



УКРАЇНА

(19) **UA** (11) **51093** (13) **U**
(51) МПК (2009)
G01N 33/68

МІНІСТЕРСТВО ОСВІТИ
І НАУКИ УКРАЇНИ

ДЕРЖАВНИЙ ДЕПАРТАМЕНТ
ІНТЕЛЕКТУАЛЬНОЇ
ВЛАСНОСТІ

ОПИС ДО ПАТЕНТУ НА КОРИСНУ МОДЕЛЬ

видається під
відповідальність
власника
патенту

(54) СПОСІБ ВИЗНАЧЕННЯ ЧУТЛИВОСТІ ХВОРИХ НА ПОШИРЕНИЙ РАК ШЛУНКА ДО ПОЛІХІМІОТЕРАПІЇ

1

2

(21) u201003150

(22) 19.03.2010

(24) 25.06.2010

(46) 25.06.2010, Бюл. № 12, 2010 р.

(72) ЩЕПОТІН ІГОР БОРИСОВИЧ, ЛУКАШЕНКО
АНДРІЙ ВОЛОДИМИРОВИЧ, МЕЛЬНИК МИКОЛА
МИКОЛАЙОВИЧ, БУРЛАКА АНТОН АНАТОЛІЙО-
ВИЧ, ПРИЙМАК ВІКТОР ВАСИЛЬОВИЧ, ВАСИЛЬ-
ЄВ ОЛЕГ ВАЛЕНТИНОВИЧ, РОЗУМІЙ ДМИТРО
ОЛЕКСАНДРОВИЧ, ЖУКОВ ЮРІЙ ОЛЕКСАНДРО-
ВИЧ

(73) НАЦІОНАЛЬНИЙ МЕДИЧНИЙ УНІВЕРСИТЕТ
ІМЕНІ О.О. БОГОМОЛЬЦЯ, НАЦІОНАЛЬНИЙ ІН-
СТИТУТ РАКУ

(57) Спосіб визначення чутливості хворих на по-
ширений рак шлунка до поліхіміотерапії, що пе-
редбачає імуногістологічне дослідження біопсійно-
го матеріалу, який **відрізняється** тим, що
одночасно визначають наявність експресії марке-
рів bcl-1, p-53, VEGF та рівень молекулярного мар-
кера 8-oxodGu в добовій сечі методом фільтрації
та спектрофотометрії і при відсутності експресії
та спектрофотометрії проапоптичного білка p-53, ан-
тиапоптичного білка bcl-1, активній експресії фак-
тора неоваскуляризації VEGF, швидкості екскреції
8-oxodGu, яка не перевищує фізіологічний рівень,
визначають чутливість хворих на поширений рак
шлунка до поліхіміотерапії.

Корисна модель, що заявляється, належить до
медицини, а саме до онкології, і може бути вико-
ристана з метою прогнозування ефективності нео-
адьювантної полі хіміотерапії (ПХТ) у хворих на
поширені форми раку шлунка.

Як відомо, активація проапоптотичного білка
p53 призводить до генетичних порушень та блоку-
вання клітинного циклу, зупиняючи його у фазі G1.
При виникненні мутацій у гені p53 кодований ним
білок втрачає здатність нормально виконувати
свої функції, що призводить до неконтрольованого
росту пухлин (1).

Білок bcl-2 походить із родини регуляторів
апоптозу, він володіє сильною антиапоптотичною
дією, оскільки має здатність зв'язувати принаймні
п'ять інших білків цієї родини, які виконують проа-
поптотичні функції. Запуск цього механізму приз-
водить до порушення формування мітохондріаль-
них пор та блокує вихід з мітохондрій цитохрому та
APAF-1, які активують каспазу-9 і ініціюють апоп-
тоз. Така активність bcl-2 зумовлює виживання
пухлинних клітин при застосуванні протипухлинних

препаратів, дія яких спрямована на активацію апо-
птозу (2).

Розвиток нової судинної сітки відбувається під
впливом ангіогенного фактору росту VEGF-A, ос-
тання декретується клітинами пухлини та його
роль в неоангіогенезі є доведеною. На даний мо-
мент сімейство VEGF нараховує 6 факторів росту.
Фактори росту сімейства VEGF взаємодіють із сво-
їми рецепторами VEGFR ініціюючи міграцію, про-
ліферацію та диференціювання клітин ендотелію
(3).

