



УКРАЇНА

(19) UA

(11) 59299

(13) A

(51) 7 G01N33/533

МІНІСТЕРСТВО ОСВІТИ
І НАУКИ УКРАЇНИДЕРЖАВНИЙ ДЕПАРТАМЕНТ
ІНТЕЛЕКТУАЛЬНОЇ
ВЛАСНОСТІ

ОПИС

ДО ДЕКЛАРАЦІЙНОГО ПАТЕНТУ
НА ВИНАХІДВидається під
відповідальність
власника
патенту

(54) СПОСІБ ПРОГНОЗУВАННЯ АГРЕСИВНОСТІ ПЕРЕБІГУ МІХУРОВОГО ЗАНОСУ

1

2

(21) 20021210584

(22) 26 12 2002

(24) 15 08 2003

(46) 15 08 2003, Бюл. № 8, 2003 р.

(72) Ціп Наталія Павлівна, Храновська Наталія
Миколаївна(73) ІНСТИТУТ ОНКОЛОГІЇ АКАДЕМІЇ МЕДИЧНИХ
НАУК УКРАЇНИ

(57) Спосіб прогнозування агресивності перебігу міхурового заносу, що включає цитогенетичне дослідження тканини видаленого міхурового заносу, який відрізняється тим, що у випадку визначення S-phase в межах від 26,14% до 47,02% хворі підлягають спеціальному лікуванню навіть при низьких та негативних рівнях хоріонічного гонадотропіну

Винахід відноситься до галузі медицини, а саме до клінічної онкології, і може використовуватися в лікуванні хворих на міхуровий занос.

Міхуровий занос (МЗ) - це доброякісна патологічна зміна росту та диференціювання трофобласту, що у 80-90% випадків не потребує спеціального лікування. Пильна увага онкогінекологів до цієї патології обумовлена тим, що міхуровий занос може метастазувати в 1-6% випадків і майже в 1000 разів у порівнянні з фізіологічними родами підвищує ризик розвитку надзвичайно злоякісної пухлини - хоріокарциноми.

Маркером трофобластичних пухлин (ТП), до яких належить і МЗ, є хоріонічний гонадотропін - глікопротеїновий гормон, що продукується нормальною плацентою та ТП. У випадку спонтанної ремісії при повному МЗ нормалізація рівня ХГ відбувається приблизно на 78 день, при частковому МЗ - на 63 день після евакуації МЗ (1). Однак Товариство Гінекологічних Онкологів та FIGO рекомендують лікарю самостійно визначати в кожній конкретній ситуації рівень плато ХГ, що вказує на необхідність спеціального лікування після евакуації МЗ (2). Цей факт, а також випадки постміхурових ТП з негативними та слідовими рівнями ХГ, обумовлюють необхідність пошуку додаткових диференціально-діагностичних критеріїв агресивності перебігу міхурового заносу.

Прототипом поданої заявки є робота, в якій автори пропонують визначати агресивність перебігу повного МЗ за ДНК статусом клітин тканини евакуйованого МЗ (Fukunaga M. Flow cytometric and clinicopathologic study of complete hydatidiform moles with special reference to the significance of cytometric aneuploidy // Gynecol Oncol - 2001,

81(1)-P 67-70). В залежності від кількості ДНК в клітинах пухлини прогнозується біологічна поведінка повного МЗ.

Позитивними характеристиками прототипу є:

- визначення плоідності клітин МЗ,
- використання в якості джерела матеріалу парафінових блоків евакуйованого повного МЗ,
- проведення морфологічних та ДНК-цитометричних параметрів тканини евакуйованого повного МЗ.

До недоліків прототипу можна віднести:

- аналіз плоідності пухлинної тканини тільки у хворих на повний МЗ,
- відсутність аналізу розподілу клітин за фазами мітотичного циклу (кількість клітин проліферуючого пулу),
- відсутність аналізу гормональної активності пухлини (за рівнем хоріонічного гонадотропіну) в залежності від кількості ДНК в клітинах пухлини.

В основі винаходу поставлена задача розробити спосіб прогнозування агресивності перебігу міхурового заносу, шляхом визначення S-phase тканини евакуйованого МЗ, що забезпечить диференціювання хворих, які потребують спеціального лікування навіть при низьких та негативних рівнях хоріонічного гонадотропіну.

Поставлена задача вирішується наступним чином.

Вміст ДНК в клітинах пухлини оцінювали проточно-цитометричним методом після їх фарбування флюорохромом (пропідіум йодид), який селективно зв'язується з нуклеїновою кислотою в ядрі клітини. В якості джерела матеріалу використовували парафінові блоки евакуйованого МЗ.

