



УКРАЇНА

(19) UA (11) 33260 (13) U
(51) МПК (2006)
G01N 27/00МІНІСТЕРСТВО ОСВІТИ
І НАУКИ УКРАЇНИДЕРЖАВНИЙ ДЕПАРТАМЕНТ
ІНТЕЛЕКТУАЛЬНОЇ
ВЛАСНОСТІОПИС
ДО ПАТЕНТУ
НА КОРИСНУ МОДЕЛЬвидається під
відповідальність
власника
патенту

(54) СПОСІБ ВИЗНАЧЕННЯ РІВНЯ ГІПОКСІЇ В ПУХЛИНІ ЯК ФАКТОРА ПРОГНОЗУ ПЕРЕБІГУ РАКУ ШЛУНКА

1

2

(21) u200802486

(22) 26.02.2008

(46) 10.06.2008, Бюл.№ 11, 2008 р.

(72) БУБНОВСЬКА ЛАРИСА МИКИТІВНА, UA, КОВЕЛЬСЬКА АНТОНІНА ВАСИЛІВНА, UA, БОЛДЕСКУЛ ІГОР ЄВГЕНОВИЧ, UA, ОСИНСЬКИЙ ДМИТРО СЕРГІЙОВИЧ, UA, МЕРЕНЦЕВ СЕРГІЙ ПАВЛОВИЧ, UA, ОСИНСЬКИЙ СЕРГІЙ ПЕТРОВИЧ, UA

(73) ДЕРЖАВНА УСТАНОВА "ІНСТИТУТ ОНКОЛОГІЇ АКАДЕМІЇ МЕДИЧНИХ НАУК УКРАЇНИ", UA, ІНСТИТУТ ЕКСПЕРИМЕНТАЛЬНОЇ ПАТОЛОГІЇ, ОНКОЛОГІЇ І РАДІОБІОЛОГІЇ ІМ. Р.Є. КАВЕЦЬКОГО НАН УКРАЇНИ, UA

(57) Спосіб визначення рівня гіпоксії в пухлині як фактора прогнозу перебігу раку шлунка, що включає ЯМР дослідження операційного матеріалу, який **відрізняється** тим, що операційний матеріал перетворюють на перхлорний екстракт та на фосфорному ядрі ЯМР спектрометра визначають співвідношення фосфомоноестери/неорганічний фосфат і при його значенні нижче 1,4 пухлину оцінюють як гіпоксичну та прогнозують несприятливий перебіг захворювання, а при його значенні вище 1,4 пухлину характеризують як оксигеновану, що вказує на сприятливий перебіг захворювання.

Заявка відноситься до галузі медицини, зокрема до клінічної онкології та хірургії.

Проблема прогнозування перебігу злоякісних пухлин, зокрема раку шлунка є актуальною, тому що оцінка можливого перебігу захворювання та своєчасна корекція схеми лікування покращує ефективність терапії [1, 2]. Існує певна низка прогностичних показників, у тому числі показники системи TNM, але для раку шлунка досі немає узагальнюючого, який характеризував би основні риси пухлини [3]. Гіпоксія пухлини є найбільш характерною ознакою злоякісного новоутворення, яка позитивно впливає на пухлинну прогресію, зокрема на метастазування та резистентність до цитостатичних агентів [4].

Рівень гіпоксії в пухлині визначається за допомогою імуногістохімічного визначення експресії гіпоксія-залежних білків та маркерів, насамперед гіпоксія-індукований фактор-1 (ГІФ-1), фермент карбоангідраза-9 (CA-9), білок-переносник глюкози-1 (GLUT-1) і речовина пімонідазол. Ці маркери застосовуються при прогнозуванні перебігу раку шийки матки, пухлинах голови та шиї, насамперед як такі, що передбачають відповідь пухлини на терапію, зокрема - на променеви. При раку шлунка наведені маркери гіпоксичного стану не застосовуються, тому що одні з них експресуються при хронічній гіпоксії, інші - тільки при гострій [5]. В той

же час існує показник, який узагальнює обидва типи гіпоксії у тканині, тому що є показником рівня фосфорвміщуючих речовин, які задіяні в енергетичному обміні тканини, і ідентифікується на спектрах ³¹P ЯМР спектроскопії, а саме співвідношення Рі/βNTP (неорганічний фосфат/нуклеозидтрифосфат). Це співвідношення є загальновизнаним для оцінки енергетичного статусу та рівня гіпоксії в тканині, зростання якого свідчить про погіршення статусу оксигенації. Проте у клінічній практиці досліджуються вже розвинуті пухлині, в яких рівень βNTP (нуклеозидтрифосфат) часто знижується до величин, які не можуть бути виміряні, що є характерним для злоякісних пухлин. Для оцінки біоенергетичного статусу тканини та рівня її гіпоксії існує такий метаболічний показник, як РМЕ/Рі (фосфомоноестери/неорганічний фосфат), який є чутливим до тканинної оксигенації. Визначена лінійна кореляція (p<0,001) між середнім значенням парціального тиску кисню (pO₂) та відповідним значенням цього співвідношення [6].

