

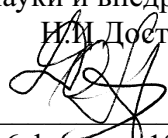
**МИНИСТЕРСТВО ЗДРАВООХРАНЕНИЯ РЕСПУБЛИКИ БЕЛАРУСЬ**

**МЕТОДИЧЕСКИЕ РЕКОМЕНДАЦИИ**

СОГЛАСОВАНО

Начальник отдела  
науки и внедрения

И.И. Доста



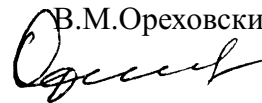
---

16 февраля 1999 г.

УТВЕРЖДАЮ

Первый заместитель  
министра здравоохранения

В.М. Ореховский



---

18 февраля 1999 г.

Регистрационный № 15-9901

**ПРОГНОЗИРОВАНИЕ АДЕКВАТНОСТИ  
АДЬЮВАНТНОЙ ЭНДОКРИННОЙ ТЕРАПИИ  
ЗЛОКАЧЕСТВЕННЫХ ОПУХОЛЕЙ МОЛОЧНОЙ  
И ПРЕДСТАТЕЛЬНОЙ ЖЕЛЕЗ**

**Минск 1999**

**Учреждение-разработчик:** НИИ онкологии и медицинской радиологии им. Н.Н. Александрова

**Авторы:** канд. мед. наук Б.Д. Шитиков, д-р мед. наук, проф. А.С. Мавричев, д-р мед. наук, проф. Л.А. Путырский, канд. мед. наук Н.И. Доста, С.В. Кошелев, М.П. Горская, Л.А. Алексеева, О.И. Камалова

**Рецензент:** д-р мед. наук, проф. Н.И. Крутилина

Рекомендации посвящены адаптации к клинической практике комплекса биологических тестов для прогнозирования адекватности адъювантной эндокринной терапии опухолей молочной и предстательной желез с учетом наличия гормональных рецепторов, ploидности ДНК, изменений пролиферативной активности опухолей.

Предлагаемый лабораторно-методический комплекс апробировался в 1997–1998 гг.

Накопленный опыт биологического тестирования позволяет выявлять среди опухолей молочной и предстательной желез с положительными гормональными рецепторами гормоннезависимые новообразования, характеризующиеся генетической нестабильностью и отсутствием изменений митотической активности под действием эндокринных препаратов.

Методические рекомендации предназначены для онкологов и врачей-лаборантов.

Методические рекомендации утверждены Министерством здравоохранения Республики Беларусь в качестве официального документа.

## ВВЕДЕНИЕ

Эндокринная терапия является эффективным методом адъювантной терапии гормонозависимых опухолей молочной железы, простаты, эндометрия, почки, яичников. На протяжении многих лет используются как аддитивные, так и аблативные гормональные воздействия. В последние годы широкое распространение получили также антагонисты гипофизарных гормонов, что явилось новой ступенью прогресса в лечении рака молочной и предстательной желез.

Сохранение тенденции ежегодного увеличения заболеваемости гормонозависимыми опухолями способствовало разработке множества новых фармацевтических препаратов, изменяющих эндокринную стимуляцию опухолевого роста путем трансформации гормонального сигнала (Международная конференция ESMO, 1997). Стратегия гормонального лечения строится с расчетом на длительное время. При этом изучается эффективность новых антиэстрогенов и антиандрогенов, вызывающих полную эндокринную блокаду опухолей молочной и предстательной желез, а также изменяющих процесс метастазирования и снижающих взаимную конвертацию гормонов.

Интенсивность опухолевой прогрессии является важнейшей динамической характеристикой ее агрессивности, что в конечном счете определяет выживаемость больных (Соколовская Н.Л. и др., 1992). Достижения молекулярной биологии позволили объяснить многие механизмы, посредством которых гормоны, их синтетические аналоги и антагонисты регулируют рост опухолей. Спектр этих воздействий многообразен, однако способность ответа на эндокринные воздействия всегда является специфическим свойством клеток органов-мишеней и прежде всего зависит от присутствия в них гормональных рецепторов.

Гормонально-рецепторный комплекс, влияя на ядерный аппарат клетки, может приводить к усилению или снижению продукции факторов роста опухоли, изменению ее пролиферативной активности, а также через ДНК-связывающие протеины может ингибировать экспрессию онкогенов, в связи с чем наличие в опухоли гормональных рецепторов является прогностическим фактором не только для оценки адекватности эндокринной терапии, но и в отношении опухолевого роста.

