



УКРАЇНА

(19) UA

(11) 76922

(13) C2

(51) МПК (2006)

G01N 33/49

A61B 10/00

МІНІСТЕРСТВО ОСВІТИ
І НАУКИ УКРАЇНИДЕРЖАВНИЙ ДЕПАРТАМЕНТ
ІНТЕЛЕКТУАЛЬНОЇ
ВЛАСНОСТІОПИС
ДО ПАТЕНТУ НА ВИНАХІД

(54) СПОСІБ ВИЯВЛЕННЯ ЧУТЛИВОСТІ ЗЛОЯКІСНИХ ПУХЛИН ДО ДІЇ ЦИСПЛАТИНУ

1

(21) a200505274

(22) 02.06.2005

(24) 15.09.2006

(46) 15.09.2006, Бюл. №9, 2006р.

(72) Чехун Василь Федорович, Ковтонюк Оксана
Володимирівна, Тодор Ігор Миколаєвич, Кулик
Галина Іванівна(73) ІНСТИТУТ ЕКСПЕРИМЕНТАЛЬНОЇ ПАТОЛО-
ГІЇ, ОНКОЛОГІЇ І РАДІОБІОЛОГІЇ ІМ. Р.Є. КАВЕЦЬ-
КОГО НАН УКРАЇНИ(56) Osmak M, Vrhovec I, Skrk J. Cisplatin resistant
glioblastoma cells may have increased concentration

2

of urokinase plasminogen activator and plasminogen
activator inhibitor type 1. J Neurooncol 1999; 42(2):95
-102.(57) Спосіб виявлення чутливості злоякісних пух-
лин до дії цисплатину шляхом визначення протео-
літичної активності, який **відрізняється** тим, що в
плазмі крові визначають сумарну активність сери-
нових протеїназ і у міру її підвищення судять про
зниження чутливості злоякісних пухлин до дії цис-
платину.

Винахід відноситься до медицини, а саме, до онкології, і може використовуватись для визначення ступеня резистентності пухлини до дії цисплатину та прогнозу інтенсивності метастазування пухлин з різною чутливістю до протипухлинного препарату.

Центральна проблема і мета експериментальної і клінічної онкології - підвищення ефективності лікування онкологічних хворих. В основі боротьби з пухлинною прогресією лежить підвищення чутливості злоякісних клітин до дії протипухлинних препаратів.

Відомо, що цисплатин відноситься до числа найбільш ефективних протипухлинних засобів. Даний цитостатик характеризується широким спектром протипухлинної активності і широко використовується в клінічній практиці як при монотерапії, так і в комбінації з іншими терапевтичними засобами [1-3]. Однак, не зважаючи на досягнення у лікуванні онкологічних хворих, ефективність цисплатину при терапії злоякісних новоутворень обмежується природною або набутою резистентністю пухлинних клітин до дії препарату [4]. Тому дуже важливим і необхідним з клінічної точки зору є виявлення чутливості пухлини до дії протипухлинного препарату. Такий підхід дає можливість прогнозувати успішність проведення хіміотерапії, а отже і ефективність лікування.

Відомо, що протеолітичні ферменти характеризуються багаточисельними біологічними ефек-

тами і відіграють суттєву роль в процесах пухлинної прогресії, в тому числі і при формуванні лікарської резистентності [5]. Дослідження, проведені in vitro, свідчать про зміну рівня протеолітичних ферментів різних класів в резистентних варіантах клітинних ліній пухлин [6-8].

Відомо, що одним з важливих факторів, який сприяє виживанню злоякісної клітини після цитостатичного впливу, є втрата нею здатності вступати в індукований хіміотерапевтичним агентом апоптоз [9], тобто спрацьовує один з механізмів лікарської резистентності. Крім того, встановлено участь серинових протеїназ в блокуванні апоптозу, викликаного дією хіміопрепарату [5].

Однак, дослідження протеолітичних ферментів при розвитку лікарської резистентності проводяться, головним чином, in vitro, в умовах не наближених до середовища живого організму, і, зокрема пухлинного мікрооточення. Крім того, недоліком відомих методів є їх дороговизна та складність виконання, що в свою чергу виключає можливість їх широкого використання в клінічних закладах. Суттєвим недоліком є також відсутність при вивченні компонентів системи протеолізу використання їх як прогностичного фактора, як маркера, асоційованого з резистентністю до конкретного протипухлинного препарату. Визначення вмісту конкретної серинової протеїнази, яке практикується, можна вважати як перевагою, а саме наявність інформації про експресію, активність конкретного

(13) C2

(11) 76922

(19) UA

білка, так і неоліком, адже зменшується інформативність про стан протеолізу в цілому.

