



УКРАЇНА

(19) UA (11) 67294 (13) U
(51) МПК
A61K 38/43 (2006.01)

ДЕРЖАВНА СЛУЖБА
ІНТЕЛЕКТУАЛЬНОЇ
ВЛАСНОСТІ
УКРАЇНИ

ОПИС ДО ПАТЕНТУ НА КОРИСНУ МОДЕЛЬ

видається під
відповідальність
власника
патенту

(54) СПОСІБ ПРОГНОЗУВАННЯ ПЕРЕБІГУ ЗАХВОРЮВАННЯ У ХВОРИХ НА РАК ШЛУНКА

1

2

(21) u201109471

(22) 28.07.2011

(24) 10.02.2012

(46) 10.02.2012, Бюл. № 3, 2012 р.

(72) ГАНУСЕВИЧ ІРИНА ІВАНІВНА, МЕРЕНЦЕВ
СЕРГІЙ ПАВЛОВИЧ, ОСИНСЬКИЙ СЕРГІЙ ПЕТ-
РОВИЧ(73) ІНСТИТУТ ЕКСПЕРИМЕНТАЛЬНОЇ ПАТОЛО-
ГІЇ, ОНКОЛОГІЇ І РАДІОБІОЛОГІЇ ІМ. Р.Є. КАВЕЦЬ-
КОГО НАЦІОНАЛЬНОЇ АКАДЕМІЇ НАУК УКРАЇНИ(57) Спосіб прогнозування перебігу захворювання
у хворих на рак шлунка, що включає визначення

рівнів активності желатинази В, який **відрізняється** тим, що як дослідний матеріал використовують кістковий мозок, в якому методом зимографії визначають концентрації активних форм желатиназ А та В, і при показниках, нижчих за 7,2 мкг/г тканини для желатинази А та 6,7 мкг/г тканини для желатинази В, прогнозують сприятливий перебіг захворювання, а при показниках, вищих за 7,2 мкг/г тканини для желатинази А та 6,7 мкг/г тканини для желатинази В - несприятливий.

Корисна модель належить до медицини, а саме до онкології, і може використовуватись для контролю ефективності протипухлинної терапії та прогнозування перебігу захворювання у хворих на рак шлунка (РШ).

Прогноз перебігу онкологічного захворювання та своєчасна корекція схеми лікування підвищують ефективність терапії та показники виживаності хворих. Для РШ використовується певна низка прогностичних показників, але немає показника, який характеризував би рівні активності желатиназ А і В у місцях віддаленого метастазування пухлини та визначався багаторазово протягом перебігу захворювання [1, 2].

Желатинази А і В, або матриксні металопротеїнази-2 та -9 (ММП-2 та ММП-9), відповідно, є ферментами родини цинкозалежних ендопептидаз, що синтезуються клітинами пухлини та прилеглої до неї тканини, ендотеліальними, імунокомпетентними клітинами та їхніми попередниками і здійснюють деградацію позаклітинного матриксу в процесі метастазування пухлини. Пригнічення, стабілізація чи посилення деструкції позаклітинного матриксу є критичною характеристикою злоякісної прогресії [3].

На теперішній час рівні желатиназ А і В визначають імуногістохімічним методом в пухлинній тканині та імуоферментним методом і методом зимографії у сироватці або плазмі крові хворих на РШ та пов'язують ці показники із загальною виживаністю та рівнем метастазування [4, 5]. При захворюванні на рак шлунка наведені показники у

місцях віддаленого метастазування, як маркери прогнозування, не застосовуються. Відтак, існує необхідність у визначенні функціонального стану желатиназ А і В у місцях віддаленого метастазування з метою прогнозу перебігу захворювання та корекції терапевтичних схем у хворих на РШ.

За прототип корисної моделі вибрано спосіб застосування показників експресії ММП-9, визначених в пухлинах шлунка за допомогою імуногістохімічного методу, як маркерів прогнозу перебігу захворювання [6].

Позитивним у прототипі є те, що застосований метод проводиться з використанням моноклональних антитіл, тобто характеризується високим рівнем селективності.

Недоліками прототипу є те, що матеріал для дослідження можна отримати під час оперативного втручання лише одноразово, а як маркер прогнозу використовують лише желатиназу В, і отриманий показник характеризує її активність в первинній пухлині, але не в місцях віддаленого метастазування.

В основу корисної моделі поставлено задачу створити спосіб прогнозування перебігу захворювання у хворих на рак шлунка шляхом визначення вмісту активних форм ММП-2 та ММП-9 в кістковому мозку (КМ) пацієнтів, що дасть можливість оцінити активність наведених ферментів у місці віддаленого метастазування, контролювати ефективність протипухлинної терапії, корегувати схеми лікування та покращити показники виживаності.

(13) U
(11) 67294
(19) UA

Поставлена задача вирішується наступним чином.