Определение специфических рецепторов стероидных гормонов в цитозоле опухолевых клеток используется в качестве одного из критериев гормоночувствительности (Прохорова В.И. и др., 1984), что имеет важное значение при планировании адъювантной терапии. Вместе с тем более 30–40% рецепторположительных опухолей впоследствии оказываются гормонорезистентными (Хатченкова Н.В. и др., 1987).

На современном уровне знаний адекватность планируемой эндокринной терапии опухолей молочной и предстательной желез связывается не только с определением рецепторов, стимулирующих опухолевый рост, но также с устойчивостью генома опухолевой клетки и изменением митотической активности опухоли (Daidone M.G. et al., 1990; Veronese S.M. et al., 1993; Nakama M. et al., 1995).

С практических позиций важность указанных исследований заключается прежде всего в определении опухолей с гормоноположительным рецепторным статусом, нечувствительных к гормонотерапии в связи с нарушениями

генетического аппарата клеток. Такая диагностика позволила бы исключить при индивидуальном планировании эндокринной адьювантной терапии длительное применение неэффективных дорогостоящих препаратов, нередко обладающих негативным побочным действием.

В ходе выполненных исследований 420 случаев первичного рака молочной и предстательной желез показано, что при определении гормонозависимости опухолей гормонорецепторный анализ существенно дополняется данными проточной цитометрии (плоидностью ДНК), характеризующими несбалансированность генома и гетерогенность новообразования, а также анализом изменений митотической активности под действием эндокринных препаратов, определяющим потенцию злокачественного роста и адекватность планируемой эндокринной терапии.

В Республике Беларусь предлагаемые методики рентабельно внедрять в крупных онкологических клиниках с предшествующим обучением врачей-лаборантов на рабочем месте в НИИ онкологии и медицинской радиологии им. Н.Н. Александрова.

## **ПОКАЗАНИЯ**

Показанием к исследованию является наличие у пациентов опухолевого образования молочной или предстательной железы.

## **ИССЛЕДОВАНИЕ РЕЦЕПТОРОВ СТЕРОИДНЫХ ГОРМОНОВ**

### **I. Определение рецепторов эстрадиола в опухолях**

#### **1. Обработка опухолей для получения цитозоля**

Образец опухоли в операционной замораживают в жидком азоте и хранят в сосуде Дюара при  $-70^{\circ}\text{C}$ . Все операции по определению рецепторов проводятся на льду.

Для получения гомогената ткань обрабатывают спиртом, освобождают от жира и соединительно-тканых участков, взвешивают, измельчают ножницами и помещают в охлажденную жидким азотом ступку. В нее добавляют жидкий азот и растирают опухолевую ткань в порошок.

Для определения рецепторов берут около 500 мг опухолевой ткани.

Измельченную ткань переносят в стакан для гомогенизации, куда добавляют 8–10 объемов ТЭД-буфера, рН 7,4 (10 ммоль трис-НСl, 1,5 ммоль ЭДТА, 0,5 ммоль дитиотрептола), содержащего 10% глицерина по объему.

Буферный раствор готовят заранее, не добавляя дитиотрейтол, который вносится перед использованием буфера. Гомогенат центрифугируют при 2500 об/мин 10 мин при  $0-4^{\circ}\text{C}$  для осаждения грубых осколков ткани.

Супернатант отбирают и центрифугируют в течение 0,5–1 ч при 100 000 об/мин и  $0-4^{\circ}\text{C}$ .

Надосадочную жидкость используют для определения рецепторов эстрадиола.

#### **2. Определение рецепторов**

Берут 7 пробирок ( $0,5 \times 7$  см). В первую помещают рассчитанное по приведенной ниже формуле такое количество разведенного раствора  $^3\text{[H]}$ -эстрадиола-17b, чтобы его концентрация в цитозоле составила 5 нмоль.

В три другие пробирки добавляют такое количество немеченого эстрадиола, чтобы его концентрация в 100–150 раз превышала концентрацию  $^3\text{[H]}$ -эстрадиола (5 мкл спиртового раствора с концентрацией 4–6 мкг/мл). Три оставшиеся пробирки остаются пустыми.

Этанол из пробирок с меченым и немеченым гормоном выпаривают досуха, пробирки помещают в ледяную баню. В пробирку с  $^3\text{[H]}$ -эстрадиолом помещают 700 мкл цитозоля, встряхивают и разливают по 100 мкл в остальные пробирки.

