



УКРАЇНА

(19) **UA** (11) **98658** (13) **U**
(51) МПК (2015.01)
A61B 8/08 (2006.01)
A61B 10/00

ДЕРЖАВНА СЛУЖБА
ІНТЕЛЕКТУАЛЬНОЇ
ВЛАСНОСТІ
УКРАЇНИ

(12) ОПИС ДО ПАТЕНТУ НА КОРИСНУ МОДЕЛЬ

(21) Номер заявки: u 2014 07957	(72) Винахідник(и): Голотюк Володимир Володимирович (UA), Бурлака Анатолій Павлович (UA), Лукін Сергій Миколайович (UA), Вовк Анастасія Вікторівна (UA)
(22) Дата подання заявки: 14.07.2014	
(24) Дата, з якої є чинними права на корисну модель: 12.05.2015	
(46) Публікація відомостей про видачу патенту: 12.05.2015, Бюл.№ 9	(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)

(54) СПОСІБ ПРОГНОЗУВАННЯ ЕФЕКТИВНОСТІ ПРОМЕНЕВОЇ ТЕРАПІЇ У ХВОРИХ НА РАК ПРЯМОЇ КИШКИ**(57) Реферат:**

Спосіб прогнозування ефективності променевої терапії (ПТ) у хворих на рак прямої кишки, що полягає у визначенні органічних перетворень та змін в біопсійному матеріалі хворого, причому біопсійний матеріал хворого перетворюють на гомогенат, в ньому визначають швидкість генерування супероксидних радикалів, і додатково в добовій сечі хворого двічі визначають рівень маркера окисного пошкодження ДНК у нмолях 8-оксогуаніну (8-охоG) - до початку ПТ і через добу після отримання хворими першої фракції опромінення, за якими здійснюють прогноз ефективності ПТ, при цьому я сприятливі прогностичні фактори, які свідчать про рівень радіочутливості пухлини, використовують значення швидкості генерування супероксидних радикалів клітинами пухлини до лікування більше 1,0 нМоль/хв•г сирової тканини, низький рівень добової екскреції 8-охоG з сечею до лікування - менше 0,5 нМоль/доба•кг маси тіла, і зростання рівня показника 8-охоG в сечі хворого через добу після початку ПТ на 50% і більше відносно вихідного рівня, з урахуванням яких при відсутності жодного сприятливого фактора діагностують прогноз ефективності ПТ негативний, при наявності 1-2 факторів передбачають помірну ефективність лікування, при наявності всіх трьох факторів прогнозують високу ефективність ПТ.

UA 98658 U

Корисна модель належить до галузі медицини, зокрема до клінічної онкології, і може бути використана для прогнозування індивідуальної променевої реакції пухлини на дію дистанційної гама-терапії у хворих на рак прямої кишки (РІЖ).

На сьогоднішній день особливої актуальності набув пошук науково-обґрунтованих підходів до підвищення ефективності неoad'ювантного лікування онкохворих, які б дали змогу поліпшити безпосередній клінічний та патоморфологічний ефект променевої терапії (ПТ) за рахунок індивідуалізованого підбору схем лікування в залежності від прогностичних молекулярно-біологічних маркерів пухлинного процесу. Незважаючи на тривалу історію досліджень, вибір адекватних і високоінформативних біомаркерів, використання яких забезпечило би перспективне прогнозування відповіді пухлини на цитотоксичну, зокрема променеву терапію, залишається проблематичним.

Відомо, що сучасна протипухлинна терапія хворих на РПК має емпіричний характер призначення. На сьогоднішній день відсутні абсолютні ознаки чутливості чи резистентності пухлини до цитостатиків і ПТ. Призначення ПТ в різних сумарних вогнищевих дозах і режимах фракціонування 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].

Визначення тактики до- і після проведення радикальної операції, а також при дисемінації пухлинного процесу, безсумнівно, ускладнює відсутність надійних прогностичних факторів ефективності лікування, а вибір тієї чи іншої схеми терапії на сьогоднішній день все ще здебільшого базується на даних доклінічних і клінічних випробувань та особистому досвіді лікаря [Garajova I. Neoadjuvant treatment in rectal cancer: actual status /1, Garajova, S. Di Girolamo, F. de Rosa [et al.] // Chemother Res Pract-2011.- Vol. 2011, Article ID 839742, 12 p.].

