



УКРАЇНА

(19) **UA** (11) **104343** (13) **C2**
(51) МПК (2013.01)
G01N 33/48 (2006.01)
G01N 21/00
A61B 5/00

ДЕРЖАВНА СЛУЖБА
ІНТЕЛЕКТУАЛЬНОЇ
ВЛАСНОСТІ
УКРАЇНИ

(12) ОПИС ДО ПАТЕНТУ НА ВИНАХІД

(21) Номер заявки: **а 2012 06626**
(22) Дата подання заявки: **31.05.2012**
(24) Дата, з якої є чинними права на винахід: **27.01.2014**
(41) Публікація відомостей про заяву: **25.11.2013, Бюл.№ 22**
(46) Публікація відомостей про видачу патенту: **27.01.2014, Бюл.№ 2**
(72) Винахідник(и):
Шляховенко Володимир Олексійович (UA), Орловський Олексій Аркадійович (UA)
(73) Власник(и):
ІНСТИТУТ ЕКСПЕРИМЕНТАЛЬНОЇ ПАТОЛОГІЇ, ОНКОЛОГІЇ І РАДІОБІОЛОГІЇ ІМ. Р.Є. КАВЕЦЬКОГО НАН УКРАЇНИ,
вул. Васильківська, 45, м. Київ, 03022 (UA)
(56) Перелік документів, взятих до уваги експертизою:
Доклінічні дослідження лікарських засобів. Методичні рекомендації / О.В. Стефанов, ред. - Київ: "Авіценна", 2001. - С. 361-370.
Орловський О.А., Залеток С.П., Лялюшко Н.М. та ін. Прояви закону Введенського в цитотоксичній дії протипухлинних препаратів, поліамінів та модуляторів їх метаболізму щодо клітин експериментальних пухлин // Актуальные проблемы медицины и биологии. - 2004.-№1. - С. 339-356.
Передерни В.Г., Земсков А.М., Бычкова Н.Г., Земсков В.М. Иммунный статус, принципы его оценки и коррекции иммунных нарушений. - Киев, 1995. - С. 61-62.
Ohno ?, Abe T. Rapid colorimetric assay for the quantification of leukemia inhibitory factor (LIF) and interleukin-6 // J. Immunol. - 1991. - N145. - P. 199-203.
Галахин К.А., Курик Е.Г. Лечебный патоморфоз злокачественных опухолей пищеварительного тракта. - Киев: "Книга плюс", 2000. - 176 с.

(56) Гуськова Т.А., Елисеева З.М., Чувильская Л.М., Трещалина Е.М. Оценка безопасности препаратов сопровождения химиотерапии онкологических больных: Тез. [6 Всероссийская научно-практическая конференция "Отечественные противоопухолевые препараты", Москва, 24-26 марта, 2007]. Рос. биотерапевт. ж.. 2007. 6, N 1, с. 32.
UA 50595 A, 15.10.2002.
RU 2220418 C2, 27.12.2003.
RU 2001117352 A, 20.04.2003.
RU 2004108137 A, 10.05.2005.
ОРЛОВ Ю.А. и соавт. Оценка чувствительности глиальных опухолей мозга к воздействию темодала в цитотоксическом тесте. Український нейрохірургічний журнал, 2004, № 2, С.50-54.
Е. І. Суслов, Т. П. Підгаєвська, А. В. Нікітін, І. Ю. Підгаєвський Новий спосіб діагностики і моніторингу ефективності лікування злоякісних пухлин за слиною // Патологія . - 2007. - № 1. - С. 67-71.
Чешук В.Є. Можливості індивідуалізації адьювантної полі хіміотерапії при раку молочної залози. Клінічні дослідження, 2003, № 1 (16), С.49-53.
Определение дозы гена HER2/neu при раке молочной железы (оценка чувствительности к Герцептину). [знайдено 2013-11-13]. Знайдено в Інтернет: <URL: Ковтонюк О.В. Зміни протеїназо-інгібіторного балансу при рості злоякісних пухлин з індукованою резистентністю до цисплатину. Автореф. дис.....канд.біол.наук., Київ, 2008.
Лісяний М.І. та співав. Дослідження чутливості клітин пухлин головного мозку різного походження до дії апоптозіндукуючих чинників. Український нейрохірургічний журнал, 2005, № 2, С.60-64.