Після стандартної процедури забору КМ із стерильної кістки хворого отриманий матеріал в кількості 2 мл зберігали в рідкому азоті при температурі 180 °С не більше, ніж 1 місяць. Для приготування зразка до 10 мкл швидко розмороженого КМ додавали 10 мкл 1 % розчину додецилсульфату натрію та центрифугували при 3000 об./хв. протягом 20 хв., після чого 20 мкл надосаду використовували як зразок.

Концентрації активних форм желатиназ А і В в отриманому зразку визначали методом зимографії в 12 % поліакриламідному гелі (ПААГ) з додецилсульфатом натрію і 0,1 % желатину як субстрату [7]. 20 мкл зразка КМ вносили в лунки гелю та проводили електрофорез при температурі +4 °С, в напрузі електричного поля 150V, протягом 4 годин.

Після розділення досліджуваних білків гель відмивали в 2,5 % розчині тритону X-100, потім інкубували в буфері з додаванням хлориду кальцію (pH=7,5) впродовж 18 годин при температурі +37 °С, фіксували та забарвлювали 0,25 % Кумассі діамантовим синім. Після відмивання гелю у розчині оцтової кислоти з метанолом протеолітична активність желатиназ візуалізувалась у вигляді знебарвлених смужок на синьому тлі, а їхня локалізація відповідала молекулярній масі латентної та активної форм кожного із ферментів, які визначалися за стандартами молекулярних мас.

Оцінку протеолітичної активності проводили шляхом виміру площі зони лізису та визначали концентрації ферментів, використовуючи стандартний набір матриксних металопротеїназ.

Для всіх обстежених хворих встановлено, що межа розподілу між умовно високим та низьким рівнями активності дорівнює 7,2 мкг/г тканини для ММП-2 та 6,7 мкг/г тканини для ММП-9, і пацієнти з низькою активністю желатиназ мають кращі показники виживаності, ніж пацієнти з високою активністю.

Таким чином, у хворих, в КМ яких концентрація активних ММП-2 > 7,2 мкг/г тканини і ММП-9 > 6,7 мкг/г тканини, активність ферментів вважається високою, що є основою для прогнозування у них несприятливого перебігу захворювання.

У хворих, в КМ яких концентрація активних ММП-2 < 7,2 мкг/г тканини та ММП-9 < 6,7 мкг/г тканини, активність наведених ферментів вважається низькою, що є основою для прогнозування у них сприятливого перебігу захворювання.

Критеріями ефективності запропонованого способу є покращання раннього виявлення рецидивів та/або метастазів пухлини, адекватна корекція схем лікування, що призводить до підвищення ефективності терапії та подовження життя хворих на РШ.

За розробленою методикою обстежено 68 хворих на РШ. З них у 42 хворих виявлено високі рівні активності желатиназ та встановлено негативний прогноз перебігу захворювання, у 26 - низькі рівні активності желатиназ та позитивний прогноз перебігу захворювання.

Прикладами реалізації заявленого способу можуть вважатися наведені витяги з історій хвороби двох хворих.

1. Хвора К., 1927 року народження (Історія хвороби № 17078, АК № 16192/05, ПГЗ № 38641-50/05 - аденокарцинома шлунка, T₃N₁ M₀, G3, стадія ША). Виконана операція - дистальна субтотальна резекція шлунка за Більрот-П у модифікації Гофмейстера-Фінстерера.

Після стандартної процедури забору КМ із стерильної кістки хворої отриманий матеріал в кількості 2 мл зберігали в рідкому азоті при температурі -180 °С протягом 2 тижнів. Безпосередньо перед вимірюванням до 10 мкл швидко розмороженого КМ додавали 10 мкл 1 % розчину додецилсульфату натрію та центрифугували при 3000 об./хв. протягом 20 хв., після чого 20 мкл надосаду використовували як зразок.

Концентрації активних форм желатиназ А і В у зразку визначали методом зимографії в 12 % ПААГ з додецилсульфатом натрію і 0,1 % желатину як субстрату. 20 мкл зразку вносили в лунки гелю та проводили електрофорез при температурі +4 °С, в напрузі електричного поля 150V, протягом 4 годин. Після розділення досліджуваних білків проби гелю відмивали в 2,5 % розчині тритону X-100, потім інкубували в буфері з додаванням хлориду кальцію (pH=7,5) впродовж 18 годин при температурі +37 °С, фіксували та забарвлювали 0,25 % Кумассі діамантовим синім. Після відмивання гелю у розчині оцтової кислоти з метанолом протеолітична активність желатиназ візуалізувалась у вигляді знебарвлених смужок на синьому тлі, а їхня локалізація відповідала молекулярній масі латентної та активної форм кожного із ферментів, які визначалися за стандартами молекулярних мас.