За прототип корисної моделі можна вважати спосіб імуногістохімічного виявлення наявності експресії маркерів гіпоксії, таких як CA-9, GLUT-1, ГІФ-1, пімонідазол [Bussink J., Kaanders J.H.A.M., van der Kogel A.J. Tumor hypoxia at the micro-regional level: clinical relevance and predictive value of exogenous and endogenous hypoxic cell markers//

(19) UA (11) 33260 (13) U

Radiother. Oncol. - 2003. - Vol.67. - P.3-15], яка дозволяє визначити умовний рівень експресії маркерів, залежної від рівня гіпоксії тканини. Встановлено, що існує кореляція між рівнями експресії цих маркерів та гіпоксії.

Позитивним у прототипі є те, що рівень експресії маркерів визначається за допомогою моноклональних антитіл, тобто з високим ступенем селективності.

Недоліком прототипу є те, що рівень експресії маркерів не завжди корелює з парціальним тиском кисню і залежить від типу гіпоксії - гострої чи хронічної, що знижує прогностичну значущість визначення цього показника.

В основу корисної моделі поставлено задачу створити спосіб визначення рівня гіпоксії в пухлині як фактора прогнозу перебігу раку шлунка шляхом визначення співвідношення РМЕ/Рі пухлини в операційному (біопсійному) матеріалі, що дасть можливість прогнозувати перебіг захворювання.

Поставлена задача вирішувалася наступним чином:

Під час операції частку видаленої пухлинної тканини негайно занурюють в рідкий азот, в якому її розтирають до порошковидного стану і екстрагують фосфорвмісні речовини розчином холодної 1,2н НСІО₄ (перхлорної кислоти) Потім рН перхлорного екстракту (ПХЕ) доводять до 7,6-8,0 (дівалентні іони видаляють за допомогою Chelex 10мг/5мл (Sigma, США), фільтрують, ліофілізують та зберігають при -20°С. Перед реєстрацією спектрів ПХЕ на ³¹Р ЯМР спектрометрі зразки розчиняють в 1,0мл D₂O, центрифугують і переносять в ЯМР пробірки для аналізу.

Сpektри ПХЕ реєструють на ЯМР спектрометрі, використовуючи 5мм кювети. Сpektри вимірюють при 161,976 MHz, зі спектральною шириною в 64724,9 Hz, 90° шириною імпульсу та затримкою в 4сек. Тринатрієва сіль метилендифосфонієвої кислоти (Sigma) править за стандарт. Всі ³¹Р хімічні зрушення у спектрах співвідносять до сигналу фосфокреатину (ФК), який позначається як 0,0ppm. Межа розподілу між умовно «добре» та «погано» оксигенованими пухлинами складає 1,4 (0,44-5,32) для всіх обстежених хворих, що відповідає медіані вищевказаного співвідношення. У хворих, у пухлинах яких співвідношення РМЕ/Рі < 1,4 пухлини гіпоксичні, тоді як у хворих, у пухлинах яких РМЕ/Рі > 1,4 - пухлини добре оксигеновані. Встановлено, що в групі хворих з значенням РМЕ/Рі < 1,4 мають місце більш негативні показники виживаності.

За розробленою методикою проведено спостереження у 118 хворих на рак шлунка. Критеріями ефективності використаного способу були покращання раннього виявлення рецидивів та/або метастазів пухлини, корекція схем лікування, що призводила до підвищення ефективності терапії.

Прикладами реалізації заявленої корисної моделі можуть вважатися наведені витяги з історій хвороби двох хворих.