Білки p-53 та bcl-2 підвищують хіміорезистент-
ність пухлинної клітини шляхом захисту її від апо-
птозу, індукованого такими протипухлинними пре-
паратами як інгібітори топоізомери, ан-
тиметаболіти та інші (4, 5). Концентрація енд-
отеліального фактору росту судин (VEGF) корелює
із ступенем судинного забезпечення пухлини, що
безпосередньо впливає на ефективність доставки
хіміопрепарату до клітин пухлини^[1]. 8-oxodGu (8-
оксодезоксигуанозин) - маркер швидкості пошко-
дження ДНК, він свідчить про рівень пошкодження

(13) **U**

(11) **51093**

(19) **UA**

ДНК, ступінь індукованої нестабільності функціонування геному та деградації міжклітинного матриксу (6-8).

Найбільш близьким по суті до способу, що застосовується, та прийнятим за прототип є спосіб визначення чутливості пухлин до поліхіміотерапії, який потребує використання імуногістохімічного методу визначення глутатіон S-трансферази в біоптаті тканини пухлини шлунка (2). Однак недоліком цього способу є його низька достовірність через використання підходу оцінки детоксикації радикальних форм кисню, зокрема перекису водню, тільки однією ферментною системою. Крім того, при застосуванні даного способу можливе визначення чутливості пухлини лише до препаратів платини, тоді як схема ECF поліхіміотерапії згідно стандартів України включає (епірубіцин 40мг/м² в 1-й день, цисплатин 40мг/м² в 2-й день, 5-ФУ 425мг/м² 1-4 дні), що робить дану методику малоінформативною та обмежує можливість визначення чутливості до поліхіміотерапії пухлини раку шлунка.

Застосування цього способу потребує використання імуногістохімічного методу визначення глутатіон S-трансферази в тканині пухлини шлунка.

Задача, яку вирішує спосіб, що заявляється, полягає у застосуванні індивідуалізованого підходу при лікуванні пацієнтів з діагнозом раку шлунка за рахунок додаткового лабораторного обстеження.

Технічний результат - покращення результатів лікування.

Поставлена задача досягається тим, що у відомому способі, що передбачає імуногістологічне дослідження біопсійного матеріалу, згідно корисної моделі, одночасно визначають наявність експресії маркерів bcl-1, p-53, VEGF та рівень молекулярного маркера 8-oxodGu в добовій сечі методом фільтрації та спектрофотометрії і при відсутності експресії в тканинах пухлини проапоптичного білка p-53, антиапоптичного білка bcl-1, активній експресії фактора неоваскуляризації VEGF, швидкості екскреції 8-oxodGu, яка не перевищує фізіологічний рівень, визначають чутливість хворих на поширений рак шлунка до поліхіміотерапії.

Суть способу полягає в тому, що після стандартних методів обстеження та гістологічного підтвердження діагнозу, проводилось імуногістохімічне дослідження біопсійного матеріалу на наявність експресії маркерів bcl-1, p-53, VEGF. Так, використовуючи матеріал біопсії хворих на рак шлунку (гістопрепарати гематоксилін-еозин), визначали антигенний та рецепторний статусу пухлин хворих на рак шлунка із застосуванням імуногістохімічного дослідження за стандартною методикою. Як первинні антитіла були застосовані моноклональні антитіла (мкАТ): Monoclonal Mouse Antibody to Human p53 Protein Clone DO-7, ready-to-use, Dako), Monoclonal Mouse Antibody to Human BCL Oncoprotein Clone 124, ready-to-use, Dako), полік-

лональне антитіло Flt-1/VEGFRI (Clon Ab-1, ready-to-use, Lab Vision). Для виявлення антигенних детермінант зрізи обробляли в Target Retrieval Solution (Dako) впродовж 30 хвилин при 96°C. Для візуалізації реакції антиген-антитіло була застосована візуалізаційна система Dual link EnVision (Dako), хромоген AEC+Substrate-Chromogen (ready-to-use, Dako). Після постановки імуногістохімічної реакції зрізи дофарбовувались гематоксиліном Мейєра і заключались в середовище Faramount Aqueous Medium.

Спосіб здійснюється наступним чином: Згідно із імуногістохімічним фенотипом та рівнем окисно-індукованих точкових мутацій, пацієнти розподілені на 3 групи:

I. Група високої чутливості до хіміотерапії (ВІЧ) - відсутність експресії в тканинах пухлини проапоптичного білка p-53, антиапоптичного білка bcl-1, активній експресії фактору неоваскуляризації VEGF, швидкості екскреції 8-oxodGu, яка не перевищує фізіологічний рівень;

II. Група низької чутливості до хіміотерапії (НЧ) - відсутність експресії p-53, bcl-1, VEGF, підвищений рівень екскреції 8-oxodGu (до 7,0нМоль/доба·кг маси тіла);

III. Група із відсутністю чутливості до хіміотерапії (ВІЧ) - наявність експресії p-53, bcl-1, відсутність фактору VEGF та високий рівень екскреції 8-oxodGu (>7,0нМоль/доба·кг маси тіла).