Встряхивают пробирки с немеченым эстрадиолом и инкубируют в ледяной бане в холодильнике в течение 18–20 ч. Затем в каждую пробирку добавляют по 100 мкл суспензии активированного угля, покрытого декстраном. Пробирки встряхивают и инкубируют в ледяной бане в течение 15 мин, после чего центрифугируют при 1500 об/мин и 0–4°C в течение 10–15 мин.

По 100 мкл надосадочной жидкости из каждой пробирки отбирают во флаконы с 5 мл сцинтилляционной жидкости «Ultima golde» и измеряют активность в DPM в каждой пробе.

### 3. Приготовление рабочих растворов

#### *Разведение $^3\text{[H]}$ -эстрадиола*

В пробирку помещают 5 мл  $^3\text{[H]}$ -эстрадиола с удельной активностью 1600 ТБк/моль и выпаривают досуха, после чего растворяют в 125 мл дважды перегнанного этанола.

4 аликвоты по 5 мкл этого разведенного раствора отбирают в сцинтилляционные флаконы с 5 мл сцинтилляционной жидкости для подсчета радиоактивности. Концентрацию разведенного раствора рассчитывают по формуле:

$$C^3\text{[H]} = \frac{DPM}{K \times 5} \text{ нмоль},$$

где DPM — средняя радиоактивность аликвоты 5 мкл (распадов/мин),

K — коэффициент, связанный с удельной активностью используемого изотопа (A);  $K = 2,2 \times A$ ,

5 — объем аликвоты (мкл).

Количество разведенного раствора изотопа (мкл), которое нужно брать на одну пробу, можно рассчитать по формуле:

$$X = \frac{C_{\text{цит}} \times V}{C^3\text{[H]}} \text{ мкл},$$

где  $C^3\text{[H]}$  — концентрация разведенного раствора изотопа (нмоль),

$C_{\text{цит}}$  — концентрация  $^3\text{[H]}$ -гормона, которую необходимо создать в цитозоле,

V — объем цитозоля (мкл), добавляемый в исходную пробирку.

#### *Приготовление ТЭД-буфера*

1. Трис-(оксиметил)-аминометан — 20 ммоль (2,42 г)

2. ЭДТА-динатриевая соль — 1,5 ммоль (0,559 г)

3. Дитиотрейтол (0,5 ммоль (0,077 г)) добавляют непосредственно перед употреблением

4. Глицерин — 100 мл

Доводят до 1 л дистиллированной водой.

Содержание рецепторов стероидных гормонов в цитозоле опухоли выражают в фемтомолях (фмоль) гормона, специфически связанного 1 мг цитозольного белка. Эту величину рассчитывают по формуле:

$$N = \frac{DPM_{\text{общ}} - DPM_{\text{неспец}}}{K \times 0,1 \times C_6} \times 2,$$

где N — количество рецепторов (фмоль/мг белка),

$DPM_{\text{общ}}$  — средняя величина общего (в отсутствие конкурента) связывания меченого гормона аликвотой надосадочной жидкости (распадов/мин),

$DPM_{\text{неспец}}$  — средняя величина неспецифического (в присутствии конкурента) связывания аналогичной аликвотой (распадов/мин).

Разность  $DPM_{\text{общ}} - DPM_{\text{неспец}}$  соответствует специфически связанному гормону.

K — коэффициент, связанный с удельной активностью  $A^3[H]$ -стероида ( $K = 2,2 \times A$ ),

$C_6$  — концентрация белка, определенная по методу Лоури.

*Определение белка по методу Лоури*

1. Раствор альбумина, содержащий 100 мкг/мл буфера.
2.  $Na_2CO_3$  — 2% в 0,1 н. растворе NaOH.
3.  $CuSO_4$  © Белорусский центр научной медицинской информации МЗ РБ (оформление и издание), 2000 г. © Министерство здравоохранения Республики Беларусь, 2000 г.  $\times 5H_2O$  — 0,5%-й раствор в 1%-м растворе цитрата Na.
4. Рабочий раствор: 1 мл реактива 3 в день определения смешивают с 50 мл реактива 2.
5. Реактив Фолина разводят дистиллированной водой с таким расчетом, чтобы получился 1 н. раствор кислоты. Кислотность определяют титрованием разведенного в 10 раз раствора 0,1 н. щелочью в присутствии фенолфталеина.

Цитозоль для определения разводят в 50 раз буфером ТЭД. К 0,4 мл данного разведения приливают 2,0 мл рабочего раствора 4, перемешивают и оставляют при комнатной температуре на 10 мин, затем добавляют 0,2 мл раствора реактива Фолина, содержимое тщательно перемешивают и через 30 мин калориметрируют при 750 нм.

