

**Р. В. Ищенко***Донецкий государственный  
медицинский университет  
МЗ Украины, Донецк, Украина***Ключевые слова:***противоопухолевая  
химиотерапия, индивидуальная  
чувствительность, экспресс-  
определение, методика in vitro.*РАБОТА РЕКОМЕНДОВАНА К ПУБЛИКАЦИИ ПО ИТОГАМ  
IV РЕСПУБЛИКАНСКОЙ НАУЧНО-ПРАКТИЧЕСКОЙ  
КОНФЕРЕНЦИИ МОЛОДЫХ ОНКОЛОГОВ УКРАИНЫ (КИЕВ, 2001)**МЕТОДИКА  
КАПЕЛЬНО-ПЛАЗМЕННОГО  
КУЛЬТИВИРОВАНИЯ  
ОПУХОЛЕВОЙ ТКАНИ  
ДЛЯ ЭКСПРЕСС-ОПРЕДЕЛЕНИЯ  
ИНДИВИДУАЛЬНОЙ  
ЧУВСТВИТЕЛЬНОСТИ  
К ХИМИОПРЕПАРАТАМ****Резюме.** *Разработаны модификации методики капельно-плазменного культивирования опухолевой ткани, которые могут быть использованы как в экспериментальной онкологии, так и в клинической практике для определения в течение 48 ч индивидуальной чувствительности клеток из опухолей или метастазов к противоопухолевым препаратам.*

Согласно современным представлениям, при лечении больных со злокачественными опухолями применяются химиотерапевтические препараты, различающиеся по механизму действия. Также известно, что у разных больных опухоли, сходные по гистологическому строению, имеют индивидуальную химиочувствительность. В связи с этим разработано достаточно много методик определения химиочувствительности [1–4], однако практически все они исключают непосредственный контакт опухолевой ткани с химиопрепаратом и основываются на определении индивидуальной ферментативной активности опухолей [5]. Вероятно, поэтому результаты лабораторных тестов не всегда соответствуют ожидаемому терапевтическому эффекту [6]. Методики прямого определения химиочувствительности опухолей при культивировании их клеток *in vitro* также имеют определенные ограничения. Большинство таких методик предусматривает использование синтетических питательных сред, которые создают искусственные условия, существенно отличающиеся от исходных, определяющих рост опухоли в организме [3, 4].

Капельно-плазменные методики предусматривают использование плазмы крови человека и создание среды, наиболее близкой к исходной. Впервые капельно-плазменные культуры были предложены американским эмбриологом Россом Гаррисоном (метод висячей капли) в 1907 г. Среди различных модификаций в настоящее время наиболее распространен метод Максимова, заключающийся в использовании эмбрионального экстракта, раствора Тироде и сыворотки крови донора. Относительные недостатки данного метода — использование эмбрионального экстракта, что является спорным в моральном аспекте (Европейская конвенция «О запрете применения эмбриональ-

ных тканей»), а также плазма крови донора, состав которой существенно отличается от плазмы крови больного, чем обусловлены недостаточный процент перевиваемости (91%, по данным автора) и медленное появление зоны роста.

В связи с изложенным нами была поставлена цель разработать ускоренную методику прямого определения индивидуальной химиочувствительности в капельно-плазменных культурах опухолевой ткани.

На первом этапе исследования была разработана методика капельно-плазменного культивирования опухолевой ткани с использованием плазмы крови больного, у которого брали опухоль, опухолевого экстракта из нее и раствора Тироде (заявка на изобретение «Способ культивирования опухолевой ткани» от 06.05.2001 г. № 2001053089, положит. решение от 30.11.2001 г.), имеющая несколько модификаций.

Для приготовления опухолевого экстракта фрагмент опухоли (диаметром около 1 см) в стерильных условиях механически измельчали, отмывали изотоническим раствором натрия хлорида, растирали с кварцевым песком, суспендировали в 5 мл этого раствора и фильтровали. В полученный опухолевый экстракт добавляли один из антибиотиков широкого спектра действия в общепринятых дозах; хранили при температуре от 0 до –3 °С в течение не более 2 сут. Раствор Тироде готовили по авторской методике (NaCl — 8 г, KCl, CaCl<sub>2</sub> — по 0,2 г, MgCl<sub>2</sub>·6H<sub>2</sub>O — 0,1 г, NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> — 0,05 г, NaHCO<sub>3</sub> — 1 г, глюкоза — 1 г, Aq. Bidest — 1 л, pH — 7,35–7,4), стерилизовали фильтрованием. Перед премедикацией у больного проводили забор 5 мл крови из периферической вены, которую затем центрифугировали и отбирали среднюю треть плазмы.

