



УКРАЇНА

(19) UA (11) 50595 (13) A

(51) B 6 G 01 N 33 / 48, C 12 N 5 / 00

МІНІСТЕРСТВО ОСВІТИ
І НАУКИ УКРАЇНИДЕРЖАВНИЙ ДЕПАРТАМЕНТ
ІНТЕЛЕКТУАЛЬНОЇ
ВЛАСНОСТІОПИС
ДО ДЕКЛАРАЦІЙНОГО ПАТЕНТУ
НА ВИНАХІДВидається під
відповідальність
власника
патенту

(54) СПОСІБ ВИЗНАЧЕННЯ ПОКАЗАНЬ ДО ХІМІОТЕРАПІЇ РАКУ МОЛОЧНОЇ ЗАЛОЗИ

1

2

(21) 2002021682

(22) 28 02 2002

(24) 15 10 2002

(46) 15 10 2002, Бюл. № 10, 2002 р.

(72) Чешук Валерій Євгенович, Бережна Нінель Михайлівна, Ковальчук Олена Вікторівна, Козпенко Олександр Васильович

(73) НАЦІОНАЛЬНИЙ МЕДИЧНИЙ УНІВЕРСИТЕТ ІМ. О.О. БОГОМОЛЬЦЯ, ІНСТИТУТ ЕКСПЕРИМЕНТАЛЬНОЇ ПАТОЛОГІЇ, ОНКОЛОГІЇ І РАДІОБІОЛОГІЇ ІМ. Р.Є. КАВЕЦЬКОГО НАЦІОНАЛЬНОЇ АКАДЕМІЇ НАУК УКРАЇНИ

(57) Спосіб визначення показань до хіміотерапії раку молочної залози, що включає дослідження пухлини *in vitro*, який відрізняється тим, що післяопераційні експлантати з пухлини культивують у дифузійних камерах протягом 5 діб, поділяють на контрольний та досліджувані зразки, в останні додають циклофосфамід, доксорубіцин, флуороурацил в розрахунок 0,06 мг, 0,02 мг та 0,3 мг, відповідно, на 2 мл культурального середовища, відтворюють тримірний ріст пухлинних клітин, порівнюють результати і при стимуляції чи пригніченні росту клітин у досліджуваному матеріалі судять про показання до хіміотерапії

Винахід відноситься до медицини, а саме до онкології, і може бути використаний для визначення показань до хіміотерапії в комплексному лікуванні раку молочної залози (РМЗ).

Лікування раку молочної залози в основному передбачає комплексний підхід - застосування хірургічного лікування, опромінення, хіміотерапії та гормонотерапії. Хоча хірургія залишається дуже важливим етапом у лікуванні, проте постійно підвищується вклад у загальний успіх консервативних методів, зокрема хіміотерапії [1]. Застосування хіміотерапії обґрунтовано результатами рандомізованих досліджень, проведених у кінці 70-х років в Європі та США, які показали, що ад'ювантна хіміотерапія покращує прогноз у хворих до менопаузи при наявності метастазів у регіонарних лімфатичних вузлах [2,3]. Пізніше були представлені дослідження в яких обґрунтували правомочність застосування профілактичної хіміотерапії у хворих з пухлинами понад 1 см в діаметрі з негативними лімфовузлами, при оцінці інших прогностичних чинників (гістопатологічний тип і диференціація пухлини, експресія гормональних рецепторів, P53, her-2 new, та ін.) [4,5]. Але проблема хіміотерапевтичного лікування раку молочної залози полягає в розвитку резистентності до дії цитостатиків при тривалому лікуванні чи з самого початку лікування. Тому важливим питанням в призначенні хіміотерапевтичного лікування є прогнозування ефективно-

сті останнього. Дослідження Фішера, Бонадони та інших [6,7,8] про черговість застосування схеми ЦМФ та антрациклінових антибіотиків при ад'ювантному лікуванні РМЗ показала переваги першочергового використання схем які включають антрацикліни. Можливе пояснення кращого виживання після лікування антрацикліновими антибіотиками в тому, що доксорубіцин запобігає утворенню резистентних до ЦМФ клітин в пухлині. Ідея полягає в тому, що при виборі ад'ювантної хіміотерапії важливо зупинитись на оптимальній схемі з мінімальною можливістю розвитку резистентності і максимальним терапевтичним ефектом. Оцінка чутливості до дії цитостатиків пухлини та метастазів є актуальною при виборі конкретних схем хіміотерапії і взагалі при визначенні показань до хіміотерапевтичного лікування. Оскільки існують форми раку молочної залози в яких хіміотерапія є неефективною і більш ефективним є призначення променевої терапії чи гормонотерапії.