Оцінку протеолітичної активності проводили шляхом виміру площі зони лізису та визначали концентрацію ферментів, використовуючи стандартний набір матриксних металопротеїназ. Вираховували концентрації активних форм ММП-2 та ММП-9. Концентрація активної ММП-2 дорівнювала 10,8 мкг/г тканини, тобто більше, ніж 7,2 мкг/г тканини, і концентрація активної ММП-9 дорівнювала 7,3 мкг/г тканини, тобто більше, ніж 6,7 мкг/г тканини, що вказувало на високу активність обох желатиназ і значний рівень деструкції позаклітинного матриксу.

За цих умов прогноз перебігу захворювання є несприятливим.

Тривалість життя хворої становила 30 тижнів.

2. Хворий К., 1952 року народження (Історія хвороби № 3752, АК № 8344/05, ПГЗ № 12808-16/05 - железистий, місцями перснеподібний рак шлунка, T₃N₁M₀, G3-4, стадія ША). Виконана операція - розширена гастректомія за Гіляровичем.

Після стандартної процедури забору КМ із стерильної кістки хворого отриманий матеріал в кількості 2 мл зберігали в рідкому азоті при температурі - 180 °С протягом 2 тижнів. Безпосередньо перед вимірюванням до 10 мкл швидко розмороженого КМ додавали 10 мкл 1 % розчину додецилсульфату натрію та центрифугували при 3000 об./хв. протягом 20 хв., після чого 20 мкл надосаду використовували як зразок.

Концентрації активних форм желатиназ А і В у зразку визначали методом зимографії в 12 % ПА-АГ з додецилсульфатом натрію і 0,1 % желатину в якості субстрату. 20 мкл зразку вносили в лунки гелю та проводили електрофорез при температурі +4 °С, в напрузі електричного поля 150V, протягом 4 годин. Після розділення досліджуваних білків проби гелю відмивали в 2,5 % розчині тритону X-100, потім інкубували в буфері з додаванням хлориду кальцію (рН=7,5) впродовж 18 годин при температурі +37 °С, фіксували та забарвлювали 0,25 % Кумассі діамантовим синім. Після відмивання гелю у розчині оцтової кислоти з метанолом протеолітична активність желатиназ візуалізувалась у вигляді знебарвлених смужок на синьому тлі, а їхня локалізація відповідала молекулярній масі кожного із ферментів, які визначалися за стандартами молекулярних мас.

Оцінку протеолітичної активності проводили шляхом виміру площі зони лізису та визначали концентрацію ферментів, використовуючи стандартний набір матриксних металопротеїназ. Вираховували концентрації активних форм ММП-2 та ММП-9, які відповідають рівням активності цих ферментів. Концентрація активної ММП-2 дорівнювала 1,2 мкг/г тканини, тобто менше, ніж 7,2 мкг/г тканини, і концентрація активної ММП-9 дорівнювала 4,1 мкг/г тканини, тобто менше, ніж 6,7 мкг/г тканини, що вказувало на низьку активність обох желатиназ і незначний рівень деструкції позаклітинного матриксу.

За цих умов прогноз перебігу захворювання є сприятливим. Тривалість життя хворого становила 127 тижнів.

Джерела інформації:

1. Macdonald J. S. New horizons for gastric cancer:commentary/J.S.Macdonald, A. Cervantes // Eur. J. Cancer-2006. - Vol.4, № 10. - P. 1-2.
2. Gastric cancer/V. Catalano, R. Labianca, G. Beretta [et al.] // Crit.Rev.Oncol.Hematol.-2005. - Vol.54. - P.209-241.
3. Fingleton B. Matrix metalloproteinases: roles in cancer and metastasis/B. Fingleton // Front.Biosci. - 2006. - Vol.11. - P. 479-491.
4. Pena S. Matrix metalloproteases as molecular markers in gastric cancer. / S. Pena, C. L. Sampieri, K. Leon-Cordoba. // Med.Clin.-2010. - Vol. 134(3).-P. 123-126.
5. Plasma Matrix Metalloproteinase-9 Level Is Better than Serum Matrix Metalloproteinase-9 Level to Predict Gastric Cancer Evolution. / Chun-Ying Wu, Ming-Shiang Wu, En-Pei Chiang [et al.]. // Clin. Cancer Res. - 2007. - Vol.13. - P. 2054-2060.
6. Matrix metalloproteinase-9 is associated with disease-free survival and overall survival in patients with gastric cancer. / Dake Chu, Zixi Zhang, Yunming Li [et al.] // Int. J. Cancer. - 2011. - Vol.129. - P. 887-895 (прототип).
7. Inhibition of invasion and metastasis in cells transfected with an inhibitor of metalloproteinases / YA. De Clerk, N. Perez, H. Shimada [et al.] // Cancer research. - 1992. - Vol.52. - P. 701-708.