Найблизьчим аналогом до способу, що заявляється, є метод визначення концентрації окремих серинових протеїназ в резистентних до цисплатину злоякісних клітинах, цей аналог ми беремо за прототип [6]. Дослідження рівня двох серинових протеїназ - активатора плазміногену урокіназного типу (uPA) та інгібітора активатора плазміногену 1 типу (PAI-1) проводили в культурі клітин гліобластоми людини з використанням імуноферментного методу (enzyme linked immunoabsorbent assay, ELISA) з застосуванням моноклональних антитіл. Було встановлене зростання концентрації даних серинових протеїназ в клітинах резистентного до цитостатику варіанту у порівнянні з чутливими клітинами.

Але описаний спосіб є досить дорогим, оскільки потребує наявності відповідних антитіл, за допомогою яких визначають вміст окремих ферментів. Однак даний метод дозволяє визначати лише вміст ферментів, не даючи інформації про їх функціональну активність. Крім того, цей спосіб вимагає вміння роботи з культуральним середовищем і відповідно додаткового обладнання.

В основу винаходу, що заявляється, поставлено задачу удосконалення способу виявлення чутливості злоякісних пухлин до протипухлинних препаратів шляхом визначення сумарного протеолітичного потенціалу для забезпечення більшої інформативності.

Поставлена задача вирішується завдяки визначенню сумарної протеолітичної активності, як найбільш інформативного показника стану системи протеолізу, в плазмі крові.

Суть винаходу полягає в тому, що визначення величини сумарної активності протеолітичних ферментів в плазмі крові свідчить про чутливість злоякісної пухлини до дії цисплатину, а саме по мірі підвищення протеолітичної активності, ступінь чутливості пухлини до дії цисплатину знижується.

Удосконалення відомого способу вирішується за рахунок використання найбільш інформативного показника активності протеолітичної системи. Даний спосіб дозволяє виявляти ступінь лікарської резистентності, використовуючи плазму крові хворих. Оскільки в основі запропонованого способу виявлення чутливості лежить визначення сумарної протеолітичної активності в умовах *in vivo*, то це свідчить про більшу його об'єктивність.

Спосіб, що заявляється, є високоінформативним, оскільки визначаючи сумарну активність протеїназ в плазмі крові, можна прогнозувати не лише ступінь чутливості пухлини до цисплатину, а й інтенсивність її метастазування, адже система протеолізу відіграє важливу роль в процесах інвазії пухлин та їх метастазування [10]. Суть способу, що заявляється, пояснюють приклади конкретного виконання:

Приклад 1

Сумарну протеолітичну активність визначали в плазмі крові двох груп експериментальних тварин. Ці групи включали мишей з пухлиною, яка відрізнялася за ступенем чутливості до цитостатику. Паралельно досліджували інтенсивність метастазування пухлини. Тому для системного вивчення протеолітичної активності і метастатичного потенціалу пухлини було обрано модель солідної форми карциноми легені Льюїс (3LL). Саме ця модель пухлинного росту є класичною моделлю вивчення метастазування і вважається наближеною до клінічних форм. У кожній експериментальній групі було по 10 мишей-самців лінії C57B1/6 (2-2,5-місячного віку з масою 18-20г). Тваринам прищеплювали внутрішньом'язево по $1,5 \times 10^6$ живих клітин карциноми Льюїс в 0,02мл середовища 199. Об'єктом дослідження була кров, яку стабілізували 3,8%-ним розчином цитрата натрію (Merck, Німеччина) в співвідношенні 9:1 і центрифугували при 1500об/хв протягом 10хв при $t=4^\circ\text{C}$. Визначення сумарної протеолітичної активності (ПРА) в плазмі крові проводили спектрофотометричним методом, розробленим К.М. Веремєєнко [11]. В основі методу лежить визначення аргінінвмісних пептидів, які відщеплюються від лужного білка протамінсульфату протеолітичними ферментами плазми крові. За допомогою цього метода вивчається ендогенна протеолітична активність плазми, яку проявляють протеїнази з трипсинподібною активністю і ферменти пептидазної дії. Активність нейтральних серинових протеїназ виражали в мкмоль аргініна/хв мл плазми. Результати, представлені в таблицях, подані у вигляді процентного співвідношення по відношенню до контролю, який приймали за 100%. Контролем слугувала плазма крові інтактних тварин.