Додатковою складністю в цій проблемі є використання протоколів, які визначають стратегію лікування на основі локалізації пухлини, та не беруть до уваги біологічні особливості пухлини й організму в цілому. Для прогнозування клінічного ефекту у відповідь на застосовану ПТ у хворих на РІЖ вивчалися молекулярні маркери в пухлинній тканині: p53, p21, Ki-67, bax/bcl-2, epidermal growth factor receptor (EGFR). Проте, лише останній із зазначених, при його кількісній оцінці показав певний рівень прогностичної цінності.

В цілому, спільними недоліками відомих способів прогнозування ефективності ПТ хворих на РІЖ є недостатня достовірність прогнозу перебігу захворювання, недостатня дослідженість пухлинних маркерів, їх відсутність у клінічній діагностиці, складність інтерпретації даних одночасного аналізу багатьох прогностичних факторів, висока вартість обладнання та обстеження.

Найбільш близьким до способу, що заявляється, є спосіб прогнозування перебігу захворювання у хворих на місцево-поширений РІЖ шляхом визначення в біопсійному матеріалі EGFR, згідно якого імуногістохімічно визначають до початку ПТ позитивну експресію EGFR, яка є індикатором слабкої відповіді пухлини на ПТ і низьких термінів безрецидивного виживання [Giralt J. The expression of epidermal growth factor receptor results in a worse prognosis for patients with rectal cancer treated with preoperative radiotherapy: A multicenter, retrospective analysis / J. Giralt, M. de las Heras, L. Cerezo, [et al.] // Radiother Oncol.- 2005.- Vol. 74.- 101-108].

Однак, цей спосіб є високовартісним, складним у виконанні, при цьому точність прогнозування є недостатньою.

В основу корисної моделі "Спосіб прогнозування ефективності променевої терапії у хворих на рак прямої кишки" поставлено задачу створення способу об'єктивного прогнозування ефективності неoad'ювантного курсу ПТ у хворих на РІЖ без ознак генералізації пухлинного процесу шляхом визначення швидкості генерування супероксидних радикалів клітинами пухлини в біопсійному матеріалі та рівнів окисного пошкодження ДНК у добовій сечі, з оцінкою фундаментальних зрушень в організмі хворих та формуванням прогнозу перебігу захворювання, щоби забезпечити вчасне проведення відповідної корекції лікувальної програми з досягненням максимального ступеня лікувального патоморфозу новоутвору.

Поставлена задача вирішується тим, що спосіб прогнозування ефективності ПТ при лікуванні хворих на РІЖ базується на визначенні швидкості генерування супероксидних радикалів в гомогенаті біопсійного матеріалу хворого і дворазовому визначенні в добовій сечі хворого рівня маркера окисного пошкодження ДНК у нМолях 8-оксогуаніну (8-охоG) - до початку ПТ і через добу після отримання пацієнтом першої фракції опромінення, за якими здійснюють прогноз ефективності ПТ, при цьому як сприятливі прогностичні фактори, які свідчать про рівень радіочутливості пухлини, використовують значення швидкості генерування супероксидних

радикалів клітинами пухлини до лікування більше 1,0 нМоль/хвт сирової тканини, низький рівень добової екскреції 8-охоG з сечею до лікування - менше 0,5 нМоль/доба-кг маси тіла, і зростання рівня показника 8-охоG в сечі хворого через добу після початку ПТ на 50 % і більше відносно вихідного рівня, з урахуванням яких при відсутності жодного сприятливого фактора діагностують прогноз ефективності ПТ негативний, при наявності 1-2 факторів передбачають помірну ефективність лікування, при наявності всіх трьох факторів прогнозують високу ефективність ПТ.

Пропонована оцінка активності систем генерування супероксидних радикалів у тканині пухлини і швидкості окисного пошкодження ДНК на системному рівні в онкологічних хворих є сучасним інтегральним показником, який дає можливість проспективного прогнозування чутливості новоутвору до цитостатичного впливу, що є основною перевагою запропонованого методу.

