



УКРАЇНА

(19) UA (11) 35162 (13) A

(51) 6 A61N5/00, A61B10/00

МІНІСТЕРСТВО ОСВІТИ
І НАУКИ УКРАЇНИДЕРЖАВНИЙ ДЕПАРТАМЕНТ
ІНТЕЛЕКТУАЛЬНОЇ
ВЛАСНОСТІ

ОПИС

ДО ДЕКЛАРАЦІЙНОГО ПАТЕНТУ
НА ВИНАХІДвидається під
відповідальність
власника
патенту

(54) СПОСІБ ОДЕРЖАННЯ РАДІОРЕЗИСТЕНТНОГО ШТАМУ КАРЦИНОМИ ГЕРЕНА

(21) 99084801

(22) 25.08.1999

(24) 15.03.2001

(46) 15.03.2001, Бюл. № 2, 2001 р.

(72) Зінченко Валентина Андріївна

(73) УКРАЇНСЬКИЙ НАУКОВО-ДОСЛІДНИЙ ІНСТИ-
ТУТ ОНКОЛОГІЇ ТА РАДІОЛОГІЇ МІНІСТЕРСТВА
ОХОРОНИ ЗДОРОВ'Я УКРАЇНИ

(57) Спосіб одержання радіорезистентного штаму карциноми Герена, що полягає в багаторазовому послідовному рентгенівському опроміненні та ретрансплантації відновлених після опромінення пухлинних клітин, який відрізняється тим, що опромінення проводять *in vivo* і завдяки селективному відбору протягом 15–20 генерацій найбільш стійких до іонізуючої радіації клітин, карцинома Герена стає радіорезистентною.

Заявка належить до медицини та біології, а саме до радіобіології і може використовуватися в експериментальній онкології та променевої терапії.

Вперше карциному Герена одержали у 1934 році Маріс і Поль Герени [8], шляхом перещеплення аденокарциноми матки, яка спонтанно виникла у білого нелінійного щура. Карцинома Герена потрапила до Радянського Союзу у 1954 році і з тих пір пройшла велику кількість генерацій, широко застосовується у різних експериментальних онкологічних дослідженнях. Основні характеристики кінетики росту карциноми та морфологічні зміни при її розвитку загальновідомі і стабільні.

Відомі засоби створення хіміорезистентних штамів. Вже в 60-ті роки в СРСР проводили дослідження; присвячені виникненню резистентності експериментальних пухлин до хіміопрепаратів. Активно ведеться вивчення механізмів лікарської резистентності пухлин на Україні [2]. Численні дослідження в цьому напрямі здійснені в останні роки [4, 7]. Являє науковий інтерес і практичне значення аналіз зміни параметрів росту карциноми Герена при виникненні резистентності до дії цисплатину і тіофосфаміду [3]. Найбільш виражений інтерес вчених до множинної лікарської резистентності, яка виникає під впливом одного якого-небудь препарату, але спричиняє резистентність до дії різних хіміотерапевтичних агентів; спостерігається перехресна резистентність відразу до декількох груп протипухлинних препаратів. Доведено, що лікарська резистентність в процесі лікування виникає і в його динаміці посилюється внаслідок селекції і накопичення найбільш стійких пухлинних клітин з множинною мультиплікацією гена множинної лікарської резистентності [4, 5].

В деяких випадках вчені формували і досліджували теж карциному Герена, але таку, яка набувала резистентність до хімічних сполук, а не до радіації і це сприяло вирішенню проблем хіміотерапії, а не променевої терапії. На відміну від широкого вивчення хіміорезистентності, радіорезистентністю майже не займаються. Методичний підхід до формування в наших експериментах радіорезистентності співпадає з аналогічним процесом набуття хіміорезистентності [3].

За прототип нами взяті дослідження вчених з Киргизстану [Балмуханов С.Б., Ефимов М.Л. Радіочувствительность опухолей в эксперименте. – Алма-Ата: Наука, 1971 – 172 с.], які досягли певних успіхів у вивченні радіорезистентності пухлин в експерименті. За допомогою біохімічних методів вони вивчали радіорезистентність, але інших пухлинних штамів: лімфосаркоми Плісса щурів та асцитної карциноми Ерліха мишей. Вони також використовували багаторазові чергування процесів опромінення і ретрансплантації пухлинного матеріалу, але методичний підхід до формування радіорезистентності в наших та їхніх експериментах не співпадає.

Суттєвим недоліком їх досліджень було те, що вони проводили опромінення пухлинних клітин, які виплучали з тварини-донора, в пробірці (*in vitro*), а потім перещеплювали тваринам-реципієнтам. В наших експериментах опромінювали пухлину, яка знаходилася під шкірою заднього стегна (*in vivo*), екрануючи свинцем тулуб щура, що є максимально наближеним до умов клініки.

