikl díky finanční podpoře projektu BIOMEDREG C.1.05/2.1.00/01.0030.

## LITERATURA

DOLEŽAL, D. Práce s laboratorními zvířaty. Laboratorní myš, potkan a králík (Univerzita Palackého v Olomouci). 1. vyd. Olomouc, 2011, 120 s. ISBN: 978-80-244-2947-2  
KLEIN, J.P. Survival Analysis. Springer, 2. vyd. New York, 2005, 590s., ISBN 978-0-387-23918-7  
WASSERMAN, L. All of Nonparametric Statistics. Springer, 1. vyd. New York, 2005, 268s., ISBN 978-0-387-25145-5