Опухолевую ткань для культивирования брали с помощью иглы для трепанбиопсии. Полученные участки опухоли стерильно разрезали на диски высотой не более 1 мм. Приготовление культуры: на предварительно обезжиренное стерильное покровное стекло с лункой последовательно наносили по одной капле изотонического раствора, по одной капле плазмы крови больного, по одной капле опухолевого экстракта. Последний распределяли в лунке в виде круга диаметром не более 15 мм, смешивая с плазмой крови так, чтобы она свернулась. После свертывания плазмы крови на нее наносили кусочек опухолевой ткани и жидкую питательную среду (раствор Тироде — 50%, сыворотка крови больного — 40%, опухолевый экстракт — 10%). Стеклопалочкой по краям лунки наносили две капли вазелина так, чтобы они были покрыты впоследствии покровным стеклом. Затем накладывали покровное стекло так, чтобы культура находилась в его центре. Для создания герметичности края стекла заливали расплавленным парафином. Недостатками такой методики являются короткий срок культивирования (50–90 ч), невозможность окрашивания опухолевой ткани, так как при снятии покровного стекла разрушается зона роста. Единственным методом оценки является темнопольная микроскопия.

Учитывая это, была разработана модификация, основные отличия которой от описанной выше методики заключаются в возможности более длительного культивирования опухолевой ткани за счет частичной смены питательной среды и сохранения газообмена в культуре. В лунку предметного луночного стекла вносили кольцо из пищевой пластмассы, смоченное в стерильном вазелиновом масле. Кольцо должно иметь следующие параметры: диаметр — меньше диаметра лунки, высота — не более  $\frac{1}{3}$  диаметра. Культуру готовили так же, как и в первом случае, однако после внесения последнего ингредиента поверх культуры пипеткой с большим сечением наносили крупную каплю стерильного вазелинового масла. Культивирование производили при температуре 37 °С (желательно обогатить атмосферу увлажненным O<sub>2</sub>). Вазелиновое масло выполняет роль бактериального фильтра и позволяет сохранять газообмен в культуре. С помощью стерильной тонкой иглы можно аспирировать питательную среду из культуры и ввести свежую, с сохранением герметичности культуры. Данная модификация позволяет после прицельной аспирации вазелинового масла и питательной среды производить гистологическое окрашивание культивируемых тканей и микроскопию в обычном режиме.

Для определения индивидуальной химиочувствительности (заявка на изобретение «Способ определения индивидуальной химиочувствительности опухолей» № 2001053088 от 06.05.2001 г., положит. решение от 30.11.2001 г.) в культуры перед герметизацией вносили микрокаплю исследуемого химиопрепарата. Чтобы создать наиболее близкие к исходным условиям взаимодействия опухолевой ткани с химиопрепаратом, последний можно конъюгировать с белками плазмы крови. С этой целью в свежееотцентрифугированную плазму крови вносили раствор химиопре-

парата, центрифугировали смесь (200–300 об/мин) в течение 1 мин. Затем после ручного встряхивания конъюгат вносили в культуру. Особое внимание следует уделять правильному подбору концентраций химиопрепарата, учитывая массу культивируемой ткани. По нашим данным, наиболее целесообразно использовать следующие дозы (1 мг в 0,01 мл раствора): доксорубин —  $4,4 \cdot 10^{-4}$ , циклофосфамид —  $4,4 \cdot 10^{-3}$ , флуороурацил —  $3,6 \cdot 10^{-3}$ , винкристин —  $8,7 \cdot 10^{-6}$ , метотрексат —  $2,9 \cdot 10^{-4}$ , ифосфамид —  $3,6 \cdot 10^{-2}$ , паклитаксел —  $1,5 \cdot 10^{-3}$ , эпирубинин —  $1,5 \cdot 10^{-3}$ , доцетаксел —  $7,3 \cdot 10^{-4}$ , рассчитанные на кусочки опухолевой ткани, полученные с помощью трепан-иглы (диаметр — 1,5 мм, высота — 1 мм, площадь поверхности опухолевого материала —  $7,3 \cdot 10^{-6} \text{ м}^2$ ).

