

Патент на корисну модель 63533 України, МПК (2011.01) А 61 В 10/00. Спосіб оцінки ефективності поліхіміотерапії у хворих на рак сечового міхура / Е.О. Стаховський, Я.Б. Блюм, О.І. Яцина, Ю.В. Вітрук, О.А. Войленко, А.І. Ємець, Я.О. Шеремет, С.В. Вернигородський ; Національний інститут раку. – № u201103494 ; заявл. 24.03.2011 ; опубл. 10.10.2011. – Бюл. № 19.

Заявка відноситься до галузі медицини, зокрема, до онкології, і може бути використана при лікуванні хворих на інвазивні та поверхневі форми раку сечового міхура.

Відомо, що для оцінки ефективності поліхіміотерапії у хворих на рак сечового міхура (PCM) необхідно провести комплекс морфологічних [1] та лабораторних [2] досліджень, які різняться за точністю результатів і складністю виконання. Найбільш відомими методами оцінки ефективності проведеної поліхіміотерапії є проточна цитофлуориметрія, яка потребує для аналізу тільки свіжого операційного матеріалу [3].

За прототип обрано метод гелелектофорезу (Impaired DNA repair as assessed by the "comet" assay in patients with thyroid tumors after a history of radiation therapy: a preliminary study / F. Leprat et al. // Int. J Radiat. Oncol. Biol. Phys. – 1998 – Vol. 40. – P. 1019-1026), при використанні якого доказом наявності клітин, що загинули шляхом апоптозу є виявлення дискретної нуклеосомної «драбинки» з розміром фрагментів, що кратні 200 парам нуклеотидів (одній нуклеосомній одиниці), що підтверджується за допомогою маркерів молекулярної маси. Необхідність такого контролю обумовлена принциповими відмінностями в характері гідролізу ДНК при некрозі та апоптозі. В першому випадку спостерігається деградація нуклеїнових кислот неспецифічними ДНКазами з утворенням дрібних фрагментів, які мають чіткі відмінності в характері електрорухливості при гелі електрофорезі.

Позитивним в прототипі є те, що дана методика дає можливість виявити наявність апоптичних процесів в досліджуваній тканині.

Недоліком прототипу є те, що для виконання аналізу необхідна достатня кількість досліджуваного зразка, що обумовлено чутливістю флуоресцентних барвників (бромистого етидію), що використовується для забарвлення ДНК.

В основу винаходу поставлено задачу удосконалити спосіб оцінки ефективності поліхіміотерапії у хворих на рак сечового міхура шляхом визначення в операційному матеріалі кількості апоптичних клітин, що дасть можливість оцінити ефективність проведеного лікування та адекватно спланувати подальшу тактику ведення хворого.

Поставлена задача вирішується таким чином:

Оскільки апоптоз тісно пов'язаний з фрагментацією ДНК, єдиним методом на сьогоднішній день для ідентифікації розривів ланцюга ДНК є молекулярно-генетичний метод – TUNEL (Terminal deoxynucleotidyl Transferase Nick End Labeling). Даний метод також може використовуватись для оцінки життєздатності нормальних, нетрансформованих тканин.

Він також є, одним з найбільш специфічних методів детекції апоптичних клітин. Метод *in situ* поміченої фрагментованої ДНК (TUNEL-метод), дозволяє розрізнити апоптичні клітини від тих, що загинули шляхом некрозу [5, 6].

TUNEL-метод має ряд переваг: можливість використання як на окремих клітинах, так і на парафінових та заморожених зрізах, отримання кількісної оцінки апоптичних клітин, одночасного аналізу великої кількості зразків, відносна простота здійснення метода, висока чутливість. В основі метода лежить включення флуоресцентоміченого дезоксінуклеотиду в пошкоджену ДНК.

В порівнянні з вище перерахованими методами TUNEL дозволяє паралельне проведення імуногістохімічних та окремих гістохімічних реакцій на одному й тому самому зрізі.