UA 104343 C2

(54) СПОСІБ ОЦІНКИ ЧУТЛИВОСТІ ЗЛОЯКІСНИХ ПУХЛИН ДО ЛІКУВАЛЬНИХ ЧИННИКІВ

(57) Реферат:

Винахід належить до способу оцінки чутливості злоякісних пухлин до лікувальних чинників і може бути застосований у медицині, зокрема в онкології та фармакології. Винахід передбачає визначення вмісту ДНК та в'язкості в лізатах досліджуваних пухлин, після чого коефіцієнт токсичності (КТ) лікувального чинника щодо певного органа обчислюють за формулою:

$$KЧ = \left(\frac{m \Delta t C_{DNA}}{V} \right)_{\text{Контролю}} : \left(\frac{m \Delta t C_{DNA}}{V} \right)_{\text{Досліду}},$$

де m - маса зразка тканини; V - об'єм одержаного лізату; Δt - різниця між часом протікання крізь віскозиметр одиниці об'єму лізату після вирівнювання концентрації ДНК в лізатах та часом протікання чистого лізуючого розчину через віскозиметр; C_{DNA} - концентрація ДНК у вихідному лізаті або будь-яка величина, прямо пропорційна концентрації ДНК, наприклад, екстинкція вихідного лізату при довжині хвилі випромінювання 260 нм, і одержані результати обчислень інтерпретують наступним чином: якщо $KЧ > 1$ - пухлина чутлива до лікувального чинника, і чутливість тим більша, що більшою є величина $KЧ$; при $KЧ < 1$ лікувальний чинник сприяє виживанню пухлинних клітин.

Відомі такі прототиби та аналоги способу, що заявляється.

1. Повномасштабний онкологічний експеримент [1], в якому тваринам контрольної групи лише перещеплюють тестовану пухлину, а тваринам дослідної групи після перещеплення вводять тестований лікувальний чинник. Перевагою цього способу є можливість прямої кількісної оцінки протипухлинного ефекту препарату. Недоліки - його придатність лише для експериментальних пухлин; його матеріаломісткість (для одержання статистично значущого результату чисельність кожної групи має складати близько 10 тварин) і тривалість (до двох місяців, а за певних обставин і значно більше).

2. Рентгенологічні та томографічні способи, в яких пацієнта або піддослідну тварину досліджують методами звичайної рентгенографії, рентгенівської або магнітно-резонансної томографії до та після введення тестованого лікувального чинника, оцінюючи геометричні розміри та щільність пухлин. Перевагою цієї групи способів є можливість прямої кількісної оцінки протипухлинного ефекту препарату. Недоліками - те, що ці методи здебільшого використовуються лише в клінічній онкології, оскільки для їх застосування в експерименті необхідна дуже дорога та складна спеціалізована апаратура для томографічного дослідження тварин, а також утруднена диференціація між простим гальмуванням росту пухлин (тобто переведенням живих пухлинних клітин у фазу G0 клітинного циклу) та власне індукцією процесів клітинної смерті в пухлині.

3. Прямий цитотоксичний тест, в якому тестовану суспензію відокремлених пухлинних клітин інкубують протягом певного часу в термостаті в присутності (дослідний зразок) та у відсутності (контрольний зразок) тестованого лікувального чинника, після чого контрольний та дослідний зразки порівнюють за поглинанням клітинами барвників (зазвичай трипанового синього, метиленового синього або солей тетразолію) [2-4]. Перевагою цього способу є можливість прямої кількісної оцінки цитотоксичного ефекту. Недоліками - те, що цей спосіб є непридатним для переважної більшості солідних пухлин, клітини яких неможливо перевести в суспензію неушкодженими, а також непридатність цього способу для тестування таких лікарських засобів, які для виявлення протипухлинного ефекту потребують попередньої активації ферментами печінки.

4. Гістологічна оцінка лікарського патоморфозу пухлин [5]. Перевагою цього способу є можливість диференційованої оцінки чутливості різновидів пухлинних клітин до лікувального чинника. Недоліком - те, що кількісна оцінка ефекту препарату можлива лише за умови використання методу серійних зрізів, який є дуже працемістким та тривалим і з цієї причини може бути використаний лише в поодиноких випадках.

