



**МЕТОД ОЦЕНКИ КЛОН-ИНДУЦИРОВАННОЙ
ЧУВСТВИТЕЛЬНОСТИ ОПУХОЛЕВЫХ КЛЕТОК
ЗЛОКАЧЕСТВЕННЫХ НОВООБРАЗОВАНИЙ
ГОЛОВНОГО МОЗГА К ПРОТИВООПУХОЛЕВЫМ
ЛЕКАРСТВЕННЫМ СРЕДСТВАМ**

инструкция по применению

Учреждения-разработчики: государственное учреждение
«Республиканский научно-практический центр неврологии и
нейрохирургии», государственное научное учреждение «Институт
физиологии Национальной академии наук Беларуси»

Авторы: к.б.н., доцент Николаевич Л.Н.; к.м.н. Талабаев М.В.; к.б.н.,
доцент Пархач Л.П.; д.м.н., член-корр. НАН Беларуси Залуцкий И.В.

Минск, 2016

**МИНИСТЕРСТВО ЗДРАВООХРАНЕНИЯ
РЕСПУБЛИКИ БЕЛАРУСЬ**

УТВЕРЖДАЮ
Первый заместитель министра

_____ Д.Л. Пиневиц
28.10.2016
Регистрационный № 055-0916

**МЕТОД ОЦЕНКИ КЛОН-ИНДУЦИРОВАННОЙ ЧУВСТВИТЕЛЬНОСТИ
ОПУХОЛЕВЫХ КЛЕТОК ЗЛОКАЧЕСТВЕННЫХ НОВООБРАЗОВАНИЙ
ГОЛОВНОГО МОЗГА К ПРОТИВООПУХОЛЕВЫМ ЛЕКАРСТВЕННЫМ
СРЕДСТВАМ**

инструкция по применению

УЧРЕЖДЕНИЯ-РАЗРАБОТЧИКИ: ГУ «Республиканский научно-практический центр неврологии и нейрохирургии», ГНУ «Институт физиологии НАН Беларуси»

АВТОРЫ: канд. мед. наук, доц. Л.Н. Николаевич, канд. мед. наук М.В. Талабаев, канд. биол. наук, доц. Л.П. Пархач, д-р мед. наук, проф., чл.-кор. НАН Беларуси И.В. Залуцкий

Минск 2016

В настоящей инструкции по применению (далее — инструкция) изложен метод оценки клон-индуцированной чувствительности опухолевых клеток злокачественных новообразований головного мозга к химиотерапии, который может быть использован в комплексе медицинских услуг, направленных на лечение пациентов со злокачественными новообразованиями головного мозга.

Метод, изложенный в настоящей инструкции, предназначен для врачей-нейрохирургов, онкологов-химиотерапевтов, иных врачей-специалистов организаций здравоохранения, оказывающих медицинскую помощь пациентам со злокачественными новообразованиями головного мозга.

ПЕРЕЧЕНЬ НЕОБХОДИМОГО ОБОРУДОВАНИЯ, РЕАКТИВОВ, СРЕДСТВ, ИЗДЕЛИЙ МЕДИЦИНСКОЙ ТЕХНИКИ

Оборудование:

1. Камера пылезащитная с ламинарным потоком стерильного воздуха.
2. Центрифуга (1000/1500/3000 об./мин).
3. CO₂-инкубатор.
4. Автоматический счетчик клеток.
5. Холодильник (температурный режим +4°C).
6. Морозильная камера (температурный режим -20°C).
7. Набор автоматических дозаторов переменного объема 2–1000 мкл.
8. Бинокулярный микроскоп.

Материалы:

Стерильные флаконы, пипетки серологические (5; 10 и 25 мл), центрифужные пробирки, наконечники для дозаторов, чашки Петри, флаконы (10; 20; 50 мл), фильтры.

Реактивы:

1. Ростовые среды ДМЕМ/F12, F10, RPMI1640.
2. Фетальная бычья сыворотка (FBS).
3. Трипсин/ЭДТА.
4. Раствор Хенкса, физиологический раствор.
5. Пенициллин/стрептомицин/гентамицин.
6. Тестируемые цитостатические лекарственные средства (далее — ЛС).

ПОКАЗАНИЯ К ПРИМЕНЕНИЮ

Злокачественные новообразования головного мозга.

