



УКРАЇНА

(19) **UA** (11) **102389** (13) **U**

(51) МПК (2015.01)

A61B 8/08 (2006.01)

A61B 10/00

G01N 33/483 (2006.01)

ДЕРЖАВНА СЛУЖБА
ІНТЕЛЕКТУАЛЬНОЇ
ВЛАСНОСТІ
УКРАЇНИ

(12) ОПИС ДО ПАТЕНТУ НА КОРИСНУ МОДЕЛЬ

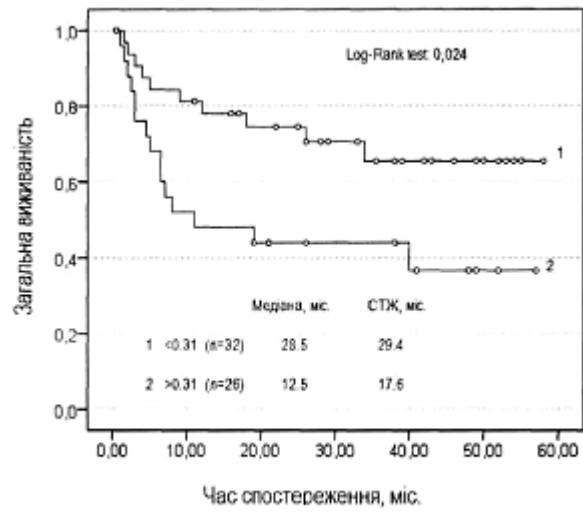
(21) Номер заявки: u 2015 04492	(72) Винахідник(и): Голотюк Володимир Володимирович (UA), Бурлака Анатолій Павлович (UA)
(22) Дата подання заявки: 08.05.2015	
(24) Дата, з якої є чинними права на корисну модель: 26.10.2015	(73) Власник(и): ДЕРЖАВНИЙ ВИЩИЙ НАВЧАЛЬНИЙ ЗАКЛАД "ІВАНО-ФРАНКІВСЬКИЙ НАЦІОНАЛЬНИЙ МЕДИЧНИЙ УНІВЕРСИТЕТ", вул. Галицька, 2, м. Івано-Франківськ, 76000 (UA), ІНСТИТУТ ЕКСПЕРИМЕНТАЛЬНОЇ ПАТОЛОГІЇ, ОНКОЛОГІЇ І РАДІОБІОЛОГІЇ ІМ. Р.Є. КАВЕЦЬКОГО НАН УКРАЇНИ, вул. Васильківська, 45, м. Київ-22, 03022 (UA)
(46) Публікація відомостей про видачу патенту: 26.10.2015, Бюл.№ 20	

(54) СПОСІБ ПРОГНОЗУВАННЯ ЕФЕКТИВНОСТІ КОМБІНОВАНОГО ЛІКУВАННЯ ХВОРИХ НА РАК ПРЯМОЇ КИШКИ ІЗ ВРАХУВАННЯМ СУПЕРОКСИД-ГЕНЕРУЮЧОЇ АКТИВНОСТІ НЕЙТРОФІЛЬНИХ ГРАНУЛОЦИТІВ

(57) Реферат:

Спосіб прогнозування ефективності комбінованого лікування у хворих на рак прямої кишки полягає у визначенні органічних перетворень в крові хворого. З венозної крові хворих виділяють нейтрофільні гранулоцити, в ізоляті яких після отримання пацієнтом останньої фракції неoad'ювантної хіміопроменевої терапії визначають показник швидкості генерування НАДФ·Н-оксидазою супероксидних радикалів, за яким здійснюють прогноз ефективності лікування. Як сприятливий прогностичний фактор виживання хворих з високим рівнем хеморадіочутливості пухлини використовують значення швидкості генерування супероксидних радикалів нейтрофілами менше 0,31 нМ/10⁵ клітин·хв. Фактором негативного прогнозу виживання хворих використовують значення показника більше 0,31 нМ/10⁵ клітин·хв.

UA 102389 U



Фіг. 1

Корисна модель належить до галузі медицини, зокрема до клінічної онкології, і може бути використана для прогнозування ефективності комбінованого лікування хворих на рак прямої кишки (РПК), яке включає неoad'ювантний курс хіміопроменевої терапії (НХПТ) з наступним радикальним хірургічним втручанням.