(13) A

(11) 59299

(19) UA

Ступінь анеуплоїдності та аналіз розподілу клітин за фазами мітотичного циклу визначали, виділяючи для аналізу окремі клітинні ядра за допомогою спеціальних параметрів приладу

Суть методу клітини в G₂+M фазі клітинного циклу містять подвійну кількість ДНК і, отже, флюорохрому, у порівнянні з клітинами в фазі G₀. Клітини в S-фазі та анеуплоїдні пухлинні клітини повинні містити більшу кількість ДНК, що і фіксується приладом. Чим більший вміст ДНК в клітині, тим сильніший імпульс і тим далі відсувається запис гістограми на осі абсцис. На осі ординат реєструється число імпульсів на канал, чим вища крива в будь-якій точці, тим більше клітин із відповідним вмістом ДНК зосереджено в даному каналі.

Фарбування клітин здійснювали за допомогою флюорохромного барвника пропідія йодид (PI). Клітини у кількості 10⁶ на пробу після однократного відмивання в 5мл PBS при 200g протягом 10хв ресуспендували в 1мл гіпотонічного лізуючого буфера (0,1% цитрат натрію, 0,1% Triton X-100, 5 µg/ml PI. Всі реагенти фірми "Sigma Chemical Co", USA).

Після обережного струшування, клітини інкубували при 22-25°C протягом 30 хв в темряві. Пухлинні клітини додатково обробляли 250мкг на 1мл фарбуючого буфера Ribonuclease A ("Sigma Chemical Co", USA), інкубуючи проби протягом 10 хв при 37°C (4).

Усі цитометричні аналізи здійснені на приладі FACScan ("Becton Dickinson", USA), що обладнаний аргонним лазером з довжиною хвилі 488нм, з використанням програми CellQuest для Mac для отримання та аналізу даних. Для вимірювання флюоресценції PI використовували вузькополосний фільтр 585/42нм.

Для оцінки дольового вмісту клітин в основних фазах мітотичного циклу (G₁/0, S, G₂+M) та анеуплоїдності пухлинних клітин гістограми розподілу клітин за вмістом ДНК обробляли за допомогою спеціалізованої математичної програми Mod Fit LT 2.0 (BDIS, USA) для комп'ютерів Mac.

В тканині евакуйованого МЗ визначали наступні показники:

- розподіл пухлинних клітин за фазами клітинного циклу,
- процент диплоїдних та анеуплоїдних клітин в пробі,
- індекс плоїдності ДНК (ІДНК) (характеризує співвідношення інтенсивності флюоресценції піка анеуплоїдних клітин, тобто номер його каналу, до диплоїдних).

Прикладами конкретного виконання способу можуть бути витяги із двох історій хвороб.

Приклад I. Хвора ІН, і х №4541 від 11 07 2001 року ПГЗ №996/2001 від 30 05 01р міхуровий занос.

14 05 01р - евакуація міхурового заносу (12 тижнів - за розмірами матки та за строком вагітності). Спостерігалася 2 місяці. Протягом всього періоду спостереження ХГ у сироватці крові 0 mIU/ml, 11 07 2001 року в ургентному порядку у зв'язку з кровотечею госпіталізована у відділення онкогінекології ІОАМНУ для лікування.

Вміст ДНК в клітинах пухлини оцінювали проточно-цитометричним методом після їх фарбування флюорохромом (пропідіум йодид), який селективно зв'язується з нуклеиновою кислотою в ядрі клітини. В якості джерела матеріалу використовували парафінові блоки евакуйованого МЗ.

Ступінь анеуплоїдності та аналіз розподілу клітин за фазами мітотичного циклу визначали, виділяючи для аналізу окремі клітинні ядра за допомогою спеціальних параметрів приладу.

Фарбування клітин здійснювали за допомогою флюорохромного барвника пропідія йодид (PI). Клітини у кількості 10⁶ на пробу після однократного відмивання в 5мл PBS при 200g протягом 10хв ресуспендували в 1мл гіпотонічного лізуючого буфера (0,1% цитрат натрію, 0,1% Triton X-100, 5 µg/ml PI. Всі реагенти фірми "Sigma Chemical Co", USA).

Після обережного струшування, клітини інкубували при 22-25°C протягом 30хв в темряві. Пухлинні клітини додатково обробляли 250мкг на 1мл фарбуючого буфера Ribonuclease A ("Sigma Chemical Co", USA), інкубуючи проби протягом 10хв при 37°C (4).

Усі цитометричні аналізи здійснені на приладі FACScan ("Becton Dickinson, USA), що обладнаний аргонним лазером з довжиною хвилі 488нм, з використанням програми CellQuest для Mac для отримання та аналізу даних. Для вимірювання флюоресценції PI використовували вузькополосний фільтр 585/42нм.

Для оцінки дольового вмісту клітин в основних фазах мітотичного циклу (G₁/0, S, G₂+M) та анеуплоїдності пухлинних клітин гістограми розподілу клітин за вмістом ДНК обробляли за допомогою спеціалізованої математичної програми Mod Fit LT 2.0 (BDIS, USA) для комп'ютерів Mac.