1. Хвора А., (Історія хвороби №2384, АК №4849/04п, ПГЗ №8968 - аденокарцинома шлунка, T₃N₀M₀, G3, стадія II). Виконана операція - резекція шлунка за Бальфуром розширена. Під час операції частку видаленої пухлинної тканини не-

гайно занурювали в рідкий азот, в якому її розтирали до порошковидного стану і екстрагували фосфорвмісні речовини розчином холодної 1,2 н НСІО₄ (перхлорної кислоти) Потім рН перхлорного екстракту (ПХЕ) доводили до 7,6-8,0 (дівалентні іони видаляли за допомогою Chelex 10мг/5мл (Sigma, США)), фільтрували, ліофілізували та зберігали при -20°С. Перед реєстрацією спектрів ПХЕ на ³¹Р ЯМР спектрометрі зразки розчиняли в 1,0мл D₂O, центрифугували і переносили в ЯМР пробірки для аналізу.

Сpektри ПХЕ реєстрували на ЯМР спектрометрі, використовували 5мм кювети. Сpektри вимірювали при 161,976 MHz, зі спектральною шириною в 64724,9 Hz, 90° шириною імпульсу та затримкою в 4сек. Тринатрієва сіль метилендифосфонієвої кислоти (Sigma) правила за стандарт. Всі - Р хімічні зрушення у спектрах співвідносили до сигналу фосфокреатину (ФК), який позначається як 0,0ppm.

Співвідношення РМЕ/Рі дорівнювало 1,62 (більше медіани, яка дорівнює 1,4), що вказує на добру оксигенованість пухлини, тобто на відносну відсутність гіпоксії.

За цих умов тривалість життя хворого склала 129 тижнів.

II. Хворий Б., (Історія хвороби №8073, АК №5846/04, ПГЗ №17062 - аденокарцинома шлунка, T₃N₂M₀, G2, стадія ШВ). Виконана операція - резекція шлунка по Більрот-2 в модифікації Гофмейстера-Фігстерера.

Під час операції частку видаленої пухлинної тканини негайно занурювали в рідкий азот, в якому її розтирали до порошковидного стану і екстрагували фосфорвмісні речовини розчином холодної 1,2н НСІО₄ (перхлорної кислоти). Потім рН перхлорного екстракту (ПХЕ) доводили до 7,6-8,0 (дівалентні іони видаляли за допомогою Chelex 10мг/5мл (Sigma, США)), фільтрували, ліофілізували та зберігали при -20°С. Перед реєстрацією спектрів ПХЕ на ³¹Р ЯМР спектрометрі зразки розчиняли в 1,0мл D₂O, центрифугували і переносили в ЯМР пробірки для аналізу.

Сpektри ПХЕ реєстрували на ЯМР спектрометрі, використовували 5мм кювети. Сpektри вимірювали при 161,976MHz, зі спектральною шириною в 64724,9Hz, 90° шириною імпульсу та затримкою в 4сек. Тринатрієва сіль метилендифосфонієвої кислоти (Sigma) правила за стандарт. Всі ³¹Р хімічні зрушення у спектрах співвідносили до сигналу фосфокреатину (ФК), який позначається як 0,0ppm.

Співвідношення РМЕ/Рі дорівнювало 1,2 (менше медіани, яка дорівнює 1,4), що вказує на погану оксигенованість пухлини, тобто на значний рівень гіпоксії. За цих умов тривалість життя хворого склала 75 тижнів.

Джерела інформації:

1. Неред С.Н., Клименков А.А. Хирургическое лечение рака желудка с высоким риском имплантационного метастазирования// Вопросы онкологии. - 2005. - Т.51, №1. - С.75-80.

2. Macdonald J.S., Cervantes A. New horizons for gastric cancer: commentary// Eur. J. Cancer Suppl. - 2006. - Vol.4, №10. - P.1-2.

3. Gastric cancer /V. Catalano, R. Labianca, G. Beretta et al.// Crit. Rev. Oncol. Hematol. - 2005. - Vol.54. - P.209-241.

4. Hoeckel M, Vaupel P. Tumor hypoxia: definitions and current clinical, biologic, and molecular aspects// J. Natl. Cancer Inst. - 2001. - Vol.93. - P.266-276.

5. Eriksen J.G., Horsman M.R. Tumor hypoxia - a characteristic feature with a complex molecular background// Radiother. Oncol. - 2006. - Vol.81. - P.119-121.

6. Correlation between ^{31}P -NMR spectroscopy and tissue O_2 tension measurements in a murine fibrocarcoma /P. Vaupel, P. Okunieff, F. Kallinowski et al.// Radiation Res. - 1989. - Vol.120. - P.477-493.

7. Bussink J., Kaanders J.H.A.M., van der Kogel A.J. Tumor hypoxia at the micro-regional level: clinical relevance and predictive value of exogenous and endogenous hypoxic cell markers// Radiother. Oncol. - 2003. - Vol.67. - P.3-15 (прототип).