Традиційно при виборі режимів фракціонування променевої терапії і препаратів для хеморадіомодифікації під час НХПТ хворих на РПК онкологи орієнтуються на клінічні протоколи та результати рандомізованих досліджень, які спрямовані на пошук найбільш ефективних схем лікування. В більшості випадків призначення різноманітних схем НХПТ ґрунтується на рутинних клінічних характеристиках, таких як: локалізація і розміри первинної пухлини, гістологічний тип і ступінь її диференціювання, загальний стан хворого, характер розповсюдження пухлинного процесу [Imyanitov E.N. Molecular-based choice of cancer therapy: realities and expectations / E.N. Imyanitov, V.M. Moiseyenko // Clin. Chim. Acta. - 2007. - Vol. 379, № 1-2. - P. 1-13].

В той же час, генетична та фенотипічна неоднорідність пацієнтів, гістогенетична гетерогенність РПК як нозологічної одиниці, обумовлюють наявність величезної кількості індивідуальних комбінацій факторів, котрі впливають на перебіг зловиясного процесу, зумовлюючи значну варіабельність рівня відповіді на НХПТ у хворих з аналогічними клініко-морфологічними параметрами пухлини [Grady W.M. Genomic and epigenetic instability in colorectal cancer pathogenesis / W.M. Grady, J.M. Carethers // Gastroenterology. - 2008. - Vol. 135, № 4. - P. 1079-1099]. Тому, на сучасному етапі розвитку медицини особливої актуальності набув пошук науково-обґрунтованих підходів до підвищення ефективності комбінованого лікування онкохворих, які б дали змогу поліпшити віддалені результати за рахунок індивідуалізованого підбору терапевтичних схем в залежності від прогностичних маркерів пухлинного процесу, зокрема характеристик клітинних і гуморальних ефекторних ланок імунної системи [Schneider N.I. Prognostic stratification of colorectal cancer patients: current perspectives / N.I. Schneider, C. Langner // Cancer Manag Res. - 2014.- Vol. 2, № 6. - P. 291-300]. За останнє десятиліття з метою прогнозування ефективності лікування хворих на РПК досліджувалися різні прояви протипухлинної імунно-запальної відповіді, серед яких: цитогенетичні ефекти в лімфоцитах периферичної крові, інфільтрація стромы новоутвору еозинофілами і макрофагами, лімфоцитарні інфільтрати, а також ознаки запальних змін в ділянці меж інвазії пухлини. Проте, лише останній параметр із зазначених, при його кількісній оцінці показав певний рівень прогностичної цінності.

В цілому, спільними вадами відомих способів прогнозування ефективності комбінованого лікування хворих на РПК, які пов'язані з параметрами протипухлинного імунітету, є недостатня достовірність прогнозу перебігу захворювання, недостатня дослідженість маркерів, їх відсутність у клінічній діагностиці, складність інтерпретації даних одночасного аналізу багатьох прогностичних факторів.

Найбільш близьким до способу, що заявляється, є спосіб прогнозування перебігу захворювання у хворих на РПК шляхом визначення в операційному матеріалі інтенсивності запальної клітинної реакції в пухлині та довкола її меж за розробленими критеріями, які включають в 4-и ступеневу шкалу, що враховує кількість нейтрофілів і еозинофілів гранулоцитів, лімфоцитів, макрофагів та характер їх взаємодій з клітинами пухлинної паренхіми, при цьому висока активність запальної реакції в ділянці інвазивного краю пухлини у порівнянні з низькою асоціюється з вищим показником 5-річного виживання хворих на РПК [Klintrup K. Inflammation and prognosis in colorectal cancer / K. Klintrup, J.M. Makinen, S. Kauppila et al. // Eur J Cancer. - 2005. - Vol. 41, № 17. - P. 2645-2654].

Однак, цей спосіб є складним у виконанні, представляє можливість отримання достатньої кількості матеріалу пухлини для повноцінного дослідження лише під час операції, тобто через певний час після НХПТ, не враховується функціональний стан досліджуваних імунних клітин, і точність прогнозування є недостатньою.