В тканині евакуйованого МЗ визначали наступні показники:

- розподіл пухлинних клітин за фазами клітинного циклу,
- процент диплоїдних та анеуплоїдних клітин в пробі,
- індекс плоїдності ДНК (ІДНК) (характеризує співвідношення інтенсивності флюоресценції піка анеуплоїдних клітин, тобто номер його каналу, до диплоїдних).

S-phase тканини евакуйованого міхурового заносу - 47,02%

Приклад II. Хвора ДЛ, і х №6857 від 18 10 2001 року ПГЗ № 1984/01 від 16 10 01р міхуровий занос з вогнищевою проліферацією хоріального епітелію та елементів цитотрофобласта.

24 08 01р евакуація міхурового заносу (8 тижнів - за розмірами матки та за строком вагітності). Спостерігалася 2 місяці. Рівень ХГ у сироватці крові 43,16 mIU/ml. На момент госпіталізації у відділення онкогінекології ІОАМНУ в міометрії визначалися 2 пухлинні вузли розмірами 4,4х2,7см та 2,2х3,1см кожний.

Вміст ДНК в клітинах пухлини оцінювали проточно-цитометричним методом після їх фарбування флюорохромом (пропідіум йодид), який селективно зв'язується з нуклеиновою кислотою в ядрі

клітини. В якості джерела матеріалу використовували парафінові блоки евакуйованого МЗ.

Ступінь анеупloidності та аналіз розподілу клітин за фазами мітотичного циклу визначали, виділяючи для аналізу окремі клітинні ядра за допомогою спеціальних параметрів приладу.

Фарбування клітин здійснювали за допомогою флюорохромного барвника пропідія йодид (PI). Клітини у кількості 10^6 на пробу після однократного відмивання в 5мл PBS при 200g протягом 10хв ресуспендували в 1мл піотонічного лізуючого буфера (0,1% цитрат натрію, 0,1% Triton X-100, 5 μ g/ml PI. Всі реагенти фірми "Sigma Chemical Co", USA).

Після обережного струшування, клітини інкубували при 22-25°C протягом 30хв в темряві. Пухлинні клітини додатково обробляли 250мкг на 1мл фарбуючого буфера Ribonuclease A ("Sigma Chemical Co", USA), інкубуючи проби протягом 10хв при 37°C (4).

Усі цитометричні аналізи здійснені на приладі FACScan ("Becton Dickinson, USA), що обладнаний аргонним лазером з довжиною хвилі 488нм, з використанням програми CellQuest для Mac для отримання та аналізу даних. Для вимірювання флюоресценції PI використовували вузькополосний фільтр 585/42нм.

Для оцінки дольового вмісту клітин в основних фазах мітотичного циклу (G1/0, S, G2+M) та анеупloidності пухлинних клітин гістограми розподілу клітин за вмістом ДНК обробляли за допомогою спеціалізованої математичної програми Mod Fit LT 2.0 (BDIS, USA) для комп'ютерів Mac.

В тканині евакуйованого МЗ визначали наступні показники:

- розподіл пухлинних клітин за фазами клітинного циклу,

- процент диплоїдних та анеупloidних клітин в пробі,

- індекс плоїдності ДНК (ІДНК) (характеризує співвідношення інтенсивності флюоресценції піка анеупloidних клітин, тобто номер його каналу, до диплоїдних).

S-phase тканини евакуйованого міхурового заносу - 38,6%.

Таким чином, використання даного способу визначення агресивності перебігу різних форм міхурового заносу на основі цитогенетичного дослідження тканини видаленого міхурового заносу забезпечить диференціювання хворих, що підлягають спеціальному лікуванню навіть при низьких та негативних рівнях хоріонічного гонадотропіну.

Джерела інформації

1. Paradis F.J., Browne P., Fisher R.A. et al. A clinical histopathological and flow cytometric study of 149 complete moles and 107 non-molar hydropic abortions // *Histopathol.* - 1996, 28(2) - P 101-110.

2. Kohorn E.I. The new FIGO 2000 staging and risk factor scoring system for gestational trophoblastic disease. Description and critical assessment // *Int. J. Gynecol. Cancer* - 2001, 11 - P 73-77.

3. Fukunaga M. Flow cytometric and clinicopathologic study of complete hydatidiform moles with special reference to the significance of cytometric aneuploidy // *Gynecol. Oncol.* - 2001, 81(1) - P 67-70 (прототип).

4. Pradier O., Rave-Frank M., Lehmann J. et al. Effects of docetaxel in combination with radiation on human head and neck cancer cells (ZMK-1) and cervical squamous cell carcinoma cells (CASK1) // *Int. J. Cancer* - 2001, 91(6) - P 840-845.