



УКРАЇНА

(19) **UA** (11) **118025** (13) **U**
(51) МПК (2017.01)
A61K 38/00
G01N 33/483 (2006.01)

МІНІСТЕРСТВО
ЕКОНОМІЧНОГО
РОЗВИТКУ І ТОРГІВЛІ
УКРАЇНИ

(12) ОПИС ДО ПАТЕНТУ НА КОРИСНУ МОДЕЛЬ

(21) Номер заявки: u 2016 09718	(72) Винахідник(и): Ганусевич Ірина Іванівна (UA), Бурлака Анатолій Павлович (UA), Лукін Сергій Миколайович (UA), Вовк Анастасія Вікторівна (UA)
(22) Дата подання заявки: 21.09.2016	
(24) Дата, з якої є чинними права на корисну модель: 25.07.2017	
(46) Публікація відомостей про видачу патенту: 25.07.2017, Бюл.№ 14	(73) Власник(и): ІНСТИТУТ ЕКСПЕРИМЕНТАЛЬНОЇ ПАТОЛОГІЇ, ОНКОЛОГІЇ І РАДІОБІОЛОГІЇ ІМ. Р.Є. КАВЕЦЬКОГО НАЦІОНАЛЬНОЇ АКАДЕМІЇ НАУК УКРАЇНИ, вул. Васильківська, 45, м. Київ, 03022, Україна (UA)
	(74) Представник: Васильєв Олексій Всеволодович, реєстр. №397

(54) СПОСІБ ПРОГНОЗУВАННЯ ПЕРЕБІГУ ЗАХВОРЮВАННЯ У ХВОРИХ НА РАК ПРЯМОЇ КИШКИ

(57) Реферат:

Спосіб прогнозування перебігу захворювання у хворих на рак прямої кишки, що включає визначення рівнів генерування супероксидних радикалів, причому рівні генерування супероксидних радикалів та, додатково до них, концентрації активних форм матриксних металопротеїнази-2 та металопротеїнази-9 визначають в прилеглій до пухлини жировій тканині, і при рівнях генерування супероксидних радикалів, вищих ніж 0,35 нм/г*тк*хв, та концентраціях активних форм матриксних металопротеїнази-2 та металопротеїнази-9, вищих ніж відповідно 2,0 та 4,5 мкг/г тканини, прогнозують несприятливий перебіг захворювання, а при рівнях генерування супероксидних радикалів, нижчих ніж 0,35 нм/г*тк*хв, та концентраціях активних форм матриксних металопротеїнази-2 та металопротеїнази-9, нижчих ніж відповідно 2,0 та 4,5 мкг/г тканини, прогнозують сприятливий перебіг захворювання.

UA 118025 U

Корисна модель належить до галузі медицини, а саме - до онкології, і може використовуватись для врахування впливу ожиріння на перебіг пухлинного процесу в прогнозуванні перебігу захворювання та ефективності терапії, що дозволить індивідуалізувати лікувальні заходи та оптимізувати терапевтичні режими у хворих на рак прямої кишки (РПК).

Існують дані щодо тісного зв'язку між ожирінням та виникненням пухлин, їх ростом та злоякісною прогресією. Оцінка можливого перебігу онкологічного захворювання з огляду на наявність ожиріння та своєчасна корекція схеми лікування можуть покращити ефективність терапії та показники виживаності. Серед показників, які використовуються для прогнозування перебігу РПК, окрім показників системи TNM, використовують рівні фібриногену, мікроРНК, деякі генні характеристики [1-3]. Відомо, що високі рівні швидкості генерування супероксидних радикалів (СР) необоротно змінюють життєдіяльність клітин, виступаючи в якості основного месенджера - модулятора ряду внутрішньоклітинних сигнальних каскадів, що призводить до прогресування раку. Так, через вплив на внутрішньоклітинні сигнальні шляхи СР здійснюють регуляцію деструкції позаклітинного матриксу, зокрема - регуляцію активності желатиназ (матриксних металопротеїнази-2 і металопротеїнази-9 (ММП-2 і ММП-9)) [4-7]. Для РПК використовуються зокрема такі прогностичні показники, що характеризують рівні генерування СР нейтрофілами та тромбоцитами крові та можуть визначатися багаторазово протягом перебігу захворювання [8, 9], рівні активності ММП-2 та ММП-9 визначають в пухлині методом зимографії в поліакриламідному гелі (ПААГ) та пов'язують із загальною виживаністю і рівнем метастазування [10, 11], зокрема у хворих на РПК [12], але не запропоновано спосіб прогнозу перебігу РПК, який враховував би наявність ожиріння у хворого та, зокрема, вплив жирової тканини на пухлину.