В основу корисної моделі "Спосіб прогнозування віддалених результатів комбінованого лікування хворих на рак прямої кишки із врахуванням супероксид-генеруючої активності нейтрофілів", що заявляється, поставлено задачу створення способу об'єктивного прогнозування ефективності комбінованого лікування хворих на РПК без ознак генералізації пухлинного процесу шляхом визначення швидкості генерування супероксидних радикалів (COP) нейтрофільними гранулоцитами крові, з формуванням прогнозу перебігу захворювання забезпечити вчасне проведення відповідної корекції лікувальної програми з досягненням максимальних показників виживання хворих.

Поставлена задача вирішується тим, що пропонується спосіб прогнозування ефективності комбінованого лікування хворих на РПК базується на визначенні показника швидкості генерування COP НАДФ·Н-оксидазою ізольованих нейтрофілів крові хворого після отримання

пацієнтом останньої фракції НХПТ, при цьому, згідно з корисною моделлю, з венозної крові хворих виділяють нейтрофільні гранулоцити, в ізоляті яких після отримання пацієнтом останньої фракції неоад'ювантної хіміопроменевої терапії визначають показник швидкості генерування НАДФ-Н-оксидазою супероксидних радикалів, за яким здійснюють прогноз ефективності лікування, при цьому як сприятливий прогностичний фактор виживання хворих з високим рівнем хеморадіочутливості пухлини використовують значення швидкості генерування супероксидних радикалів нейтрофілами менше $0,31 \text{ нМ}/10^5$ клітин·хв, а фактором негативного прогнозу виживання хворих використовують значення показника більше $0,31 \text{ нМ}/10^5$ клітин·хв.

Пропонована оцінка активності систем генерування СОР в нейтрофільних гранулоцитах на системному рівні в онкологічних хворих є сучасним молекулярно-біологічним показником, який не вимагає безпосереднього забору матеріалу новоутвору і надає можливість прогнозування реакції пухлини на цитостатичні впливи до моменту остаточної реалізації морфологічних проявів лікувального патоморфозу, що є основною перевагою запропонованого методу.

Визначення наведеним способом прогнозу ефективності лікування базується на оцінці рівня продукції СОР нейтрофільними гранулоцитами периферичної крові на фоні впливу на пухлину іонізуючого випромінювання в поєднанні з агентами хеморадіомодифікації. Генерування СОР нейтрофілами відбувається після активації ферменту НАДФ-Н-оксидази шляхом взаємодії цитозольних компонентів (p47phox, p67phox, p40phox та Rac 2) з мембранним флавоцитохромом b558 (gp91phox та p22phox). Сформований таким чином багатокomпонентний білковий комплекс транспортує електрони на молекулярний кисень з утворенням СОР у високих локальних концентраціях. Високореактивний супероксидний аніон-радикал відіграє роль сигнальної молекули, яка, впливаючи на компоненти пухлини у відповідних концентраціях, має здатність індукувати її прогресію через стимуляцію ремоделювання і деградацію міжклітинного матриксу, зниження міжклітинних взаємодій, активацію процесів проліферації, неоангіогенезу та метастазування. В свою чергу, змінений міжклітинний матрикс новоутвору вивільняє вбудовані фактори росту, серед яких основним є фактор росту фібробластів (потужний фактор ангіогенезу), що є не тільки хемоатрактантом нейтрофілів крові та індуктором генерування СОР та оксиду азоту, але і фактором росту для ендотеліальних клітин. Оскільки нейтрофіли після екстравазації мігрують через ремодельований міжклітинний матрикс і створюють канали між сайтами екстравазації у прилеглий чи задіяний тканині, цей процес може бути промотором міграції ендотеліальних клітин під час закладки нових судин. Такі зміни сприяють посиленню міграції та подальшій активації нейтрофілів та притоку нових імунних клітин, котрі посилюють окисний вплив та вплив на каскад "запалення". Супероксидні радикали, які продукуються нейтрофілами, впливають на пухлину, активуючи транскрипційний фактор NF- κ B, і підвищують ймовірність того, що клітини новоутвору виживуть, будуть рости, прогресувати та формувати метастатичний фенотип. Окрім цього СОР у високих концентраціях мають здатність зв'язувати молекули оксиду азоту, формуючи пероксинітрит, а також блокувати функціональну активність індукцибельної синтази оксиду азоту. Це може мати негативний вплив на ефективність НХПТ, оскільки відомо, що під час променевої терапії молекули оксиду азоту в зоні опромінення проявляють радіопотенціюючі властивості через стимуляцію процесів апоптозу онкоцитів.