Визначення наведеним способом прогнозу ефективності лікування базується на оцінці стану систем генерування супероксидних радикалів, інтенсивності їх пошкоджуючого впливу на генетичний апарат клітин в синергії з дією іонізуючого випромінювання та визначенні ефективності систем репарації ДНК. Основним джерелом 8-охоG в позаклітинному просторі є клітини, які, руйнуючись шляхом апоптозу чи некрозу, вивільняють окисно-модифіковану ДНК, поповнюючи її екстрацелюлярний пул. Крім цього фрагменти ДНК, які містять 8-охоG, можуть активно екскретуватися життєздатними клітинами внаслідок ферментативної репарації пошкоджень ДНК, в тому числі через нуклеозидний шлях та ексцизію з ДНК глікозилазами. Таким чином, низький рівень добової екскреції 8-охоG з сечею до лікування хворих відображає низьку ефективність систем репарації ДНК і є підґрунтям для високої радіочутливості тканин. Суттєве підвищення екскреції 8-охоG через добу після початку лікування свідчить про високий рівень променевого пошкодження тканин в зоні опромінення на фоні масивного вільнорадикального пошкодження генетичного апарату клітин.

Спосіб, що заявляється, забезпечує точний прогноз клінічної ефективності неoad'ювантного курсу ПТ хворих на РІЖ, що дасть можливість покращити лікування цього надзвичайно складного контингенту хворих, таким чином сукупністю відомих і запропонованих суттєвих ознак створено комплексне технічне рішення, достатнє для виконання поставленої задачі корисної моделі.

Спосіб прогнозування ефективності ПТ у хворих на РПК здійснюють наступним чином.

100 мг пухлинної тканини з біопсійного матеріалу хворого швидко (15 с) гомогенізують на льоду в скляному гомогенізаторі з додаванням 2,0 мл фосфатного буфера з pH = 7,4. Отриманий гомогенат пухлини фільтрують через два шари марлі, додають 20 μМоль спінового уловлювача 5.5-dimethyl-1-pyrroline N-oxide (виробництва фірми Sigma) і реєструють швидкість генерування супероксидних радикалів на комп'ютеризованому радіоспектрометрі електронного парамагнітного резонансу при кімнатній температурі.

Рівень окисного пошкодження ДНК у хворого досліджують, визначаючи маркер 8-охоG в добовій сечі до початку ПТ і через добу після отримання хворими першої фракції ПТ. Для цього 20 мл добової сечі фільтрують через фільтрувальний папір та пропускають через колонку для твердофазної екстракції 8-охоG. Визначення кількісного рівня окисного пошкодження ДНК в організмі хворого проводять методом оптичної спектрофотометрії на спектрофотометрі СФ-46 з реєстрацією поглинання при 250, 260, 280 і 293 нм. Рівень утворення 8-охоG в клітинах організму визначають за формулою:

$$R_{\text{ex}} = \frac{V \cdot \sum(C_1 \cdot V_1)}{V_{\text{app}} \cdot W} \text{ (нМоль/доба} \cdot \text{кг маси тіла),}$$

де V - загальний об'єм сечі, мл; V₁ - об'єм сечі, з якого виділяють оксидномодифікований

гуанін, мл; $R_{\text{ex}} = \frac{V \cdot \sum(C_1 \cdot V_1)}{V_{\text{app}} \cdot W}$ - об'єм сечі, який аналізують на колонці, мл; W - маса тіла, кг;

C₁ - концентрація 8-охоG.

Межа розподілу між умовно "сприятливим" та "несприятливим" рівнями швидкості генерування супероксидних радикалів в пухлині складає 1,0 нМоль/хв·г сирової тканини (діапазон можливих значень 0,5-4,0) та 8-охоG в сечі до лікування - 0,5 нМоль/доба·кг маси тіла (діапазон можливих значень 0,3-6,0) для всіх обстежених хворих, що відповідає медіані для кожного вищевказаного співвідношення. Зростання рівня показника 8-охоG в сечі хворого через добу після початку ПТ на 50 % і більше відносно вихідного рівня є позитивним прогностичним фактором, на противагу зниженню екскреції 8-охоG або ж підвищенню рівня показника менш ніж на 50 %.

Встановлено, що при відсутності жодного сприятливого фактора прогноз ефективності ПТ негативний. При наявності 1-2 факторів передбачається помірна ефективність лікування. При наявності всіх трьох сприятливих факторів прогнозується висока ефективність ПТ.

Ефективність неoad'ювантного курсу ПТ оцінювали через місяць після його закінчення, враховуючи при цьому зміну розмірів, рухомості пухлини і ступінь лікувального патоморфозу під час патогістологічного дослідження операційного матеріалу.

Приклад.