Суть способу підтверджується прикладом конкретного виконання.

Пацієнт Л. 54р. поступив у відділення із діагнозом - рак нижньої третини шлунка Т3NхM0 стадія II. Ускладнення - субкомпенсований стеноз вихідного відділу шлунка. Було проведено визначення імуногістохімічного фенотипу, серологічних маркерів оксигенації та рівня окисного пошкодження ДНК. Пацієнт був віднесений до групи ВІЧ. В неоад'ювантному режимі було проведено 2 курси поліхіміотерапії за схемою FLEP. Була виконана комп'ютерна томографія до та після ПХТ, відмічалось зменшення інфільтративних змін в стінці шлунка. Була виконана ФЕГДС (після проведеного лікування відбулась часткова регресія пухлини), при повторному взятті біопсії та гістологічному дослідженні спостерігався терапевтичний патоморфоз (виражені дистрофічні та некробіотичні зміни пухлини, клітини пухлини із дистрофічними змінами розташовані в сполучній тканині із міксоматозом.) Надалі була виконана дистальна субтотальна резекція шлунка із лімфаденектомією в об'ємі D2a. Пацієнт виписаний у задовільному стані на 7 добу після операції.

Клінічна апробація даного методу проведена на базі відділення пухлин органів черевної порожнини та заочеревинного простору Національного інституту раку у період 2008-2009рр. проведено лікування, з використанням даного підходу 22 хворим на рак шлунка (Табл.).

Таблиця

Оцінка ефективності проведеної неоадьювантної ПХТ у пацієнтів із високою, низькою чутливістю та відсутністю чутливості. Оцінка проводилась за результатами ФЕГДС

Регресія пухлини/групи	Група ВиЧ	Група НЧ	Група ВіЧ
Повна	-	-	-
Часткова	3	1	-
Стабілізація пухлинного процесу	4	4	-
Прогресування	1	2	4
Всього	8	7	4

Спосіб може бути застосований у всіх спеціалізованих онкологічних закладах, як тест на проведення прогностичної ефективності неоадьювантної ПХТ у хворих на поширену форму раку шлунка.

Джерела інформації:

1. Symonds H., Krall L., Remington L., Saenz-Robles M., Lowe S., Jacks T., Van Dyke T. p53-dependent apoptosis suppresses tumor growth and progression in vivo. *Cell*. 1994 Aug26; 78(4):703-II.

2. Gurova K.V., Kwek S.S., Koman I.E., Komarov A.P., Kandel E., Nikiforov M.A., Gudkov A.V. Apoptosis inhibitor as a suppressor of tumor progression: expression of Bcl-2 eliminates selective advantages for p53-deficient cells in the tumor. *Cancer Biol Ther*. 2002 Jan-Feb; 1(1):39-44.

3. Dvorak HF. Vascular permeability factor/vascular endothelial growth factor: A critical cytokine in tumor angiogenesis and a potential target for diagnosis and therapy. *J Clin Oncol*. 2002; 20:4368-4380.

4. Reed, J.C., Kitada, S., Takayama, S., and Miyashita. T. Regulation of chemoresistance by the bel-2 oncoprotein in non-Hodgkin's lymphoma and

lymphocytic leukemia cell lines. *Ann. Oncol.*, 5 (Suppl. J): 61-65, 1994.

5. Lotem, J., and Saebs, L. Regulation by bel-2, c-myc, and p53 of susceptibility to induction apoptosis by heat shock and cancer chemotherapy compounds in differentiation-competent and -defective myeloid leukemia cells. *Cell Growth Differ.*, 4: 41-47, 1993.

6. Connolly, D.T., Heuvelman, D.M., Nelson, R., Olander, J.V., Eppley, B.L., Delfino, J.J., Siegel, N.R., and Feder, J. Tumor vascular permeability factor stimulates endothelial cell growth and angiogenesis. *J. Clin. Invest.*, 84: 1470-1478, 1989.

7. Lawrence J. Mamet. Oxyl radicals and DNA damage. *Carcinogenesis*, Vol.21, No. 3,361-370, March 2000.

8. Toshiro Okuyama, M.D., Yoshihiko Maehara, M.D., Kazuya Endo, M.D., Hideo Baba, M.D., Yosuke Adachi, M.D., Michihiko Kuwano, M.D., Keizo Sugimachi, M.D. Expression of glutathione S-transferase and sensitivity of human gastric cancer cells to cisplatin. *Cancer Cytopathology CA: A Cancer Journal for Clinicians* Volume 74 Issue 4, Pages 1230-1236.