В основу винаходу покладена задача створення радіорезистентного (РР) штаму карциноми Герена, шляхом ретрансплантації (селекції) радіо-

(19) UA (11) 35162 (13) A

резистентних клітин які збереглися після їх опромінення що дає можливість забезпечити підвищення ефективності променевої терапії, завдяки отриманню моделі пухлини з певними (штучно закладеними) властивостями

« Поставлена задача виконується слідуючим чином

Досліди по формуванню селективної РР пухлин проводили на нелінійних щурів-самців масою 110 ± 10 г розведення віварію УНДІОР МОЗ України На першому етапі досліджень тваринам перещеплювали під шкіру стегна 20% ну суспензію клітин карциноми Герена Після цього щурів ділили на дві групи (на всіх етапах дослідження у кожній з них було не менше 10 тварин) піддослідну і контрольну пухлини яких не підпадали під опромінення Пухлини щурів піддослідної групи після досягнення діаметру 19.0 ± 0.6 мм на 9 добу від перещеПЛення піддавали локальному рентгенівському опроміненню в сумарній терапевтичній дозі 50 Гр (5 фракції по 10 Гр) на установці РУМ-17 при наступних (завжди стандартних) технічних умовах 180 кВ 10 мА фільтри 0.5 мм Cu + 1.0 мм Al шкірно-фокусна відстань – 25 см потужність дози – 1,25 Гр/хв Тіло щура екранували свинцем товщиною в 3 мм Щурів контрольної групи не піддавали ніяким впливам

Тварин з рецидивами що виникли після закінчення опромінення, забивали декапітацією під легким ефірним наркозом Пухлини після вилучення використовували для виготовлення 20% суспензії пухлинних клітин яку на другому етапі перещеплювали новим групам тварин контрольній (без опромінення) та піддослідній яку опромінювали за схемою описаною вище

Третій етап досліджень повністю відтворював другий на четвертому також для виготовлення 20% суспензії клітин використовували пухлини вилучені з тварин контрольної групи третього етапу на 20 добу після ретрансплантації Ці клітини перещеплювали тваринам контрольної та дослідної (опроміненої) груп і, таким чином і надалі підтримували процес набуття РР у наступних генераціях Таким чином було проведено 20 етапів ретрансплантації та опромінення рецидивів карциноми Герена

Отриманий оригінальним методом РР варіант карциноми Герена відрізняється від класичного (дикого) штаму особливостями росту морфології і метаболізму Деякі характеристики кінетики росту карциноми та її морфологічні параметри в РР варіанті виявилися зміненими що доведено за допомогою математичних морфологічних та біохімічних методів

В карциномі Герена виявлена присутність не менше двох субпопуляцій клітин що істотно розрізняються за характеристиками росту і радіочутливості РР пухлини формується в процесі зміни їх співвідношення – монотонного зменшення питомої ваги чутливої до опромінення субпопуляції і збільшення резистентної Це узгоджується з положеннями клонально-селективної теорії резистентності

На етапах вироблення РР, істотно зростає внутрішньопулярційна гетерогенність пухлинних клітин і мінливість між генераціями РР пухлин Вироблення РР є наслідок двох найтіснішим чином взаємопов'язаних процесів – селективного відбору

найбільш РР частини клітинної популяції і формування нових ознак в ході адаптивно-приспосувальних реакцій зумовлених радіаційним клітинним стресом У ході цього процесу закономірно наростає поліморфізм клітин їх ядер мембранних структур, нарівні з нежиттєздатними і непроліферуючими клітинами утворюються адаптивні форми, що мають високу РР

Одержана модель дозволяє підвищити вірогідність результатів експериментальних досліджень завдяки можливості випробовувати дію більш потужних впливів

Внаслідок створення нового штаму соматичних клітин хребетної тварини який за біологічними ознаками відрізняється від існуючого більш високою стійкістю до іонізуючої радіації, одержана можливість наблизитися до умов променевої терапії, які використовуються в онкологічній клініці

Приклад конкретного виконання

В дослід по формуванню селективної РР пухлин було взято 20 нелінійних щурів-самців масою 110 ± 10 г розведення віварію УНДІОР МОЗ України Тваринам перещеплювали під шкіру стегна 20%-ну суспензію клітин карциноми Герена Після цього щурів ділили на дві групи контрольну і дослідну Пухлини щурів піддослідної групи після досягнення діаметру 19.0 ± 0.6 мм на 9 добу від перещеПЛення піддавали in vivo локальному фракціонованому рентгенівському опроміненню в сумарній терапевтичній дозі 50 Гр (5 фракцій по 10 Гр) на установці РУМ-17 при наступних технічних умовах 180 кВ, 10 мА фільтри 0.5 мм Cu + 1.0 мм Al шкірно-фокусна відстань – 25 см, потужність дози – 1.25 Гр/хв Тіло щурів екранували свинцем, товщиною в 3 мм Щурів контрольної групи не піддавали ніяким впливам

