

**МИНИСТЕРСТВО ЗДРАВООХРАНЕНИЯ  
РЕСПУБЛИКИ БЕЛАРУСЬ**

УТВЕРЖДАЮ

Первый заместитель министра

\_\_\_\_\_ Д.Л. Пиневич

28.11.2012

Регистрационный № 137-1211

**ОПРЕДЕЛЕНИЕ ЧУВСТВИТЕЛЬНОСТИ ОПУХОЛЕВЫХ КЛЕТОК  
РАКА МОЛОЧНОЙ ЖЕЛЕЗЫ В ПЕРВИЧНОЙ КУЛЬТУРЕ  
К ПРОТИВООПУХОЛЕВЫМ ЛЕКАРСТВЕННЫМ СРЕДСТВАМ  
С ЦЕЛЬЮ ВЫБОРА ОПТИМАЛЬНЫХ СХЕМ ХИМИОТЕРАПИИ**

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 других врачей-специалистов, 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 трепан-биопсии.

2. CO<sub>2</sub>-инкубатор.

3. Ламинарный шкаф.

4. Термостат.

5. Центрифуга лабораторная.

6. Фотометр.

7. Шприцы различного объема.

8. Автоматические пипетки-дозаторы.

### **Лекарственные средства:**

1. Доксорубицин.

2. Циклофосфан.

3. Фторурацил.

4. Метотрексат.

5. Паклитаксел.

6. Любое лекарственное средство (ЛС), которое планируется использовать для химиотерапии.

### **Реактивы и среды:**

1. Среда RPMI 1640.

2. L-глутамин.

3. Эмбриональная телячья сыворотка.

4. Гентамицина сульфат.

5. Ацетилтиохолин.

6. 5,5'- Дитиобис (2-нитробензойная кислота) — реактив Элмана.

7. Сода кальцинированная (Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>).

8. Гидроксид натрия (NaOH).

9. Калий-натрий-виннокислый.

10. Додecilсульфат натрия.

11. Сульфат меди (CuSO<sub>4</sub>·5H<sub>2</sub>O).

12. Хлорид натрия (NaCl).

13. Динатриевый гидрофосфат (Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>).

14. Дигидрофосфат натрия (NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>).

## **ПОКАЗАНИЯ К ПРИМЕНЕНИЮ**

Необходимость определения химиочувствительности опухоли с целью выбора оптимальных схем химиотерапии.

## **ПРОТИВОПОКАЗАНИЯ ДЛЯ ПРИМЕНЕНИЯ**

Отсутствуют.

## **ОПИСАНИЕ ТЕХНОЛОГИИ ИСПОЛЬЗОВАНИЯ МЕТОДА**

### **Перечень необходимых клиничко-лабораторных исследований**

- клиническая оценка местного статуса (размер опухоли в наибольшем измерении; локализация опухоли в молочной железе, ее соотношение с кожей, соском, размером молочной железы; состояние регионарных лимфатических узлов);
- цитологическое исследование пунктата или материала трепанобиопсии опухоли;
- маммография с обеих сторон в двух проекциях;
- УЗИ молочных желез (измерение объема опухоли);
- УЗИ органов брюшной полости;
- рентгенологическое исследование органов грудной клетки;
- остеосцинтиграфия;
- Эхо-КГ (фракция выброса);
- ЭКГ;
- общий анализ крови (до начала лечения; перед и после каждого курса химиотерапии);
- биохимический анализ крови (белок, билирубин, мочеви́на, креатинин, АСТ, АЛТ, ЩФ);
- общий анализ мочи.

### **Технология определения чувствительности опухолевых клеток рака молочной железы в первичной культуре к противоопухолевым лекарственным средствам**

Технология включает следующие этапы:

- забор в стерильных условиях опухолевого материала, полученного операционным путем или в результате трепанобиопсии;
- получение первичной культуры клеток РМЖ;
- культивирование клеток РМЖ без и в присутствии противоопухолевых ЛС;
- определение активности ацетилхолинэстеразы (АХЭ) в клетках РМЖ, культивированных без и в присутствии ЛС;
- сравнительный анализ активности АХЭ в клетках РМЖ, культивированных без и в присутствии ЛС.

#### *Этап забора опухолевого материала*

После мастэктомии небольшой образец опухоли объемом до 0,25 см<sup>3</sup> иссекают и помещают в стерильные стеклянные флаконы объемом 10 мл, содержащие среду RPMI 1640 с добавлением гентамицина сульфата в концентрации 50 мкг/мл. Флаконы передают в соответствующую лабораторию для дальнейшего исследования.

Материал, полученный при трепанобиопсии опухоли, погружают на 100% в среду RPMI 1640 с добавлением гентамицина сульфата (50 мкг/мл), содержащуюся в стерильном стеклянном флаконе объемом 10 мл, и передают в лабораторию для дальнейшего исследования.