1. Хвора Б. (історія хвороби № 1400, аденокарцинома прямої кишки, $T_4N_0M_0G_2$, стадія IIB), 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 №5210-6 - ознаки лікувального патоморфозу IV ступеня з повною резорбцією пухлини, різко виражений склероз. Протяжність новоутвору зменшилась від 7 до 3 см. Рівень швидкості генерування супероксидних радикалів клітинами пухлини склав 3,55 нМоль/хв*г сирової тканини. Рівень добової екскреції 8-охоГ з сечею до лікування - 0,5 нМоль/доба*кг маси тіла; зростання рівня показника 8-охоГ в сечі хворого через добу після початку ПТ склало 57 % відносно вихідного рівня.

2. Хворий М. (історія хвороби № 3405, аденокарцинома прямої кишки, $T_2N_0M_0G_2$, стадія IIA), якому 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 №12017-27 - помірнодиференційована аденокарцинома із виразкуванням, інвазією в м'язовий шар та ознаками лікувального патоморфозу II-III ступеня. Протяжність новоутвору зменшилась від 6 до 4 см. Рівень швидкості генерування супероксидних радикалів клітинами пухлини - 1,85 нМоль/хв*г сирової тканини. Рівень добової екскреції 8-охоГ з сечею до лікування - 2,7 нМоль/доба*кг маси тіла; зростання рівня показника 8-охоГ в сечі хворого через добу після початку ПТ становило 17 % відносно вихідного рівня.

3. Хворий Ш. (історія хвороби № 603, ПГЗ № 17062 - аденокарцинома прямої кишки, $T_2N_0M_0G_2$, стадія IIA), якому проведено неoad'ювантний курс дистанційної гама-терапії на ділянку пухлини до сумарної дози 39 Гр (разова доза - 3 Гр, 13 сеансів). Через 4 тижні виконана операція з видалення пухлини. ПГЗ №2287-98 - помірнодиференційована аденокарцинома із виразкуванням у центрі. У дні виразкування - поодинокі ракові комплекси з явищами патоморфозу I ст., інвазія даних комплексів до середини м'язової оболонки. Протяжність новоутвору залишилась без змін. Рівень швидкості генерування супероксидних радикалів клітинами пухлини - 0,95 нМоль/хв*г сирової тканини. Рівень добової екскреції 8-охоГ з сечею до лікування - 2,9 нМоль/доба*кг маси тіла; зростання рівня показника 8-охоГ в сечі хворого через добу після початку ПТ становило 5 % відносно вихідного рівня.

Клінічну апробацію способу проведено на базі курсу онкології ДВНЗ "Івано-Франківський національний медичний університет". Дослідження проведені у 29 хворих на РІЖ. 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 ПТ у хворих на РПК забезпечує вчасне проведення відповідної корекції лікувальної програми з досягненням максимального ступеня лікувального патоморфозу новоутвору.

ФОРМУЛА КОРИСНОЇ МОДЕЛІ

Спосіб прогнозування ефективності променевої терапії (ПТ) у хворих на рак прямої кишки, що полягає у визначенні органічних перетворень та змін в біопсійному матеріалі хворого, який **відрізняється** тим, що біопсійний матеріал хворого перетворюють на гомогенат, в ньому визначають швидкість генерування супероксидних радикалів, і додатково в добовій сечі хворого двічі визначають рівень маркера окисного пошкодження ДНК у нмолях 8-оксогуаніну (8-охоГ) - до початку ПТ і через добу після отримання хворими першої фракції опромінення, за якими здійснюють прогноз ефективності ПТ, при цьому як сприятливі прогностичні фактори, які свідчать про рівень радіочутливості пухлини, використовують значення швидкості генерування супероксидних радикалів клітинами пухлини до лікування більше 1,0 нМоль/хв*г сирової тканини, низький рівень добової екскреції 8-охоГ з сечею до лікування - менше 0,5 нМоль/доба*кг маси тіла, і зростання рівня показника 8-охоГ в сечі хворого через добу після початку ПТ на 50% і більше відносно вихідного рівня, з урахуванням яких при відсутності жодного сприятливого фактора діагностують прогноз ефективності ПТ негативний, при наявності 1-2 факторів

передбачають помірну ефективність лікування, при наявності всіх трьох факторів прогнозують високу ефективність ПТ.

Комп'ютерна верстка Г. Паяльніков

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