Існує тісний зв'язок між ожирінням і злоякісною прогресією. Ожиріння пов'язане з більш агресивним перебігом пухлинного процесу у нирці, підшлунковій залозі, стравоході, товстому кишечнику, жовчному міхурі, щитоподібній залозі, шийці матки, ендометрії [13]. Низка пухлин, серед яких і РПК, розвиваються в місцях анатомічного накопичення жирової тканини. При взаємодії жирової тканини з пухлинними клітинами, адипоцити дедиференціюються в преадипоцити або безпосередньо перепрограмовуються в пухлино-асоційовані адипоцити (ПАА), які характеризуються прозапальним фенотипом та метаболізмом, що базується на окисненні жирних кислот [13]. В результаті таких змін жирова тканина генерує високі рівні СР та ферментів деградації позаклітинного матриксу (ПМ), зокрема желатиназ А і В (ММП-2 та ММП-9), які здатні стимулювати адгезію, міграцію та інвазію пухлинних клітин та підвищувати їх здатність до метастазування. Для хворих на РПК показники генерування СР та деградації ПМ в прилеглій до пухлини жировій тканині як маркери прогнозування не застосовуються. Відтак, існує необхідність у визначенні рівнів генерування СР та концентрацій активних форм желатиназ А і В в жировій тканині, прилеглій до РПК, з метою прогнозу перебігу МЗХ та корекції терапевтичних схем у хворих на РШ.

Відомий спосіб застосування показників рівня генерування СР, визначеного методом електронно-парамагнітного резонансу (ЕПР), тромбоцитами крові хворих на РПК з метою прогнозу перебігу захворювання [9] (прототип).

Позитивним у відомому способі є те, що застосований метод визначення показника генерування СР тромбоцитами крові проводиться з використанням високочутливого та високоточного методу ЕПР, є малоінвазивним та може бути визначений багаторазово протягом перебігу захворювання.

Недоліками прототипу є те, що як маркер прогнозу використовують рівень генерування СР тромбоцитами крові, що не враховує впливу жирової тканини на пухлину шляхом генерування СР та активації желатиназ А і В.

В основу корисної моделі поставлено задачу створити спосіб прогнозування перебігу захворювання у хворих на РПК шляхом визначення рівня генерування СР та активності желатиназ А і В в прилеглій до пухлини жировій тканині, на відміну від визначення рівнів генерування СР тромбоцитами крові, що дасть можливість оцінити можливий перебіг захворювання у пацієнтів залежно від наявності ожиріння, своєчасно корегувати схеми індивідуального лікування з урахуванням впливу жирової тканини на пухлину, що покращить показники виживаності.

Поставлена задача вирішувалася за рахунок того, що у способі прогнозування перебігу захворювання у хворих на рак прямої кишки, що включає визначення рівнів генерування супероксидних радикалів, причому разом з визначення рівнів генерування супероксидних радикалів додатково визначають концентрації активних форм матриксних металопротеїнази-2 та металопротеїнази-9 в прилеглій до пухлини жировій тканині, і при рівнях генерування супероксидних радикалів, вищих ніж 0,35 нм/г*тк*хв, та концентраціях активних форм

матриксних металопротеїнази-2 та металопротеїнази-9, вищих ніж відповідно 2,0 та 4,5 мкг/г тканини, прогнозують несприятливий перебіг захворювання, а при рівнях генерування супероксидних радикалів, нижчих ніж 0,35 нМ/г*тк*хв, та концентраціях активних форм матриксних металопротеїнази-2 та металопротеїнази-9, нижчих ніж відповідно 2,0 та 4,5 мкг/г

5 тканини, прогнозують сприятливий перебіг захворювання.