Відомі способи вибору схеми хіміотерапії на основі визначення прогностичних чинників в пухлині (гормональних рецепторів, маркерів апоптоза, проліферації та регуляції клітинного циклу) [9]. Вивчають значення моніторингу мікрометастазів в кістковому мозку при проведенні хіміотерапії [10]. Успіх ранньої післяопераційної хіміотерапії обґрунтовується гіпотезою Goldie-Goldman, яка пояснює необхідність ранньої дії на метастази враховуючи

(13) A

(11) 50595

(19) UA

можливість утворення хіміорезистентних мутантних клонів [11]. За прототип нами вибраний спосіб [12] визначення чутливості пухлини до хіміопрепаратів залежно від ступеня інактивації тіолів під дією цих препаратів в пухлині. При рості пухлини з виробленою резистентністю в організмі має місце зниження реакційної здатності тіолів не тільки тканини пухлини, але і в сироватці крові. Виявлена пряма залежність між мірою чутливості пухлини до протипухлинного препарату та ступенем інактивації тіолів під впливом цього препарату в тканині пухлини. На основі цих даних було розроблено метод визначення чутливості пухлин до протипухлинних препаратів в системі *in vitro* з використанням в якості тест-об'єкту не тільки тканини пухлини, але й сироватки крові.

До недоліків прототипу слід віднести неточність визначення чутливості до хіміотерапії раку молочної залози на основі непрямих даних реакційної активності тіолів в пухлині та сироватці крові. Спосіб дозволяє прогнозувати чутливість до обмеженої групи цитостатиків препаратів платини, алкілюючих сполук та антрациклінових антибіотиків.

Задачею заявленого винаходу є підвищення точності визначення показань до хіміотерапії раку молочної залози.

Технічний результат, який отримують в результаті вирішення задачі, полягає у правильному виборі складу схеми хіміотерапії, що сприяє покращанню результатів лікування хворих на рак молочної залози подовженню тривалості життя хворих та підвищенню безрецидивної виживаємості. Залежно від того чи буде стимуляція росту клітин пухлини, пригнічення його чи деструкція клітин індивідуально будуть призначені рекомендації до хіміотерапії. Спосіб дозволяє визначити хворих в яких існує резистентність до хіміотерапевтичного лікування і навпаки визначити хворих з тим чи іншим ступенем чутливості до хіміопрепаратів. Такий підхід дозволить утриматися від неправильного призначення лікування, в тих випадках де ефекту не буде і навпаки можливе прогресування захворювання при призначенні стандартних схем хіміотерапії.

Поставлену задачу досягають тим, що в відомому способі, який включає дослідження пухлини *in vitro*, відповідно до винаходу післяопераційні експлантати з пухлини культивують у дифузійних камерах протягом 5 діб, поділяють на контрольний та досліджувані зразки, в останні додають хіміопрепарати, відтворюють тримірний ріст пухлинних клітин, порівнюють результати і при стимуляції чи пригніченні росту клітин у досліджуваному матеріалі судять про показання до хіміотерапії.

Спосіб виконують таким чином. Під час операції у хворих на рак молочної залози (після секторальної резекції залози з пухлиною) беруть операційний матеріал кусочок пухлини, розміром 2 x 2 мм і поміщують його в культуральне середовище RPMI-1640. Матеріал транспортують до лабораторії протягом 1 - 3 годин, хоч можливо перебування кусочка пухлини в середовищі і холодильній камері до 1 доби. Операційний матеріал подрібнюють до шматочків 1 мм, їх розміщують на фільтри дифузійної камери, і поміщують в 24 лубочні план-