5. Імплантація попередньо зважених шматочків тестованої пухлинної тканини в імунологічно привілейовані зони (зокрема, під капсулу нирки) мишей або щурів [6], причому тваринам контрольної групи лише імплантують пухлину, а тваринам дослідної групи після імплантації вводять тестований лікувальний чинник, після чого імплантати видаляють та знову зважують. Різновидом цього способу є імплантація у черевну порожнину тварин дифузійних камер з пухлинним матеріалом. Перевагами цього способу є висока точність оцінки чутливості пухлин до лікарських препаратів, а також придатність як для експериментальних пухлин, так і для клінічного операційного матеріалу. Недоліки його - величезна працемісткість способу та його матеріаломісткість (потрібність великої кількості тварин для визначення спектру чутливості кожної пухлини), а також необхідність спеціального персоналу, що здатен проводити хірургічні операції на дрібних тваринах.

Власне опис винаходу, що заявляється

В основу винаходу поставлено задачу: розробити швидкий (тривалістю не більше 2 тижнів), придатний для скринінгових порівняльних досліджень груп лікувальних чинників та придатний як для експериментальних пухлин, так і для клінічного матеріалу і як для асцитних, так і для солідних пухлин кількісний спосіб оцінки чутливості злоякісних пухлин до лікувальних чинників.

Поставлена задача вирішується тим, що зі зразків пухлинної тканини, взятої перед введенням та після введення певних лікувальних чинників, одержують лізати за допомогою іонного детергенту, наприклад насиченого розчину суміші сечовини та натрію хлориду, далі вирівнюють одержані лізати за вмістом ДНК, наприклад вимірюючи за допомогою спектрофотометра поглинання лізатами ультрафіолетового випромінювання з довжиною хвилі 260 нм, після чого вимірюють та порівнюють в'язкість обох лізатів за допомогою віскозиметра.

При виконанні способу, що заявляється, зі зразків пухлинної тканини, взятої та зваженої до та після введення певних лікувальних чинників, одержують лізати за допомогою іонного детергенту, наприклад насиченого розчину суміші сечовини та натрію хлориду, далі вирівнюють одержані лізати за вмістом ДНК, наприклад вимірюючи за допомогою спектрофотометра поглинання лізатами ультрафіолетового випромінювання з довжиною хвилі 260 нм, після чого

вимірюють в'язкість обох лізатів за допомогою віскозиметра і далі за даними віскозиметрії та даними про питомий вміст ДНК на одиницю маси вихідної тканини обчислюють коефіцієнт чутливості (КЧ) пухлинної тканини до лікувального чинника як добуток коефіцієнтів кратності зменшення в'язкості розчину ДНК за однакової його концентрації та кратності зменшення

5 питомого вмісту ДНК на одиницю маси сирової пухлинної тканини після введення тестованого лікувального чинника, тобто за формулою:

$$KЧ = \left(\frac{m \Delta t C_{DNA}}{V} \right)_{\text{Контролю}} : \left(\frac{m \Delta t C_{DNA}}{V} \right)_{\text{Дослідю}},$$

де m - маса зразка тканини; V - об'єм одержаного лізату; Δt - різниця між часом протікання крізь віскозиметр одиниці об'єму лізату після вирівнювання концентрації ДНК в лізатах та часом протікання чистого лізуючого розчину через віскозиметр; C_{DNA} - концентрація ДНК у вихідному

10 лізаті або будь-яка величина, прямо пропорційна концентрації ДНК, наприклад, екстинкція вихідного лізату при довжині хвилі випромінювання 260 нм.

Якщо $KЧ > 1$, це свідчить про наявність чутливості пухлини до лікувального чинника, і чутливість тим більша, що більшою є величина КЧ. Якщо ж $KЧ < 1$, це свідчить про сприяння лікувального чинника виживанню пухлинних клітин, що може мати місце у пухлинах з високим

15 рівнем лікарської резистентності.