Рівні генерування супероксидних радикалів та концентрацій активних форм ММП-2 та ММП-9 в прилеглій до пухлини жировій тканині вказують на ступінь агресивності пухлини і характер перебігу захворювання у хворих на рак прямої кишки, що надає можливість корегувати подальшу тактику лікування.

10 Спосіб здійснюють наступним чином.

Під час оперативного втручання з приводу видалення пухлини отримують зразок прилеглої до пухлини жирової тканини.

15 Частину зразка зберігають на холоді (від 0 до +4 °С) впродовж 4-5 годин та визначають в ній швидкість генерування супероксидних радикалів методом ЕПР з використанням технології Spin Traps за кімнатної температури. Для цього 250 мг жирової тканини гомогенізують в скляному гомогенізаторі з додаванням 0,5 мл фосфатного буфера рН 7,4. До отриманого гомогенату тканини додають 40 мкл спінового уловлювача TEMPONE-H (розведення 2 мг в 2 мл буфера), extempore перемішують, переносять в спеціальну парамагнітно чисту кварцову кювету і знімають спектри ЕПР тричі з інтервалом 3 хвилини. З отриманих спектрів розраховують швидкість генерування супероксидних радикалів в нМ/г тканини/хв. Межа розподілу між умовно

20 високим та низьким рівнями генерування СР дорівнює 0,35 нМ/г*тк*хв, тобто, рівні генерування $Ср < 0,35$ нМ/г*тк*хв вважались низькими, а рівні генерування $Ср > 0,35$ нМ/г*тк*хв вважались високими.

Іншу частину отриманого під час операції зразка зберігають в рідкому азоті при температурі -180 °С не більше ніж 1 місяць і визначають в ньому концентрації активних та латентних форм ММП-2 та ММП-9 методом зимографії в 12 % ПААГ з додецилсульфатом натрію і 0,1 % желатину як субстрату [14]. 50 мг жирової тканини гомогенізують в 1 % розчині додецилсульфату натрію, гомогенат центрифугують при 3000 об./хв., 20 мкл надосаду вносять в лунки гелю та проводять електрофорез при температурі +4 °С, в напрузі електричного поля

30 150 V, протягом 4 годин. Після розділення досліджуваних білків гель відмивають в 2,5 % розчині тритону X-100, потім інкубують в буфері з додаванням хлориду кальцію (рН=7,5) впродовж 18 годин при температурі +37 °С, фіксували та забарвлюють 0,25 % Кумасі діамантовим синім. Після відмивання гелю у розчині оцтової кислоти з метанолом протеолітична активність ММП-2 та ММП-9 візуалізується у вигляді знебарвлених смужок на синьому тлі, а їхня локалізація

35 відповідає молекулярній масі кожного із ферментів, які визначають за стандартами молекулярних мас. Оцінку протеолітичної активності проводять шляхом виміру площі зони лізису та визначають концентрації активних форм ферментів, використовуючи стандартний набір матриксних металопротеїназ. Межа розподілу між умовно високою та низькою концентраціями активних форм ферментів дорівнює 2,0 мкг/г тканини для ММП-2 та 4,5 мкг/г

40 тканини для ММП-9, тобто, концентрації активних форм ММП-2 $< 2,0$ мкг/г тканини та ММП-9 $< 4,5$ мкг/г тканини вважались низькими, а концентрації активних форм ММП-2 $> 2,0$ мкг/г тканини та ММП-9 $> 4,5$ мкг/г тканини вважались високими.