шети з культуральним середовищем RPMI-1640 з додаванням глютаміну та 20% ембріональної телячої сироватки терміном на 5 діб при +37°C і 5% вмісту CO₂. Через 5 діб фільтри дифузійної камери фіксують спирт-фармолом, забарвлюють гематоксилином за Карачі, просвітлюють в ксилолі та заключають в канадський бальзам [13]. За допомогою дифузійних камер відтворюють тривимірний ріст пухлинних клітин у короткострокових культурах. Через три доби культивування на поверхні міліпорних фільтрів формуються багаточисельні колонієподібні структури, орієнтовані по спіралі навколо центра (сфероїди). Виділяють контрольну культуру та досліджувані, в які додають окремо флуороурацил в дозі 15 мг/кг - в пропорційному перерахунку на 2 мл культурального середовища з експлантатом тобто 0,3 мг, доксорубіцин в дозі 1 мг/кг - в пропорційному перерахунку на 2 мл культурального середовища з експлантатом - 0,02 мг/кг, та циклофосфамід в дозі 3 мг/кг, в пропорційному перерахунку на 2 мл культурального середовища з експлантатом - 0,06 мг/кг. Дози були перераховані в пропорціях з клінічного використання в онкологічній практиці [14]. Окремо вирощують контрольну групу клітин для порівняння куди не додають хіміотерапевтичні препарати. Для диференційного визначення особливостей росту експлантатів пухлин, ізольованих пухлинних клітин та їх взаємодії з цитостатиками використовували 9-бальну систему морфологічної оцінки [13], яка давала можливість детально охарактеризувати ріст пухлинних клітин в дифузійних камерах і представити дані в графічному режимі. 1 Ріст відсутній 2 Невиразний ріст, міграція пухлинних клітин 3 Створення моношару початкові етапи 4 Поява моношару низької густини (опосередкований ріст) 5 Створення моношару середньої густини 6 Початкові етапи сфероїдоутворення конгломерати клітин 7 Сфероїдоутворення (1 - 2 сфероїди в полі зору) 8 Сфероїдоутворення (3 - 5 сфероїдів у полі зору) 9 Інтенсивне сфероїдоутворення (10 - 12 сфероїдів у полі зору).

Паралельно із другої частини пухлини після виконання основного об'єму операції вивчають гістологічну будову пухлин та вміст в них рецепторів гормонів та рецептора епідермального фактору росту.

Приклади конкретних виконань

Хвора Поліщук Л.К. 1953 року народження, № а/к-14679/01 4 10 2001р оперована з приводу раку лівої молочної залози 3 стадії, T₂ N₂ M₀, 2 клінічна група. Виконана паліативна квадрантектомія молочної залози. Хвора не давала згоду на мастектомію. Одночасно в стерильних умовах взяли кусочок пухлини розміром 2 x 2 мм і помістили його в культуральне середовище RPMI-1640. Матеріал транспортували до лабораторії, де проводили дослідження росту експлантатів пухлини в культуральному середовищі з додаванням туди хіміотерапевтичних препаратів (циклофосфамід, доксорубіцин, флуороурацил). В пухлинні імуністохімічно виявили рецептори до естрогену -ER-, прогестерону -PR-, рецептор епідермального фактору росту Her 2/new ++. Реакція експлантатів пухлини була наступною: контроль - 2 бали росту, в середовищі з циклофосфамідом 1 бал, з доксорубі-

біцином 1 бал і з флуороурацилом 1 бал. Як видно з експерименту - ріст пухлини пригнічують цитостатики.

Хвора Ононченко В.Ф. 1951 року народження, № а/к 13329/01. Була 5.09.2001 р. прооперована з приводу раку правої молочної залози 4 стадії T4N2M1 2 клінічної групи. Виконано санітарну ампутацію молочної залози. В пухлині імуногістохімічно виявили рецептори до естрогену -ER++, та прогестерону -PR+++, рецептор епідермального фактору росту Her 2/new +. Реакція експлантатів пухлини була наступною: контроль - 1 бал росту, в середовищі з циклофосфамідом 2 бали, з доксорубіцином 1 бал і з флуороурацилом теж 2 бали. Як видно з експерименту цитостатики не пригнічують росту пухлини, а навпаки стимулюють. В клінічній практиці таке явище називається резистентністю пухлини до хіміопрепаратів і в таких випадках при призначенні хімотерапевтичного лікування розвивається прогресування хвороби.