У випадку експериментальних пухлин, виготовляють та порівнюють лізати пухлинної тканини, одержаної від двох контрольних (без введення лікувального засобу) та двох дослідних (після введення лікувального засобу) тварин, а для вимірювань застосовують будь-який

20 віскозиметр, оскільки доступними для роботи є доволі великі (від кількох міліграмів) маси тканини. У випадку клінічного матеріалу, виготовляють та порівнюють лізати пухлинної тканини, одержаної шляхом біопсії з пухлини до лікування та шляхом біопсії (якщо операція з видалення пухлини не проводилася) або операції - після введення лікувального засобу, а для вимірювань застосовують мікровіскозиметр, оскільки у випадку біопсії доступними для роботи є лише

25 біоптати малої маси.

Причинно-наслідковий зв'язок між сукупністю ознак способу, що заявляється, та технічним результатом винаходу наступний.

За визначенням, чутливість пухлини до лікувального чинника визначається відсотком пухлинних клітин, що гинуть під впливом лікувального чинника. Будь-яка ж клітинна смерть пов'язана з рестрикцією клітинної ДНК, що починається у процесі, а завершується після загибелі клітини. Загибель клітин та рестрикція їх ДНК призводить одночасно до двох ефектів: а) зменшення в'язкості розчину ДНК за тієї самої його концентрації, внаслідок укорочення фрагментів ДНК; б) посиленого вимивання ДНК з тканини, внаслідок руйнування загиблих клітин та знов-таки укорочення фрагментів ДНК, що призводить до зменшення питомого вмісту ДНК на

35 одиницю маси сирової тканини. Таким чином, добуток коефіцієнтів кратності зменшення в'язкості розчину ДНК за однакової його концентрації та кратності зменшення питомого вмісту ДНК на одиницю маси сирової пухлинної тканини після введення тестованого лікувального чинника характеризує чутливість пухлини до тестованого лікувального чинника.

Приклади практичного застосування винаходу

40 Приклад 1. Дослідження пухлин, високочутливих до цисплатину.

Пухлини штаму, відомого як високочутливий до одного з широко вживаних протипухлинних препаратів - цисплатину були перещеплені однаковою кількістю пухлинних клітин чотирьом щурам, однаковим за віком та статтю. Після того, як пухлини досягали приблизно 10 мм в діаметрі, двом щурам було проведено по дві ін'єкції цисплатину в черевну порожнину в дозі 1,2

45 мг цисплатину на 1 кг маси тіла тварин (група "Дослід"). Слід відзначити, що проведені ін'єкції складали неповний курс лікування для щурів (повний складається, як мінімум, з чотирьох ін'єкцій). Такий неповний курс був проведений навмисно, оскільки при проведенні повного курсу в дослідній групі практично не лишилося б пухлинного матеріалу для подальшого дослідження. Іншим двом щурам ін'єкцій цисплатину не проводили (група "Контроль"). З кожної пухлини дослідної групи були взяті приблизно однакові шматочки тканини. Ці шматочки були разом зважені та лізовані розчином, що містив сечовину в концентрації 8М та натрію хлорид в концентрації 4М. З пухлинами контрольної групи були проведені такі ж маніпуляції.

50

В процесі спектрофотометричного та віскозиметричного дослідження пухлин контрольних та дослідних тварин були одержані наступні дані (Таблиця 1). Кожне вимірювання проводили не менш ніж тричі. В таблиці наведені лише середні арифметичні значення, оскільки величини стандартних відхилень не використовуються в подальших розрахунках.

55

Таблиця 1

Параметри для розрахунку КЧ, одержані при дослідженні пухлин, чутливих до цисплатину

Матеріал	m, г	Δt , с	C_{DNA}	КЧ
Контроль	1,01	36	1,4	2,29
Дослід	1,25	24	0,74	

Примітка: Величина V для обох матеріалів була однаковою (40 мл), тому при діленні дробів скорочується і в таблиці не наведена.

5

З таблиці видно, що при застосуванні цисплатину величина КЧ для пухлинного штаму, високо чутливого до цисплатину, виявилася значно більшою за одиницю, як це і передбачалося.

Приклад 2. Дослідження пухлин, високорезистентних до цисплатину.