Модификация, с помощью которой можно определить инвазивный и метастатический потенциал клеток опухоли, предусматривает использование трипсинизированного материала. Прототипом явилась методика получения клонов по методу Wildy и Stoker. Трипсинизацию опухолевой ткани производили одним из общеизвестных способов (целесообразнее использовать смесь трипсина и панкреатина). Предварительно в лунках выращивали (под вазелиновым маслом) монослой фибробластов, применяя вместо плазмы крови коммерческие среды для культивирования клеток соединительной ткани. С помощью прицельной аспирации под контролем светового микроскопа поверх слоя фибробластов вносили (используя капилляры диаметром 50 мк) до 5 опухолевых клеток. Следующим этапом являлось внесение в культуры 0,001 мл раствора химиопрепарата (расчет на поверхность фибробластов), в контрольные культуры — аналогичного объема изотонического раствора. Оценку результатов производили по способности клеток к клонообразованию под действием химиопрепарата: определяли степень инвазии матричной культуры фибробластов, «этажность» опухолевой культуры (количество рядов опухолевых клеток, свидетельствующих о степени редукции контактного торможения), при непродолжительном сроке культивирования учитывали количество вновь образованных опухолевых клеток. Особый интерес представляет формирование межклеточных контактов опухолевой клетки и матричной культуры под влиянием химиопрепарата. При изучении его влияния на метастазирование опухоли целесообразно в качестве матричного слоя использовать культуру эндотелиоцитов.

В культуре, приготовленной по одной из описанных методик, уже через несколько часов определялся рост, а к концу 1-х суток сформировалась зона роста. При определении индивидуальной химиочувствительности проводили сравнение с контрольными культурами по максимальному расстоянию перемещения (МРП) отдельных опухолевых клеток, средней ширине зоны роста (СШЗР), рядности и полярности клеток, соответственно морфологии культивируемых клеток.

В онкологической практике не всегда есть возможность использовать послеоперационный мате-

риал, однако с помощью трепанобиопсии можно получить опухолевую ткань и у неоперабельных больных. Для повышения достоверности результатов биопсийный материал следует брать из различных участков опухоли и отдельно — из метастазов. Культивирование биопсийного материала производили без использования опухолевого экстракта, в этом случае применяли конденсированные питательные среды и неспецифические биогенные стимуляторы (например, фолиевую кислоту).

Предложенные методики использовали в клинической практике в Донецком областном противоопухолевом центре на базе 2-го хирургического отделения. В течение 2000–2001 гг. исследовали операционные препараты и материалы трепанобиопсий, полученные у 27 больных раком молочной железы: T1N0M0 — 1, T2N0M0 — 6, T3N0M0 — 3, T2N1M0 — 9, T2N2M0 — 4, T3N1M0 — 4 больных. У всех больных перед проведением системной или регионарной химиотерапии определяли индивидуальную химиочувствительность опухоли. Всего было приготовлено около 300 тканевых культур, в которых определяли химиочувствительность. Данные сравнительной характеристики действия исследованных химиопрепаратов на показатели клеточного роста в культурах представлены в таблице. Это еще раз подтвердило утверждение об индивидуальной химиочувствительности, так как ни в одном случае не было получено абсолютно идентичных результатов. Тем не менее следует отметить, что к некоторым препаратам (доцетаксел, флуороурацил) наблюдалась более высокая чувствительность: 88,8 и 55,6% соответственно, в то время как к другим химиопрепаратам чувствительность опухолевой ткани была низкой (винкристин — 7,4%, ифосфамид — 3,7%). Интересным является факт, что к каждому из исследуемых химиопрепаратов было чувствительно хотя бы небольшое количество опухолей. Это подтверждает представления, отвергающие возможность резистентности опухоли одновременно ко всем химиопрепаратам.

После получения данных об индивидуальной химиочувствительности для каждой больной индивидуализированно разрабатывали схему и режим проведения химиотерапии. Всем больным проводили радикальное хирургическое вмешательство. В настоящее время все они живы, однако у 1 (3,7%) больной отмечено прогрессирование основного заболевания.