Результати. Проведено дослідження у 22 пацієнток у віці 28 - 72 років, при поширеності процесу T1-4, NO-2, MO-1. Передопераційне опромінення та хімотерапія не проводились для того, щоб не пригнітити ріст клітин пухлини в культуральному середовищі. Всім хворим проводили курси хімотерапії з врахуванням результатів дослідження чутливості до цитостатиків. Одна хвора померла від прогресування захворювання, якій хімотерапію не проводили. У всіх інших хворих спостерігається клінічна ремісія або відсутність ознак рецидиву захворювання.

Література

- 1 Шпарик Я.В., Билинський Б.Т. Ад'ювантна хімотерапія раку молочної залози. Львів, 1997 - 64с.
- 2 Bonadonna G, Brusamolino E, Valagussa P, et al //Combination chemotherapy as an adjuvant treatment in operable breast cancer. N Engl J Med. 1976; 294:405-410.
- 3 Fisher B, Carbone P, Economou SG, et al. L-phenylalanine mustard (L-PAM) in the management of primary breast cancer: a report of early findings. N Engl J Med. 1975; 292:117-122.
- 4 Early Breast cancer Trialists' Collaborative Group. Polychemotherapy for early breast cancer: An overview of the randomized trials. Lancet. 1998; -Vol. 352 - P 930-942.
- 5 Albain K, Green S, Ravdin P, et al. Overall survival after cyclophosphamide, adriamycin, 5-FU and tamoxifen (CAFT) is superior to T alone in postmenopausal, receptor(+) breast cancer: new findings from phase III Southwest Oncology Group Intergroup trial

S8814 (INT-0100) Program and abstracts of the 37th Annual Meeting of the American Society of Clinical Oncology, May 12-15, 2001, San Francisco, California. Abstract 94.

6 Fisher B, Brown A.M., Dimitrov N.V. et al. Two months of doxorubicin-cyclophosphamide with and without interval reinduction therapy compared with 6 months of cyclophosphamide, methotrexate and fluorouracil in positive-node breast cancer patients with tamoxifen-nonresponsive tumors. Results from the National Surgical Adjuvant Breast and Bowel Project B-15//J Clin Oncol-1990 -Vol. 8 -P 1483-1496.

7 Buzzoni R, Bonadonna G, Valagussa P. et al. Adjuvant chemotherapy with doxorubicin plus cyclophosphamide, methotrexate, and fluorouracil in the treatment of resectable breast cancer with more than three axillary lymph nodes//J Clin Oncol -1991 -Vol. 9 -P 2134-2140.

8 Bonadonna G, Zambetti M, Valagussa P. Sequential or alternating doxorubicin and CMF regimens in breast cancer with more than three positive nodes//JAMA -1995 -Vol. 273 -P 542-547.

9 Chang J, Powles T.J., Allred D.C. et al. Biologic Markers as Predictors of Clinical Outcome From Systemic Therapy for Primary Operable Breast Cancer. J Clin Oncol 1999; 17:3058-3063.

10 Braun S, Kantenich C, Janni W. et al. Lack of Effect of Adjuvant Chemotherapy on the Elimination of Single Dormant Tumor Cells in Bone Marrow of High-Risk Breast Cancer Patients // Clinical Oncology 2000, 18: 80-86.

11 Goldie G.H., Goldman A.J. A mathematical model for relating the drug sensitivity of the tumors to their spontaneous mutation rate. Cancer Treat Rep 1979; 63: 1727-33.

12 Кулик Г.И., Кравчук В.В., Соляник Г.И. Исследование уровня сульфгидрильных групп сыворотки крови, ткани опухоли и метастазов больных раком яичников III-IV стадий. Эксперим. онкология 1994, 16: 399-405.

13 Якимович Л.В., Бережная Н.М., Семенова-Кобзарь Р.А., Коноваленко В.Ф., Толстополюе Б.А. Использование метода диффузионных камер для выявления больных со злокачественными образованиями, подлежащих иммунотерапии рекомбинантным интерлейкином-2 // Информационное письмо - Киев -1988 -1 Ос.

14 Компендиум 1999/2000 - лекарственные препараты/ Под ред. В.Н. Коваленко, А.П. Викторова - К. Морион, 1999 -1200с.

ДП «Український інститут промислової власності» (Укрпатент)

вул. Сим'ї Хохлових, 15, м. Київ, 04119, Україна

(044) 456 - 20 - 90

ТОВ «Міжнародний науковий комітет»

вул. Артема, 77, м. Київ, 04050, Україна

(044) 216 - 32 - 71