Таким чином, високий показник синтезу НАДФ-Н-оксидазою нейтрофілів крові СОР є несприятливою прогностичною ознакою виживання хворих на РПК після проведення комбінованого лікування, оскільки вони несуть високий мутаційний потенціал, посилюють прогресію та метастатичний потенціал пухлин і знижують цитостатичну ефективність НХПТ.

Спосіб, що заявляється, забезпечує точний прогноз клінічної ефективності комбінованого лікування хворих на РПК, що дасть можливість покращити лікування цього надзвичайно складного контингенту хворих шляхом своєчасної корекції терапевтичної програми, таким чином сукупністю відомих і запропонованих суттєвих ознак створено комплексне технічне рішення, достатнє для виконання поставленої задачі корисної моделі.

Спосіб прогнозування ефективності комбінованого лікування у хворих на РПК здійснюють наступним чином.

Нейтрофіли виділяють з венозної крові на 3 %-ому розчині трилону Б на градієнті щільності фікол/верографін. Для запобігання активації нейтрофілів під час виділення всі маніпуляції проводять при 4° C . Спочатку створюють подвійний градієнт фікол-верографіну: першим в пробірку вносять розчин фікол-верографіну, що має щільність $\rho=1,119 \text{ г/см}^3$, потім на нього акуратно нашаровують розчин фіколу з щільністю $\rho=1,077 \text{ г/см}^3$. Кров на 3 %-ому розчині трилону Б нашаровують на подвійний градієнт фікол-верографіну, центрифугують 45 хв при 400 g. Після центрифугування отримують кільця моонуклеарних клітин (верхнє) і нейтрофілів (нижнє), в осаді перебувають еритроцити. Отримане кільце моонуклеарів видаляють.

Нейтрофільне кільце відбирають і переносять в чисту пробірку з середовищем, позбавленим іонів Ca^{2+} і Mg^{2+} . Клітини двічі відмивають і центрифугують 10 хв при 200 g. Присутні еритроцити лізують. Вміст нейтрофілів в отриманій клітинній суспензії становить близько 95 %.

Дослідження супероксид-генеруючої активності НАДФ-Н-оксидази нейтрофілів проводять на комп'ютеризованому радіоспектрометрі електронного парамагнітного резонансу при кімнатній температурі з використанням спінового уловлювача 1-гідрокси-2,2,6,6-тетраметил-4-оксипіперидину при кімнатній температурі.

Межа розподілу між умовно "сприятливим" та "несприятливим" рівнями швидкості генерування супероксидних радикалів ізольованими нейтрофілами крові складає $0,31 \text{ нМ}/10^5$ клітин·хв. Зокрема, значення швидкості генерування СОР нейтрофілами менше $0,31 \text{ нМ}/10^5$ клітин·хв. вважають сприятливим прогностичним фактором, який свідчить про високу чутливість хворих на РПК до застосованого комбінованого лікування і дозволяє спрогнозувати високі показники виживання хворих, в той час як фактором негативного прогнозу виживання хворих є показник більше $0,31 \text{ нМ}/10^5$ клітин·хв.

Ефективність комбінованого лікування оцінювали на основі інформації про раково-специфічне виживання 58 хворих упродовж 5 років після завершення лікування, яка відображена на кресленні, де на поз. 1 наведена крива виживання хворих, у яких швидкість генерування СОР менше $0,31 \text{ нМ}/10^5$ клітин·хв.; 2 - крива виживання хворих, у яких цей показник перевищує $0,31 \text{ нМ}/10^5$ клітин·хв (оцінка за Капланом-Мейєром, $p < 0,024$).

Приклад.