Таблица  
Сравнительная характеристика действия химиопрепаратов на показатели клеточного роста в культурах опухолевой ткани

Препарат	Количество больных	МРП <sup>1</sup> (мкм)	СШЗР <sup>1</sup> (мкм)	Рядность клеток в культуре <sup>1</sup>	Химиочувствительность (%)
Доксорубин	18	1300 ± 270	540 ± 40	> 12	16,6
Циклофосфамид	23	870 ± 210	420 ± 25	> 10	26,0
Флуороурацил	27	650 ± 170	380 ± 35	> 8	55,6
Винкристин	27	1850 ± 185	980 ± 60	> 16	7,4
Метотрексат	25	1350 ± 220	610 ± 45	> 13	16,0
Ифосфамид	14	1900 ± 190	1050 ± 50	> 18	3,7
Паклитаксел	14	900 ± 230	400 ± 30	> 9	28,6
Эпирубицин	18	1580 ± 205	870 ± 50	> 15	11,1
Доцетаксел	27	400 ± 170	260 ± 35	> 4	88,8

<sup>1</sup> Результаты исследования 24-часовых культур.

Все остальные пациентки проходят контрольные обследования каждые 3 мес. Оценка корреляции результатов, полученных при определении химиочувствительности, с данными клинических исследований станет возможна по истечении установленных сроков клинических наблюдений (3–5-летняя выживаемость). Тем не менее, полученные предварительные результаты и позволяют рекомендовать представленные методики определения индивидуальной химиочувствительности для дальнейших клинических исследований.

## БЛАГОДАРНОСТЬ

Автор выражает искреннюю признательность своим научным руководителям — чл.-кор. АМН Украины, зав. кафедрой онкологии ДонГМУ, проф. Г.В. Бондарю и заведующему II хирургическим отд. ДОПЦ, канд.мед.наук, И.Е. Седакову за помощь при разработке и клинической апробации представленных методик, а также проф. Н.Ф. Гамалею (ИЭПОР им. Р.Е. Кавецкого НАН Украины) за существенные замечания и коррекцию методик.

## ЛИТЕРАТУРА

1. Потехина ГП, Шумилина ВВ, Лисовенко ГС и др. Тестирование *in vitro* чувствительности опухолевых клеток к химиопрепаратам. Укр хіміотерапевт журн 2000; 2: 26–9.
2. Добрынин ЯВ. Проблемы отбора противоопухолевых веществ в тканевых и клеточных культурах. Эксперим онкол 1985; 7 (2): 9–15.
3. Кузнецова НН, Нуридджанян СС, Пан ЗП, Мухамедханова ФС. Клеточная тест-система для предварительного отбора противоопухолевых препаратов. Вопр онкол 1981; 27 (12): 36–9.
4. Добрынин ЯВ, Николаева ТГ, Иванова ТП. Клеточная тест-система в отборе биологически активных веществ с предполагаемым противоопухолевым действием. В: Актуальные проблемы экспериментальной химиотерапии опухолей. Черноголовка, 1980; 2: 18–20.
5. Затула ДГ, Резник СР. Микромодификация метода определения чувствительности дегидрогеназ опухолей человека к антибластным антибиотикам и химиопрепаратам. Микробиол журн 1971; 4: 520–2.
6. Fojo AT. Drug Resistance Cancer Therapy. Boston, 1989: 27–36.

## TECHNIQUE OF DROP/PLASMA CULTIVATION OF TUMOR TISSUES FOR SNAP ANALYSIS OF INDIVIDUAL SUSCEPTIBILITY TO CHEMODRUGS

R. V. Ischenko

**Summary.** Several modifications of the drop/plasma method for tumor tissue cultivation have been developed that may be used both in experimental oncology and in clinical practice with the view of assessment within 48 hours of the individual susceptibility of tumor and metastasis cell to anti-tumor agents.

**Key Words:** anti-tumor chemotherapy, individual susceptibility, snap analysis, *in vitro* assay.

Адрес для переписки:

Ищенко Р.В.

83092, Донецк, ул. 230-й стрелковой дивизии, 3, кв. 10.