Содержание белка рассчитывают по калибровочному графику. Для этого готовят 5 разведений альбумина в ТЭД-буфере с концентрациями 100, 75, 50, 25, 12,5 мкг/мл.

Концентрация белка в цитозоле не должна быть ниже 0,75 мг/мл. Максимальное количество рецепторов определяется при концентрации общего белка цитозоля 0,75–1,25 мг/мл.

## II. Определение рецепторов прогестерона в опухолях

Рецепторы прогестерона определяют, используя в качестве меченого лиганда  $^3H$ -прогестерон в концентрации 20 нмоль (или синтетический аналог прогестерона).

Исследования проводят аналогично методике определения рецепторов эстрадиола. Отличием является внесение в исходную пробирку с  $^3H$ -прогестероном 50-кратного избытка немеченого гидрокортизона (5 мкл

спиртового раствора с концентрацией 40 мкг/мл) для предотвращения взаимодействия с рецепторами глюкокортикоидов.

### **III. Определение рецепторов тестостерона в опухолях**

Исследования проводят аналогично предыдущим методикам. В исходную пробирку помещают такое количество раствора  $^3\text{H}$ -дигидротестостерона, чтобы его концентрация в цитозоле составила 10 нмоль, туда же добавляется 5 мкл триамцинолона ацетонида с концентрацией 250 мкг/мл для предотвращения связывания андрогенов с рецепторами прогестерона.

Расчет содержания рецепторов проводится аналогично предыдущей методике.

### **Контроль качества при определении рецепторов стероидных гормонов**

Внутрилабораторный контроль качества определения рецепторов стероидных гормонов при еженедельном выполнении методики проводится с использованием аликвоты цитозолей предыдущих исследований или лиофильного порошка цитозольной фракции, который хранится дольше.

Меченые препараты эстрадиола, прогестерона, тестостерона фирмы «Amersham» могут храниться в течение 3–6 мес. при  $t = 18^\circ\text{C}$  и не требуют проведения очистки радиоактивных стероидов.

Контрольный материал для анализа точности готовится в самой лаборатории. Хранение образцов опухолевой ткани для получения цитозолей, в которых предполагается определение стероидных гормонов, может производиться в жидком азоте в течение 1–1,5 мес. Лиофилизированный порошок опухолевой ткани или цитозольной фракции годен в течение 1–1,5 лет. Растворение 1 порции порошка проводится за 1 час до исследования в буферном растворе с глицерином (вес/объем — 1/10) при  $0-4^\circ\text{C}$ .

### **IV. Исследование митотической активности в опухолевой ткани**

#### **1. Приготовление рабочих растворов**

а) Питательная среда состоит из синтетической среды 199 с добавлением 20%-й сыворотки крупного рогатого скота, инсулина (20 МЕ/л), глюкозы (12,8 г/л).

б) 0,5 н. хлорная кислота: 57 мл + 943 мл воды.

в) 0,25 н. хлорная кислота: 28,5 мл + 971,5 мл воды.

г) Смесь Никифорова (спирт с эфиром в соотношении 1:1).

#### **2. Приготовление рабочих растворов меченого тимидина**

Исходную упаковку  $^3\text{H}$ -тимидина (0,029 мКи = 10 МБк) или ее аликвоту (50–100 мкл) разводят в 5–10 мл дважды перегнанного этанола; 2–4 аликвоты по 5 мкл этого разведенного раствора отбирают во флаконы со сквинтилляционной жидкостью (5 мл) для подсчета радиоактивности. Концентрацию разведенного раствора изотопа (С) рассчитывают по формуле:

$$C = \frac{DPM}{K \times 5} \text{ нмоль,}$$

где 5 — объем аликвоты,

K — коэффициент, связанный с удельной радиоактивностью изотопа (K=2,2 А),

DPM — средняя радиоактивность аликвоты (распадов/мин).

## КОМПОНЕНТЫ МЕТОДА

### а) Взятие материала и культивирование опухолевой ткани

Исследуемый материал освобождается от поврежденных участков, некрозов, кровоизлияний, промывается растворами Хенкса или Эрла. Ткань разрезают скальпелем на кусочки с максимальными размерами граней 0,5 мм и помещают по 4–6 кусочков в пробирку с 1 мл питательной среды.