ПРОТИВОПОКАЗАНИЯ ДЛЯ ПРИМЕНЕНИЯ

Абсолютные противопоказания отсутствуют.

ОПИСАНИЕ ТЕХНОЛОГИИ ИСПОЛЬЗОВАНИЯ МЕТОДА

I этап — выделение популяции клеток из опухоли

Фрагменты ткани опухоли, выделенные из различных участков новообразования в процессе хирургической операции, диспергируют, используя одновременно механическое воздействие в сочетании с ферментативной обработкой трипсином (0,2 %) и ЭДТА (0,05 %) до выделения суспензии

опухолевых клеток. Очищение суспензии опухолевых клеток от стромы проводят путем выращивания первичной культуры с неоднократной сменой среды. Отсутствие клеток нормальных тканей (лимфоциты, макрофаги, клетки соединительной ткани и т. д.) подтверждается морфологическими исследованиями под инвертированным микроскопом.

II этап — клонирование опухолевых клеток *in vitro*

Методом серийных разведений исходной суспензии опухолевых клеток единичные клетки засевают в чашки Петри в ростовую смесь, состоящую из 70 % стандартной ростовой среды F10, 30 % FBS и гентамицина.

III этап — добавление противоопухолевых лекарственных средств в клоны клоногенных опухолевых клеток

На 2-е сут в клоны единичных клеток вводят тестируемые лекарственные средства. Дозу противоопухолевого ЛС, добавляемого в культуру клеток, рассчитывают путем пропорционального перерасчета суточной дозы препарата на площадь чашки Петри.

Спустя 7 сут после инкубации в CO₂-инкубаторе при 37°C, 5 % CO₂ и 95 % влажности воздуха колонии единичных клеток фиксируют 70° этанолом и окрашивают по Романовскому–Гимза в течение 10 мин.

IV этап — клональный анализ на чувствительность клоногенных опухолевых клеток к противоопухолевым лекарственным средствам

Оценивают эффективность клонирования и выживаемость клоногенных клеток в клонах после воздействия цитостатических лекарственных средств.

Эффективность клонирования осуществляют по формуле (1):

$$Эк = Kк / Kкл \times 100 (\%), \quad (1)$$

где Эк — эффективность клонирования, выраженная в процентах;

Kк — количество колоний, выросших на чашке Петри;

Kкл — количество единичных клеток, посеянных на чашке Петри.

Индекс чувствительности (Ич), характеризующий выживаемость клоногенных опухолевых клеток в клонах рассчитывают по формуле (2):

$$Ич = Эк^0 / Эк \times 100 \%, \quad (2)$$

где Ич — индекс чувствительности клоногенных клеток к противоопухолевым лекарственным средствам;

Эк⁰ — эффективность клонирования клоногенных клеток, обработанных противоопухолевыми лекарственными средствами;

Эк — эффективность клонирования клоногенных клеток, необработанных противоопухолевыми лекарственными средствами (контроль).

0 % ≤ Ич ≤ 19 % — отсутствие чувствительности к противоопухолевым лекарственным средствам;

$20 \% \leq \text{Ич} \leq 49 \%$ — слабая чувствительность к противоопухолевым лекарственным средствам;

$50 \% \leq \text{Ич} \leq 69 \%$ — умеренно выраженная чувствительность к противоопухолевым лекарственным средствам;

$70 \% \leq \text{Ич} \leq 100 \%$ – выраженная чувствительность к противоопухолевым лекарственным средствам.

Опухоль считают чувствительной к противоопухолевым лекарственным средствам, если подавление роста опухолевых клоногенных клеток *in vitro* составляет не менее 50 % от исходного уровня.

ПЕРЕЧЕНЬ ВОЗМОЖНЫХ ОСЛОЖНЕНИЙ ИЛИ ОШИБОК ПРИ ВЫПОЛНЕНИИ И ПУТИ ИХ УСТРАНЕНИЯ

Нарушение асептических условий при выделении опухолевых клеток, их культивировании и клонировании *in vitro*.

Соответствуют побочным эффектам лекарственных средств, предусмотренных инструкцией по применению и расчету доз на модель *in vitro*.

Нарушение правил приготовления и хранения реагентов и лекарственных средств.

Недостаточное количество клеток, выделенных из фрагмента ткани опухоли.

Низкая эффективность клонирования опухолевых клеток.

Нарушения в работе медицинских изделий.