1. Хвора Г. (історія хвороби № 3194, аденокарцинома прямої кишки, T2N0M0G2R0), стадія I), якій проведено неoad'ювантний курс дистанційної гамма-терапії на ділянку пухлини до сумарної дози 36 Гр (разова доза - 3 Гр, 12 сеансів) на фоні потенціювання фторафуром. Через 4 тижні виконали операцію з видалення пухлини. ПГЗ № 18609-12 від 02.10.2009 р - помірнодиференційована аденокарцинома із виразкуванням, інвазією в м'язовий шар та ознаками лікувального патоморфозу III ступеня. Протяжність новоутвору зменшилась від 10 до 5 см. Показник супероксид-генеруючої активності НАДФ-Н-оксидази нейтрофілів після курсу НХПТ - $0,42 \text{ нМ}/10^5$ клітин·хв. Хвора померла 10.06.2013 від прогресування хвороби. Тривалість життя з моменту початку лікування - 3 роки 10 місяців.

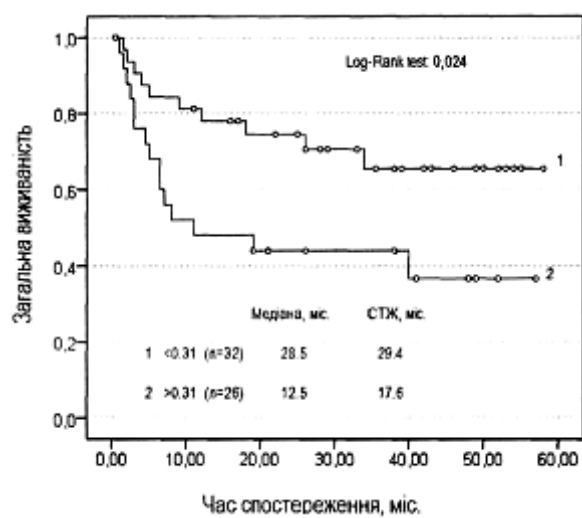
2. Хвора З. (історія хвороби № 2533, аденокарцинома прямої кишки, T3N0M0G2R0, стадія IIA), якій проведено неoad'ювантний курс дистанційної гама-терапії на ділянку пухлини до сумарної дози 39 Гр (разова доза - 3 Гр, 13 сеансів). Через 4 тижні виконали операцію з видалення пухлини. ПГЗ № 9528-34 від 05.06.2008 - помірнодиференційована аденокарцинома із інвазією до жирової клітковини та ознаками лікувального патоморфозу II ступеня. Протяжність новоутвору зменшилась від 5 до 4 см. Показник супероксид-генеруючої активності НАДФ-Н-оксидази нейтрофілів після курсу НХПТ - $0,26 \text{ нМ}/10^5$ клітин·хв. Станом на 15.01.2015 хвора перебуває під спостереженням. Тривалість життя з моменту початку лікування - 6 років 9 місяців.

Клінічну апробацію способу проведено на базі курсу онкології ДВНЗ "Івано-Франківський національний медичний університет". Дослідження проведені у 58 хворих на РПК. Продемонстровано, що спосіб точний, високоінформативний, пов'язаний з невеликими матеріальними витратами для його виконання, що свідчить про можливість широкого використання його в клінічній практиці.

Використання пропонованого способу прогнозування ефективності комбінованого лікування у хворих на РПК забезпечує вчасне проведення відповідної корекції лікувальної програми з досягненням максимальних показників виживання хворих.

ФОРМУЛА КОРИСНОЇ МОДЕЛІ

Спосіб прогнозування ефективності комбінованого лікування у хворих на рак прямої кишки, що полягає у визначенні органічних перетворень в крові хворого, який **відрізняється** тим, що з венозної крові хворих виділяють нейтрофільні гранулоцити, в ізоляті яких після отримання пацієнтом останньої фракції неoad'ювантної хіміопроменевої терапії визначають показник швидкості генерування НАДФ-Н-оксидазою супероксидних радикалів, за яким здійснюють прогноз ефективності лікування, при цьому як сприятливий прогностичний фактор виживання хворих з високим рівнем хеморадіочутливості пухлини використовують значення швидкості генерування супероксидних радикалів нейтрофілами менше $0,31 \text{ нМ}/10^5$ клітин·хв, а фактором негативного прогнозу виживання хворих використовують значення показника більше $0,31 \text{ нМ}/10^5$ клітин·хв.



Комп'ютерна верстка А. Крулевський

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

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