Культуры готовят сразу после взятия материала. В крайних случаях допускается хранение измельченной ткани в питательной среде в течение 12–16 часов при 4°C (согласно данным С.М. Лесковой (1984), хранение кусочков опухоли при 4°C в течение суток существенно не влияет на показатели включения меченного тритием тимидина в ДНК опухолевых клеток; в работе был использован метод переживающих культур, модифицированный А. Robins, D. Taylor, 1981).

### б) Внесение радиоактивной метки и определение уровня радиоактивности образцов

Активный тимидин добавляют за час до окончания инкубации культур в концентрации 3 мкл/мл. После часовой экспозиции с ним питательную среду сливают, а кусочки опухоли дважды промывают охлажденным до 2–4°C раствором Хэнкса, который затем тщательно удаляют. Для устранения трития, который был захвачен метками, но не включился в состав ДНК (кислоторастворимый пул), в пробирки добавляют по 2–5 мл охлажденной до той же температуры 0,25 н. хлорной кислоты и оставляют на ночь в холодильнике. После тщательного удаления кислоты пробы обрабатывают в течение 15 мин смесью Никифорова для извлечения липидов.

Экстрагирование нуклеотидов производят на водяной бане ультратермостата при 80°C в течение 20 мин, поместив кусочки опухоли в 0,8 мл 0,5 н. хлорной кислоты. Затем пробирки быстро охлаждают в кювете с тающим льдом и полученный экстракт используют для определения уровня радиоактивности в сцинтилляционной жидкости.

Для измерения берут 6 мл ЖС-8, в которую добавляют 0,3 мл хлорного экстракта и 0,1 мл водного раствора аммиака до нейтральной реакции среды. Радиоактивность измеряли в импульсах/мин.

### *Состав питательной среды:*

- 1) среда № 199;
- 2) 20%-я сыворотка крупного рогатого скота;
- 3) инсулин, 120 МЕ/л;





Для пересчета количества нуклеинового фосфора на количество собственно нуклеиновой кислоты пользуются обычным пересчетным коэффициентом 10,3:

$$C_{\text{нк}} = 10,3 \cdot C_{\text{мкгРНК}}$$

Описанным методом можно также определять содержание нуклеиновых кислот и тогда, когда изучаемый препарат содержит только РНК и ДНК. Однако при этом для пересчета содержания фосфора на содержание нуклеиновой кислоты лучше пользоваться пересчетным коэффициентом 10,5 для РНК и 10,1 для ДНК (исходя из теоретического содержания фосфора — 9,5% в РНК и 9,9% в ДНК).

Метод дает оценку суммарного включения в популяцию клеток, находящихся в S-фазе клеточного цикла.

Исследования изменений митотической активности опухолей под действием гормональных препаратов проводят после определения гормональных рецепторов в тех случаях, когда содержание рецепторов стероидных гормонов находится в пределах 10–50 фмоль/ мг белка цитозоля.

Для определения индивидуальной гормонозависимости каждой опухоли изучалось изменение ее митотической активности под действием специфических эндокринных препаратов *in vitro* после 5-часовой инкубации (в витальных средах), необходимой для полного развития ответа опухолевой клетки на гормональные воздействия.

Инкубация с гормональными препаратами проводилась до внесения <sup>3</sup>H-тимидина.

Проведенные в НИИ онкологии и медицинской радиологии им. Н.Н. Александрова исследования по определению сбалансированности генома (плоидности ДНК) изученных рецепторположительных опухолей установили, что многоклоновость и анеуплоидия (присутствие клонов опухолевых клеток с неправильным набором хромосом) способствуют развитию гормоннезависимости даже при наличии специфических гормональных рецепторов. Следует отметить, что концентрация рецепторов в таких случаях обычно не превышает 50 фмоль/мг белка цитозоля.

В повседневной клинической практике (при отсутствии проточного цитофлуориметра для определения несбалансированности генома) комплексный анализ концентрации в опухоли специфических гормональных рецепторов и изменения митотической активности под действием специфических эндокринных препаратов является объективным способом прогнозирования адекватности планируемой гормонотерапии рака молочной и предстательной желез.

С практических позиций важность таких исследований заключается прежде всего в определении опухолей с гормоноположительным рецепторным статусом, нечувствительных к эндокринотерапии в связи с нарушениями генетического аппарата клеток, о чем можно судить и по изменению митотической активности клеток. Такая диагностика позволила бы исключить при индивидуальном прогнозировании адекватности адъювантной терапии длительное применение неэффективных дорогостоящих препаратов, нередко обладающих негативным побочным действием.