10

Пухлини штаму, спеціально селекціонованого для досягнення високої резистентності до цисплатину, були перещеплені однаковою кількістю пухлинних клітин чотирьом щурам, однаковим за віком та статтю. Всі подальші маніпуляції були проведені так само, як описано вище у Прикладі 1. В процесі спектрофотометричного та віскозиметричного дослідження пухлин контрольних та дослідних тварин були одержані такі дані (Таблиця 2).

15

Таблиця 2

Параметри для розрахунку КЧ, одержані при дослідженні пухлин, резистентних до цисплатину

Матеріал	m, г	Δt , секунд	C_{DNA}	КЧ
Контроль	2,23	161	0,12	1,07
Дослід	3,59	521	0,21	

Примітка: Величина V для обох матеріалів була однаковою (50 мл), тому при діленні дробів скорочується і в таблиці не наведена.

20

З таблиці видно, що при застосуванні цисплатину величина КЧ для пухлинного штаму, високо резистентного до цисплатину, практично не відрізнялася від одиниці, як це і передбачалося.

Таким чином, технічного результату винаходу досягнуто.

Література:

25

1. Доклінічні дослідження лікарських засобів. Методичні рекомендації / О.В. Стефанов, ред. - Київ: «Авіценна», 2001. - С. 361-370.

2. Орловський О.А., Залеток С.П., Лялюшко Н.М. та ін. Прояви закону Введенського в цитотоксичній дії протипухлинних препаратів, поліамінів та модуляторів їх метаболізму щодо клітин експериментальних пухлин // Актуальные проблемы медицины и биологии. - 2004. - №1. - С. 339-356.

30

3. Передерни В.Г., Земсков А.М., Бычкова Н.Г., Земсков В.М. Иммуный статус, принципы его оценки и коррекции иммунных нарушений. - Киев, 1995. - С. 61-62.

4. Ohno M., Abe T. Rapid colorimetric assay for the quantification of leukemia inhibitory factor (LIF) and interleukin-6 // J. Immunol. - 1991. - N145. - P. 199-203.

35

5. Галахин К.А., Курик Е.Г. Лечебный патоморфоз злокачественных опухолей пищеварительного тракта. - Киев: "Книга плюс", 2000. - 176 с.

6. Гаврина Г.Б. Разработка подходов к индивидуализации антиметастатической терапии. - Дисс. ... канд. мед. наук. - Киев, 1990. - 139 с.

40

ФОРМУЛА ВИНАХОДУ

Спосіб оцінки чутливості злоякісних пухлин до лікувальних чинників, який **відрізняється** тим, що в ньому з пухлинної тканини, взятої та зваженої перед введенням та після введення певного лікувального чинника, одержують лізати за допомогою іонного детергенту, далі вимірюють вміст ДНК в одержаних лізатах, після чого вирівнюють одержані лізати за вмістом ДНК, далі

45

вимірюють в'язкість обох лізатів за допомогою віскозиметра і далі обчислюють коефіцієнт чутливості (КЧ) пухлинної тканини до лікувального чинника за формулою:

$$КЧ = \left(\frac{m \Delta t C_{DNA}}{V} \right)_{\text{Контролю}} : \left(\frac{m \Delta t C_{DNA}}{V} \right)_{\text{Дослідю}},$$

- 5 де m - маса зразка тканини; V - об'єм одержаного лізату; Δt - різниця між часом протікання крізь віскозиметр одиниці об'єму лізату після вирівнювання концентрації ДНК в лізатах та часом протікання чистого лізуючого розчину через віскозиметр; C_{DNA} - концентрація ДНК у вихідному лізаті або будь-яка величина, прямо пропорційна концентрації ДНК, наприклад, екстинкція вихідного лізату при довжині хвилі випромінювання 260 нм, і якщо обчислена $КЧ > 1$ – пухлина чутлива до лікувального чинника, і чутливість тим більша, що більшою є величина КЧ; $КЧ < 1$
- 10 свідчить про сприяння лікувального чинника виживанню пухлинних клітин.

Комп'ютерна верстка А. Крулевський

Державна служба інтелектуальної власності України, вул. Урицького, 45, м. Київ, МСП, 03680, Україна

ДП "Український інститут промислової власності", вул. Глазунова, 1, м. Київ – 42, 01601