Тварин з рецидивами що виникли після закінчення опромінення забивали декапітацією під легким ефірним наркозом Пухлини після вилучення використовували для виготовлення 20% суспензії пухлинних клітин яку на другому етапі перещеплювали новим групам тварин контрольній та піддослідній яку опромінювали за схемою описаною вище Пухлинний матеріал, який залишався, піддавали морфологічному та біохімічному аналізу

На третьому етапі досліджень тварин з рецидивами що виникали після закінчення опромінення забивали декапітацією під легким ефірним наркозом Пухлини після вилучення використовували для виготовлення 20% суспензії пухлинних клітин яку на цьому етапі перещеплювали новим групам тварин контрольній та піддослідній яку опромінювали за схемою описаною вище Пухлинний матеріал який залишався, піддавали морфологічному та біохімічному аналізу

На четвертому етапі для виготовлення 20% суспензії клітин використовували пухлини, вилучені з тварин третього етапу на 20 добу після ретрансплантації Ці клітини перещеплювали тваринам контрольної та піддослідної груп, яку опромінювали за схемою описаною вище Пухлинний матеріал, який залишався, піддавали морфологічному та біохімічному аналізу

На п'ятому етапі для виготовлення 20% суспензії клітин використовували пухлини, вилучені з тварин четвертого етапу на 20 добу після рет-

рансплантації. Ці клітини перещеплювали тваринам контрольної та піддослідної груп, яку опромінювали за схемою, описаною вище. Пухлинний матеріал, який залишався, піддавали морфологічному та біохімічному аналізу.

На п'ятому етапі для виготовлення 20% суспензії клітин використовували пухлини, випущені з тварин четвертого етапу на 20 добу після ретрансплантації. Ці клітини перещеплювали тваринам контрольної та дослідної груп, яку опромінювали за схемою, описаною вище. Пухлинний матеріал, який залишався, піддавали морфологічному та біохімічному аналізу.

Таким же чином надалі підтримували процес набуття РР у наступних генераціях: 6–20. Було проведено 20 етапів ретрансплантації та опромінення рецидивів карциноми Герена.

Дослідження механізмів формування набуттої резистентності можливі й інформативні лише в умовах створення адекватної експериментальної моделі набуття РР, близької до реальних умов променевої терапії хворих на злоякісні новоутворення. Така експериментальна модель була нами створена і опробована. Процес формування набуттої РР супроводжується певними морфологічними, біохімічними та цитокінетичними змінами, появою певних маркерів РР. Їх виявлення має значне теоретичне і особливо практичне значення.

Джерела інформації:

1. Балмуханов С.Б., Ефимов М.Л. Радиочувствительность опухолей в эксперименте – Алма-Ата: Наука, 1971. – 172 с (прототип)

2. Кулик Г.И. К механизму лекарственной устойчивости опухоли // *Вопр. онкологии* – 1969. – Т. 15, № 11. – С. 60–64.

3. Соляник Г.И., Коненко М.М., Чехун В.Ф., Кулик Г.И. Изменение роста карциномы Герена при возникновении резистентности к действию цисплатина и тиофосфамида // *Эксперим. онкология* – 1992. – Т. 14, № 5. – С. 68–72.

4. Стасык Т.В., Антонюк В.А., Якимович М.Я. с соавт. Сравнительное исследование гликозильных детерминант клеточной поверхности чувствительных и резистентных к цисплатине клеток мышиной лейкемии L 1210 // *Эксперим. онкология*. – 1998. – Т. 20, № 3–4. – С. 204–209.

5. Титов К.В., Стоф И.Ю., Князев П.Г. Молекулярные аспекты феномена множественной лекарственной устойчивости опухолевых клеток // *Эксперим. онкология*. – 1994. – Т. 16, № 4. – С. 241–251.

6. Райхлин Н.Т., Смирнова Е.А., Перевощиков А.Г. Апоптоз и его роль в механизмах регуляции роста опухолевых клеток с множественной лекарственной устойчивостью // *Архив патологии* – 1996. – Т. 58, № 2. – С. 3–8.

7. Шишова Ю.В., Чехун В.Ф. Механизмы резистентности опухолей к цисплатину // *Эксперим. онкология* – 1998. – Т. 20, № 1. – С. 3–14.

8. Guérin M., Guérin P. Epithelioma de l'uterus du rat lymphatrophe et transplantable. *Bull. Ass. Franc. Pour Etude Cancer*. – 1934. – V. 23, № 8. – P. 632–646.

Тираж 50 екз.

Відкрите акціонерне товариство «Патент»

Україна, 88000, м. Ужгород, вул. Гагаріна, 101

(03122) 3 – 72 – 89 (03122) 2 – 57 – 03