Встановлено, що у обстежених хворих, в прилеглій до пухлини жировій тканині яких виявлені високі рівні генерування СР та концентрації активних форм ММП-2 та ММП-9, агресивність пухлини вважається високою, що є основою для прогнозування несприятливого перебігу захворювання.

Встановлено, що у обстежених хворих, в прилеглій до пухлини жировій тканині яких виявлені низькі рівні генерування СР та концентрації активних форм ММП-2 та ММП-9, агресивність пухлини вважається низькою, що є основою для прогнозування сприятливого перебігу захворювання.

50 Критеріями ефективності використаного способу є покращання раннього виявлення рецидивів та/або метастазів пухлини, корекції схем лікування, що призводить до підвищення ефективності терапії та подовження життя хворих на РПК.

За розробленою методикою обстежено 43 хворих на РПК. У 25 хворих виявлено високу агресивність пухлини та встановлено несприятливий прогноз перебігу захворювання, у 18 – низьку агресивність пухлини та сприятливий прогноз перебігу захворювання. Прикладами реалізації заявленого способу можуть вважатися наведені витяги з історій хвороби двох хворих.

Приклад І. Хвора Б. (історія хвороби № 1400, ПГЗ № 5210-6, аденокарцинома прямої кишки, T4N0M0G2, стадія ІІВ), якій проведено неoad'ювантний курс дистанційної гамма-терапії на

ділянку пухлини до сумарної дози 39 Гр (разова доза - 3 Гр, 13 сеансів). Через 4 тижні прооперована з приводу видалення пухлини.

Під час оперативного втручання з приводу видалення пухлини отримано зразок прилеглої до пухлини жирової тканини.

Частину зразка зберігали на холоді (від 0 до +4 °C) впродовж 4-5 годин та визначали в ній швидкість генерування супероксидних радикалів методом ЕПР з використанням технології Spin Traps за кімнатної температури. Для цього 250 мг жирової тканини гомогенізували в скляному гомогенізаторі з додаванням 0,5 мл фосфатного буфера pH 7,4. До отриманого гомогенату тканини додавали 40 мкл спінового уловлювача TEMPONE-H (розведення 2 мг в 2 мл буфера), extempore перемішували, переносили в спеціальну парамагнітно чисту кварцову кювету і знімали спектри ЕПР тричі з інтервалом 3 хвилини. З отриманих спектрів розраховували швидкість генерування супероксидних радикалів в нМ/г тканини·хв. Рівень генерування СР дорівнював 0,67 нМ/г·тк·хв, тобто був вищим від 0,35 нМ/г·тк·хв, і вважався високим.

Іншу частину отриманого під час операції зразка зберігали в рідкому азоті при температурі -180 °C не більше ніж 1 місяць і визначали в ньому концентрації активних та латентних форм ММП-2 та ММП-9 методом зимографії в 12 % ПААГ з додецилсульфатом натрію і 0,1 % желатину як субстрату. 50 мг жирової тканини гомогенізували в 1 % розчині додецилсульфату натрію, гомогенат центрифугували при 3000 об./хв., 20 мкл надосаду вносили в лунки гелю та проводили електрофорез при температурі +4 °C, в напрузі електричного поля 150 V, 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 °C, фіксували та забарвлювали 0,25 % Кумассі діамантовим синім. Після відмивання гелю у розчині оцтової кислоти з метанолом протеолітична активність ММП-2 та ММП-9 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 концентрації активних форм ферментів, використовуючи стандартний набір матриксних металопротеїназ. Концентрація активних форм ММП-2 становила 3,6 мкг/г тканини, а ММП-9-8, 3 мкг/г тканини, що більше ніж 2,0 та 4,5 мкг/г тканини, відповідно, тому наведені показники вважаються високими.

Таким чином, в прилеглій до пухлини жировій тканині хворої Б. виявлені високі рівні генерування СР та концентрації ММП-2 і ММП-9. За цих умов прогноз перебігу захворювання є несприятливим. Тривалість життя хворого становила 42,5 тижня.