Цей метод вперше використали при дослідженні біохімічних особливостей перебігу лікарської резистентності. Він є досить інформативним, оскільки визначення сумарної протеолітичної активності в плазмі крові онкологічних хворих свідчить про активність процесів протеолізу в цілому, і тим самим може давати прогноз як інтенсивності метастазування, так і ступеня чутливості пухлини до дії протипухлинного препарату.

Висновок про наявність лікарської резистентності робили за показниками гальмування росту пухлини після проведення хімотерапії, показниками кінетики росту пухлини, за рівнем реакційноздатних сульфгідрильних груп у пухлинах та сироватці крові, за кількістю одониткових розривів ДНК у пухлинах та за даними ультраструктурних досліджень пухлин. Ступінь метастатичного ураження оцінювали за такими показниками, як середня кількість легеневих метастазів на тварину та середній об'єм метастатичного ураження легень на тварину (Таблиця 1).

Таблиця 1

Протипухлинний і антиметастатичний ефект цисплатину по відношенню до чутливої та резистентної карциноми 3LL

Тип пухлини	Група тварин	Об'єм первинної пухлини (см ³)	Процент(%) гальмування росту пухлини	Середня кількість метастазів на тварину	Процент(%) зменшення кількості легеневих метастазів
Чутлива до цисплатину 3LL	контроль цисплатин	1,4±0,03 0,4±0,03	- 46	20,6±1,6 8,6±0,9	- 58
Резистентна до цисплатину 3LL	контроль цисплатин	1,4±0,05 1,3±0,06	- 3	29,8±1,6* 26,4±2,2	- 11

Знаком * позначені вірогідні відмінності ($p < 0,05$) у порівнянні з чутливою пухлиною.

В Таблиці 2 представлені дані по дослідженню сумарної активності серинових протеїназ в плазмі крові мишей в динаміці росту карциноми 3LL, чутливою та резистентною до цисплатину. Як видно з представлених даних, при дослідженні ПРА у тварин з пухлиною, чутливою до цисплатину, на всіх стадіях росту пухлини, відмічається зниження ак-

тивності протеїназ плазми крові у порівнянні з плазмою інтактних тварин. У тварин з пухлиною, резистентною до цисплатину, навпаки, на всіх стадіях росту пухлини, відмічається суттєве підвищення активності протеїназ плазми крові у порівнянні з плазмою інтактних тварин.

Таблиця 2

Сумарна активність серинових протеїназ (ПРА) в плазмі крові при розвитку карциноми 3LL з різною чутливістю до цисплатину

Тип пухлини	Показники	Стадії росту пухлини	
		стадія експоненційного росту	термінальна стадія
Чутлива до цисплатину 3LL	ПРА, %	67,8±5	53±5,7
	Об'єм первинної пухлини, мм ³	0,33±0,06	1,52±0,15
	Середня кількість метастазів	7,0±0,9	20,6±1,6
Резистентна до цисплатину 3LL	ПРА, %	221±25,2*	219±42,5*
	Об'єм первинної пухлини, мм	0,34±0,07	1,5±0,17
	Середня кількість метастазів	9,9±0,8*	29,8±1,6*

Знаком * позначені вірогідні відмінності ($p < 0,05$) у порівнянні з чутливою пухлиною.

Приклад 2

Дослідження були проведені на статевозрілих щурах масою 120-160г. лінії Wistar розведення експериментальної бази ІЕПОР ім.Р.Є.Кавецького НАНУ, котрим перещеплювали під шкіру ($2,5 \times 10^6$ клітин/ тварину) вихідну або резистентну до цисплатину солідну карциному Герена. Вироблення резистентності карциноми Герена до цисп-

латину проводили шляхом послідовних перещеплень клітин пухлини, яку отримували від щурів, котрим було проведено курс терапії цисплатином (сумарна доза 7,5 мг/кг). В Таблиці 3 наведені дані по протипухлинному і антиметастатичному ефекту цисплатину при розвитку резистентної карциноми Герена до препарату.

Таблиця 3

Протипухлинний і антиметастатичний ефект цисплатину по відношенню до чутливої та резистентної карциноми Герена

Тип пухлини	Група тварин	Об'єм первинної пухлини, (см ³)	Процент(%) гальмування росту пухлини
Чутлива до цисплатину карцинома Герена	контроль цисплатин	7,6±0,8 0,4±0,1	- 95
Резистентна до цисплатину карцинома Герена	контроль цисплатин	7,8±0,8 7,5±0,8	- 4

З даних Таблиці 4 видно, що аналогічні зміни ми спостерігали і при розвитку карциноми Герена,

резистентної до цисплатину, на початковій стадії росту пухлини відмічалось зниження активності

протеїназ плазми крові у порівнянні з плазмою інтактних тварин. Всі інші періоди дослідження

росту пухлини також супроводжувалися підвищенням ПРА.

