

**МИНИСТЕРСТВО ЗДРАВООХРАНЕНИЯ
РЕСПУБЛИКИ БЕЛАРУСЬ**

УТВЕРЖДАЮ

Первый заместитель министра

_____ Д.Л. Пиневиц

28.11.2012

Регистрационный № 136-1211

**ОЦЕНКА ВЛИЯНИЯ ПРОТИВООПУХОЛЕВЫХ ЛЕКАРСТВЕННЫХ
СРЕДСТВ НА ОПУХОЛЕВЫЕ КЛЕТКИ РАКА МОЛОЧНОЙ ЖЕЛЕЗЫ
В ПЕРВИЧНОЙ КУЛЬТУРЕ**

инструкция по применению

УЧРЕЖДЕНИЯ-РАЗРАБОТЧИКИ: ГНУ «Институт биофизики и клеточной инженерии Национальной академии наук Беларуси», ГУ «Республиканский научно-практический центр онкологии и медицинской радиологии им. Н.Н. Александрова»

АВТОРЫ: канд. хим. наук М.А. Мартынова, канд. биол. наук Н.А. Шуканова, канд. биол. наук С.В. Пинчук, И.М. Бушмакина, М.М. Молчан, д-р мед. наук, проф. Л.А. Путьрский, канд. мед. наук Ю.Л. Путьрский, Н.А. Козловская

Минск 2011

Инструкция по применению (далее — инструкция) разработана с целью определения чувствительности к противоопухолевым лекарственным средствам клеток рака молочной железы (РМЖ) в клеточной тест-системе (первичной культуре) опухолевых клеток.

Инструкция предназначена для врачей-онкологов и врачей других специальностей, оказывающих медицинскую помощь пациенткам, страдающим РМЖ.

ПЕРЕЧЕНЬ НЕОБХОДИМОГО ОБОРУДОВАНИЯ, РЕАКТИВОВ, СРЕДСТВ, ИЗДЕЛИЙ МЕДИЦИНСКОЙ ТЕХНИКИ

Оборудование:

1. Комплект хирургического инструментария, необходимого для выполнения операции по забору опухолевой ткани или трепанобиопсии.

2. CO₂-инкубатор.

3. Ламинарный шкаф.

4. Термостат.

5. Центрифуга лабораторная.

6. Фотометр.

7. Шприцы различного объема.

8. Автоматические пипетки-дозаторы.

Лекарственные средства, реактивы:

1. Противоопухолевые лекарственные средства:

- доксорубицин;

- циклофосфан;

- фторурацил;

- метотрексат;

- паклитаксел;

- любое лекарственное средство, которое планируется использовать для химиотерапии.

2. Среда RPMI 1640.

3. L-глутамин.

4. Эмбриональная телячья сыворотка.

5. Гентамицина сульфат.

6. Ацетилтиохолин.

7. 5,5'-Дитиобис (2-нитробензойная кислота) — реактив Элмана.

8. Сода кальцинированная (Na₂CO₃).

9. Гидроксид натрия (NaOH).

10. Калий-натрий-виннокислый.

11. Додecilсульфат натрия.

12. Сульфат меди (CuSO₄·5H₂O).

13. Хлорид натрия (NaCl).

14. Динатриевый гидрофосфат (Na₂HPO₄).

15. Дигидрофосфат натрия (NaH₂PO₄).

Необходимые условия культивирования:

1. Стерильность.

2. Температура 37°C.
3. Влажная атмосфера при постоянном давлении 5% CO₂.

ПОКАЗАНИЯ К ПРИМЕНЕНИЮ

Оценка влияния противоопухолевых лекарственных средств на активность ацетилхолинэстеразы (АХЭ) в первичной культуре клеток РМЖ.

ПРОТИВОПОКАЗАНИЯ ДЛЯ ПРИМЕНЕНИЯ

Отсутствуют.