*Этап получения первичной культуры клеток РМЖ*

Образец ткани РМЖ, полученный операционным путем, очищают от кровеносных сосудов и жировой ткани, гомогенизируют в слабо притертом стеклянном гомогенизаторе в полной питательной среде, содержащей 10% эмбриональной телячьей сыворотки, 2 мМ L-глутамина и 50 мкг/мл гентамицина сульфата. Полученные гомогенаты фильтруют через капроновый фильтр и разливают в равных объемах (по 2 мл) в стерильные пенициллиновые флаконы, затем помещают в CO<sub>2</sub> инкубатор на 48–72 ч.

Опухолевый материал, полученный методом трепанобиопсии молочной железы с верифицированным диагнозом РМЖ, гомогенизируют в слабо притертом стеклянном гомогенизаторе в 1,2 мл питательной среды, содержащей 10% эмбриональной телячьей сыворотки, 2 мМ L-глутамина и 50 мкг/мл гентамицина сульфата. Полученные гомогенаты фильтруют через капроновый фильтр, разливают по 400 мкл в стерильные стеклянные флаконы объемом 10 мл и помещают в CO<sub>2</sub>-инкубатор на 48–72 ч.

*Этап культивирования клеток РМЖ без и в присутствии противоопухолевых ЛС*

В образцы первичной культуры РМЖ добавляют лекарственное средство или смесь лекарственных средств и помещают в CO<sub>2</sub>-инкубатор на 48–72 ч. Технология позволяет оценивать действие на опухолевые клетки отдельного ЛС или группы ЛС, которые предполагалось вводить пациентке при неoadъювантной полихимиотерапии. 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. Мы оценивали в условиях *in vitro* влияние трех групп лекарственных средств: СМФ (циклофосфан, метотрексат, фторурацил), АС (доксорубин, циклофосфан) и РА (паклитаксел, доксорубин).

*Схема СМФ in vitro (циклофосфан, метотрексат, фторурацил):*

Комбинация	Концентрация
СМФ	
Циклофосфан	240 мкг/мл
Метотрексат	16 мкг/мл
Фторурацил	240 мкг/мл

*Схема АС in vitro (доксорубин, циклофосфан):*

Комбинация	Концентрация
АС	
Доксорубин	20 мкг/мл
Циклофосфан	240 мкг/мл

Схема РА *in vitro* (паклитаксел, доксорубицин):

Комбинация	Концентрация
РА	
Паклитаксел	70 мкг/мл
Доксорубицин	20 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.

*Определение активности ацетилхолинэстеразы в клетках РМЖ, культивированных без ЛС и в их присутствии*

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 роста оптической плотности соответствует скорости гидролиза ацетилтиохолина, а следовательно, активности АХЭ. Активность АХЭ пересчитывают на количество клеток или концентрацию белка в суспензии. Концентрацию белка в суспензии можно определять любым стандартным методом, включая метод Лоури.

*Сравнительный анализ активности АХЭ в клетках РМЖ, культивированных без и в присутствии противоопухолевых ЛС*

Чувствительность или резистентность опухоли 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 ЛС или в присутствии таковых, пересчитывают по калибровочным кривым в нМ гидролизованного субстрата в 1 мин на количество белка в 1 мл клеточной суспензии [ $C_6$ ]. Так как измерение активности АХЭ проводится в одинаковом временном интервале для  $A_{к}$  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  $N_{ц} = \Delta D_{ц} / [C_6]$  и  $N_{к} = \Delta D_{к} / [C_6]$ , т. е. определять значение  $N_{к}$ , 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 их присутствии. При отношении  $N_{ц}/N_{к} < 1$  наблюдается положительный эффект влияния лекарственных средств на опухолевые

клетки и, чем ближе эта величина к нулю, тем более выражены эффекты. При  $N_{ц}/N_{к} \geq 1$  лекарственные средства в первичной культуре или не влияют на опухолевые клетки, или усиливают пролиферативную активность клеток.

Интерпретация результатов: сопоставление посттерапевтических изменений после неoadъювантной полихимиотерапии с изменением активности АХЭ опухолевых клеток в первичной культуре, культивируемых с этими лекарственными средствами, свидетельствует о высоком коэффициенте корреляции. Технология, основанная на определении активности АХЭ в первичной культуре при действии противоопухолевых ЛС, позволит оптимизировать выбор стратегии и тактики индивидуальной химиотерапии, исключая средства, к которым опухолевые клетки резистентны.

### **ПЕРЕЧЕНЬ ВОЗМОЖНЫХ ОСЛОЖНЕНИЙ ИЛИ ОШИБОК ПРИ ВЫПОЛНЕНИИ И ПУТИ ИХ УСТРАНЕНИЯ**

Стандартная погрешность используемых автоматических пипеток-дозаторов и измерительных приборов.