Таблиця 4

Сумарна активність серинових протеїназ (ПРА) в плазмі крові при розвитку карциноми Герена з різною чутливістю до цисплатину

Тип пухлини	Показники	Стадії росту пухлини	
		стадія експоненційного росту	термінальна стадія
Чутлива до цисплатину 3LL	ПРА, %	70,8±1,9	77,3±2,6
	Об'єм первинної пухлини, см ³	3,5±0,5	11,0±0,9
Резистентна до цисплатину 3LL	ПРА, %	167,3±14,3*	162,9±21,6*
	Об'єм первинної пухлини, см ³	7,4±0,9	13,0±1,3

Знаком *позначені вірогідні відмінності ($p < 0,05$) у порівнянні з чутливою пухлиною.

Отже, експоненційна та термінальна стадії росту пухлини (саме ці стадії відповідають періодам обстеження хворих в клініці) характеризуються значно вищою активністю серинових протеїназ в плазмі крові тварин з резистентним до цисплатину варіантом. Причому це спостерігається при рості як метастазуючої карциноми 3LL, так і неметастазуючої карциноми Герена, які мають фенотип лікарської резистентності.

Таким чином, наведені приклади вказують на те, що підвищення сумарної активності серинових протеїназ в плазмі крові супроводжується зниженням чутливості злоякісних пухлин до дії цисплатину і, навпаки, низький рівень протеолітичної активності відмічається при рості пухлин, чутливих до дії протипухлинного препарату.

Література

1. Adamo V, Ferraro G, Pergolizzi S, Sergi C, Laudani A, Settineri N, Alafaci E, Scimone A, Spano F, Spitaleri G. Paclitaxel and cisplatin in patients with recurrent and metastatic head and neck squamous cell carcinoma. *Oral Oncol.* 2004; 40(5): 525-31.
2. Decatris MP, Sundar S, O'Byrne KJ. Platinum-based chemotherapy in metastatic breast cancer: current status. *Cancer Treat Rev.* 2004; 30(1): 53-81.
3. Arriagada R, Bergman B, Dunant A, Le Chevalier T, Pignon JP, Vansteenkiste J. Cisplatin-based adjuvant chemotherapy in patients with completely resected non-small-cell lung cancer. *N Engl J Med.* 2004 22; 350(4): 351-60.
4. Longley DB, Johnston PG. Molecular mechanisms of drug resistance. *J Pathol.* 2005; 205(2):275-92.

5. Wu CH, Gordon J, Rastegar M, Ogretmen B, Safa AR. Proteinase-3, a serine protease which mediates doxorubicin-induced apoptosis in the HL-60 leukemia cell line, is downregulated in its doxorubicin-resistant variant. *Oncogene.* 2002 Aug 1;21(33):5160-74.

6. Osmak M, Vrhovec I, Skrk J. Cisplatin resistant glioblastoma cells may have increased concentration of urokinase plasminogen activator and plasminogen activator inhibitor type. *J Neurooncol.* 1999; 42(2):95-102.

7. Osmak M, Svetic B, Gabrijelcic-Geiger D, Skrk J. Drug-resistant human laryngeal carcinoma cells have increased levels of cathepsin B. *Anticancer Res.* 2001 ;21(1A):481-3.

8. Ditt Faute MA, Laurent L, Ploton D, Poupon MF, Jardillier JC, Bobichon H. Distinctive alterations of invasiveness, drug resistance and cell-cell organization in 3D-cultures of MCF-7, a human breast cancer cell line, and its multidrug resistant variant. *Clin Exp Metastasis.* 2002; 19(2): 161-8.

9. Park SJ, Wu CH, Safa AR. A P-glycoprotein- and MRP 1-independent doxorubicin-resistant variant of the MCF-7 breast cancer cell line with defects in caspase-6, -7, -8, -9 and -10 activation pathways. *Anticancer Res.* 2004;24(1): 123-31.

10. Del Rosso M, Fibbi G, Pucci M, D'Alessio S, Del Rosso A, Magnelli L, Chiarugi V. Multiple pathways of cell invasion are regulated by multiple families of serine proteases. *Clin Exp Metastasis* 2002; 19(3): 193-7

- 11 .Веремеєнко К.Н., Голобородько О.П., Кизим А.И. Протеолиз в норме и при патологии. -К.: Здоровья, 1988.-с.198.