ОПИСАНИЕ ТЕХНОЛОГИИ ИСПОЛЬЗОВАНИЯ МЕТОДА

Этап культивирования клеток РМЖ с противоопухолевыми лекарственными средствами в первичной культуре

В образцы первичной культуры РМЖ добавляют лекарственное средство или смесь лекарственных средств и помещают в CO₂-инкубатор на 48–72 ч. Концентрацию лекарственных средств в первичной культуре клеток РМЖ рассчитывают с учетом клинически значимых доз, применяемых в онкологической практике. В условиях *in vitro* для доксорубина концентрация составляет 20 мкг/мл; для циклофосфана — 240 мкг/мл; для фторурацила — 240 мкг/мл; для метотрексата — 16 мкг/мл и паклитаксела — 70 мкг/мл. После окончания культивирования образцы разбавляют в 3 раза забуференным фосфатами физиологическим раствором (ЗФР, рН = 7,4), центрифугируют 7 мин при 400 g на лабораторной центрифуге, клеточный осадок ресуспендируют в 3 мл ЗФР и трехкратно отмывают в ЗФР от среды культивирования. После последнего центрифугирования осадок ресуспендируют в 0,5–2 мл ЗФР.

Этап определения активности ацетилхолинэстеразы в опухолевых клетках РМЖ

Суспензию клеток разводят в несколько раз так, чтобы величина оптической плотности не превышала 0,3–0,5 отн. ед. при $\lambda = 412$ нм. К 2 мл клеточной суспензии добавляют 30 мкл реактива Элмана (10 ммоль/л) и инкубируют 30 мин при 37°C, затем добавляют 100 мкл ацетилтиохолина (7,5 ммоль/л) и измеряют оптическую плотность на фотометре сразу после добавления субстрата и через каждые 10 мин инкубации в водяном термостате при 37°C. Скорость увеличения оптической плотности соответствует скорости гидролиза ацетилтиохолина, а следовательно, активности ацетилхолинэстеразы (АХЭ). Активность АХЭ пересчитывают на концентрацию белка в суспензии. Концентрацию белка в суспензии можно определять любым стандартным методом, включая метод Лоури.

Этап оценки чувствительности опухолевых клеток к противоопухолевым лекарственным средствам в первичной культуре

Чувствительность или резистентность опухолевых клеток РМЖ *in vitro* к используемым лекарственным средствам оценивают путем сравнения активности АХЭ опухолевых клеток после культивирования в присутствии лекарственных средств ($A_{ц}$) с активностью АХЭ таких же клеток после культивирования без лекарственных средств ($A_{к}$ — контроль). Для этого увеличение оптической

плотности $\Delta D = D_t - D_0$, которое происходит за время t в результате гидролиза ацетилтиохолина АХЭ опухолевых клеток, предварительно культивируемых без или в присутствии лекарственных средств, пересчитывают по калибровочным кривым в нМ гидролизованного субстрата в 1 мин на количество белка в 1 мл клеточной суспензии $[C_0]$. Так как измерение активности АХЭ проводится в одинаковом временном интервале для A_k и $A_{ц}$ и оптическая плотность суспензии клеток линейно зависит от количества гидролизованного субстрата, процедуру пересчета активности фермента в абсолютных единицах (нмоль/мг белка в 1 мин) можно упростить до оценки величин $N_{ц} = \Delta D_{ц} / [C_0]$ и $N_k = \Delta D_k / [C_0]$, т. е. определять значение N_k , равное увеличению оптической плотности в 1 мин, пересчитанное на количество белка в 1 мл суспензии клеток, культивированных без лекарственных средств, и значение $N_{ц}$ для клеток, культивированных в присутствии лекарственных средств. При отношении $N_{ц}/N_k < 1$ наблюдается положительный эффект влияния лекарственных средств на опухолевые клетки, и чем ближе эта величина к нулю, тем эффекты более выражены. При $N_{ц}/N_k \geq 1$ лекарственные средства в первичной культуре или не влияют на опухолевые клетки, или усиливают пролиферативную активность клеток.

Интерпретация результатов: изменение активности АХЭ опухолевых клеток, культивируемых в первичной культуре без и в присутствии противоопухолевых лекарственных средств, позволяет оценивать влияние этих препаратов на опухоль.

ПЕРЕЧЕНЬ ВОЗМОЖНЫХ ОСЛОЖНЕНИЙ ИЛИ ОШИБОК ПРИ ВЫПОЛНЕНИИ И ПУТИ ИХ УСТРАНЕНИЯ

Перечень возможных ошибок: стандартная погрешность используемых автоматических пипеток-дозаторов и измерительных приборов.