Приклад II. Хворий Ш. (історія хвороби № 603, ПГЗ № 17062, аденокарцинома прямої кишки, T2N0M0G2, стадія IIA), якому проведено неоад'ювантний курс дистанційної гамма-терапії на ділянку пухлини до сумарної дози 39 Гр (разова доза - 3 Гр, 13 сеансів). Через 4 тижні виконана операція з приводу видалення пухлини.

Під час оперативного втручання з приводу видалення пухлини отримано зразок прилеглої до пухлини жирової тканини.

Частину зразка зберігали на холоді (від 0 до +4 °C) впродовж 4-5 годин та визначали в ній швидкість генерування супероксидних радикалів методом ЕПР з використанням технології Spin Traps за кімнатної температури. Для цього 250 мг жирової тканини гомогенізували в скляному гомогенізаторі з додаванням 0,5 мл фосфатного буфера pH 7,4. До отриманого гомогенату тканини додавали 40 мкл спінового уловлювача TEMPONE-H (розведення 2 мг в 2 мл буфера), extempore перемішували, переносили в спеціальну парамагнітно чисту кварцову кювету і знімали спектри ЕПР тричі з інтервалом 3 хвилини. З отриманих спектрів розраховували швидкість генерування супероксидних радикалів в нМ/г тканини·хв. Рівень генерування СР дорівнював 0,23 нМ/г·тк·хв, тобто був нижчим від 0,35 нМ/г·тк·хв, і вважався низьким.

Іншу частину отриманого під час операції зразка зберігали в рідкому азоті при температурі -180 °C не більше ніж 1 місяць і визначали в ньому концентрації активних та латентних форм ММП-2 та ММП-9 методом зимографії в 12 % ПААГ з додецилсульфатом натрію і 0,1 % желатину як субстрату [14]. 50 мг жирової тканини гомогенізували в 1 % розчині додецилсульфату натрію, гомогенат центрифугували при 3000 об./хв., 20 мкл надосаду вносили в лунки гелю та проводили електрофорез при температурі +4 °C, в напрузі електричного поля 150 V, 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 °C, фіксували та забарвлювали 0,25 % Кумассі діамантовим синім. Після відмивання гелю у розчині оцтової кислоти з метанолом протеолітична активність ММП-2 та ММП-9 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 концентрації активних форм ферментів, використовуючи стандартний набір матриксних металопротеїназ. Концентрація активних форм ММП-2 становила 1,2 мкг/г тканини, а ММП-9 – 3,6 мкг/г тканини, що менше, ніж 2,0 та 4,5 мкг/г тканини, відповідно, тому наведені показники вважаються низькими.

Таким чином, в прилеглій до пухлини жировій тканині хворого Ш. виявлені низькі рівні генерування СР та концентрації ММП-2 і ММП-9. За цих умов прогноз перебігу захворювання є сприятливим. Тривалість життя хворого становила 112 тижнів.

Запропонований спосіб прогнозування перебігу захворювання у хворих на рак прямої кишки завдяки визначенню рівнів генерування супероксидних радикалів та концентрацій активних форм ММП-2 та ММП-9 в прилеглій до пухлини жировій тканині дозволяє визначити ступінь агресивності пухлини і характер перебігу захворювання у хворих на рак прямої кишки, що дає можливість корегувати подальшу тактику лікування.

Джерела інформації:

1. Zhen-Qiang Sun, Xiao-Na Han, Hai-Jiang Wang, et al. Prognostic significance of preoperative fibrinogen in patients with colon cancer // World J Gastroenterol. - 2014. - V.20. - P. 8583-91.

2. Marisa L, de Reynie's A, Duval A, et al. Gene Expression Classification of Colon Cancer into Molecular Subtypes: Characterization, Validation, and Prognostic Value. PloS Med. 2013;10:e1001453.

3. Zhang JX, Song W, Chen ZH, et al. Prognostic and predictive value of a microRNA signature in stage II colon cancer: a microRNA expression analysis. Lancet Oncol. 2013;14:1295-306.

4. Xiong W, Mactaggart J, Knispel R, et al. Inhibition of reactive oxygen species attenuates aneurysm formation in a murine model. Atherosclerosis 2009; 202(1): 128-34.

5. Lee KJ, Hwang SJ, Choi JH, et al. Saponins derived from the roots of Platycodongrandiflorum inhibit HT-1080 cell invasion and MMPs activities: regulation of NF-kappaB activation via ROS signal pathway. Cancer Lett 2008; 268(2): 233-43.

6. Yu F, Kamada H, Niizuma K, et al. Induction of mmp-9 expression and endothelial injury by oxidative stress after spinal cord injury. Jneurotrauma 2008; 25(3): 184-95.

7. Shin MH, Moon YJ, Seo JE, et al. Reactive oxygen species produced by NADPH oxidase, xanthine oxidase, and mitochondrial electron transport system mediate heat shock-induced MMP-1 and MMP-9 expression. Free RadicBiol Med 2008; 44(4): 635-45.

8. Бурлака А.П., Голотюк В.В., Вовк А.В., Лукін С.М., Сидорик Є.П. Вплив O_2 та NO -генеруючої активності нейтрофілів на ефективність неoad'ювантної променевої терапії у хворих на рак прямої кишки. Онкологія 2015; 17, 4(66): 253-257.

9. Бурлака А.П., Голотюк В.В., Вовк А.В., Лукін С.М., Сидорик Є.П. Редокс-стан тромбоцитів у хворих на рак прямої кишки та його вплив на ефективність лікування. Онкологія 2015; 17, 2(64): 96 - 101.

10. Chu D, Zhang Z, LiYetal. Matrix metalloproteinase-9 is associated with disease-free survival and overall survival in patients with gastric cancer. Int. J. Cancer. 2011; 129: 887-95.

11. Zhi YH, Song MM, Wang PL, et al. Suppression of matrix metalloproteinase-2 via RNA interference inhibits pancreatic carcinoma cell invasiveness and adhesion. World J Gastroenterol 2009; 15(9): 1072-8.

12. Mook ORF, Frederiks WM, Van Noorden CJF. The role of gelatinases in colorectal cancer progression and metastasis. BiochimetBiophysActa 2004; 1705: 69-89.

13. Khandekar M, Cohen P, Spiegelman B. Molecular mechanism of cancer development in obesity. Nature 2011; 11: 886-95.

14. Inhibition of invasion and metastasis in cells transfected with an inhibitor of metalloproteinases / YA. De Clerk, N. Perez, H. Shimada et al. // Cancer research.

ФОРМУЛА КОРИСНОЇ МОДЕЛІ

Спосіб прогнозування перебігу захворювання у хворих на рак прямої кишки, що включає визначення рівнів генерування супероксидних радикалів, який **відрізняється** тим, що рівні генерування супероксидних радикалів та, додатково до них, концентрації активних форм матриксних металопротеїнази-2 та металопротеїнази-9 визначають в прилеглій до пухлини жировій тканині, і при рівнях генерування супероксидних радикалів, вищих ніж 0,35 нм/г*тк*хв, та концентраціях активних форм матриксних металопротеїнази-2 та металопротеїнази-9, вищих ніж відповідно 2,0 та 4,5 мкг/г тканини, прогнозують несприятливий перебіг захворювання, а при рівнях генерування супероксидних радикалів, нижчих ніж 0,35 нм/г*тк*хв, та концентраціях

активних форм матричних металопротеїнази-2 та металопротеїнази-9, нижчих ніж відповідно 2,0 та 4,5 мкг/г тканини, прогнозують сприятливий перебіг захворювання.

Комп'ютерна верстка О. Гергіль

Міністерство економічного розвитку і торгівлі України, вул. М. Грушевського, 12/2, м. Київ, 01008, Україна

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