У хворого біопсійний матеріал отримують під час оперативного втручання або цистоскопічного дослідження за допомогою резектоскопу (Richard Wolf, Німеччина). Шматочки слизової оболонки сечового міхура (з muscularis mucosae включно) вилучають з уражених пухлиною відділів. Фіксують в 10% розчині нейтрального формаліну (pH 7,4) протягом 24 годин. Після дегідратації їх заливають у високо очищений парафін з полімерними добавками (Richard-Allan Scientific) при температурі не вище 60°C та під візуальним контролем біоптата у блоці. Зріз має проходити перпендикулярно до поверхні слизової оболонки. На ротаційному мікротомі Microm HM 325 з системою переносу зрізів STS (Carl Zeiss, Німеччина) виготовляють серійні гістологічні зрізи товщиною (5±1 мкм), які монтують на предметне скло зі спеціальним адгезивним покриттям.

Для визначення нуклеосомної фрагментації ДНК *in situ* проводять TUNEL-аналіз, використовуючи набір In Situ Cell Death Detection Kit, TMR red # 12156792910 (Pierce, Німеччина) за такою послідовністю:

Triton X-100 в 0,1 цитраті натрію протягом 5 хв. на льодовій бані;

- депарафінізація підготовлених зрізів пухлин ксилолом протягом 5 хвилин при кімнатній температурі;
- до зразків додають чистий розчин ксилолу та інкубують їх протягом 7 хвилин при кімнатній температурі на шейкері.
- дегідратацію зразків виконують шляхом інкубації зразків у серії етилових спиртів: абсолютному спирті, 90%-му, 80%-му, 70%-му розчині етилового спирту та 50%-му етанолі;
- зразки промиваються тричі в розчині фосфатного буферу PBS;
- пермеабілізацію плазматичної мембрани проводять в 0,1%-му розчині 6. до зразків додають реакційну суміш, що містить флуоресцентно мічений дезоксинуклеотид і термінальну дезоксинуклеотидил трансфер азу та інкубують при 37°C впродовж 1 години в темряві.

Ядра клітин візуалізують за допомогою 4,6-діаміно-2-феніліндолу (DAPI) (Sigma, США) в концентрації 10 мг/л. TUNEL-реакцію детектували,

використовуючи конфокальний лазерний скануючий мікроскоп LSM 510 META (Carl Zeiss).

Приготовлені зразки досліджували з наступною мультиканальною конфігурацією:

- канал для DAPI: збудження діодним лазером ультрафіолетового діапазону (UV) з довжиною хвилі 405 нм (інтенсивність роботи лазера 10-15 %), розділяючий фільтр HFT 405/488, дзеркало, фільтр емісії BP 420-480 нм.
- канал для візуалізації тетраетил-родаміну (детекція апоптотичних клітин): збудження лазером видимого діапазону світла (VIS) гелій-неонним лазером з довжиною хвилі 543 нм (інтенсивність роботи лазера 65 %), розділяючий фільтр HFT 488/543, дзеркало, фільтр емісії LP 560.
- використовували об'єктив Plan-Apochromat 63*/1,4 Oil DIC. На основі серійних оптичних зрізів, зроблених з інтервалом 0,3-0,5 мкм, будували тривимірні моделі за допомогою програмного забезпечення version 4.0 SP2 (Carl Zeiss, Німеччина).

Показник апоптичного індексу виражався у відсотковому співвідношенні клітин, що перебували в стані апоптозу із розрахунку на 200 досліджених пухлинних клітин.: до 10% TUNEL позитивних – неефективна поліхіміотерапія, при наявності 10% - 30% - низька ефективність, 30-60% помірна ефективність та > 60% - висока ефективність полі хіміотерапії за стандартною схемою лікування інвазивного раку сечового міхура згідно Guidelines European Assotiation of Urology, 2010.

Таким чином, на основі застосування наведеного способу можна чітко визначитися з ефективністю проведеної ПХТ у хворих на рак сечового міхура.

Прикладом конкретного виконання способу є витяги з історії хвороб двох хворих.

І. Хворий Г., 63 роки. Історія хвороби № 6673. Звернувся за допомогою 06.06.2010 р. зі скаргами на гематурію протягом останніх 3-х місяців. При дообстеженні по результатах комп'ютерної томографії (КТ) було виявлене утворення сечового міхура. 08.02.2010 р. виконано цистоскопія, ТУР –біопсія утворення. Патогістологічний висновок № 3474/10 від 11.02.2010: помірно диференційований перехідноклітинний рак сечового міхура з інвазією м'язового шару. Встановлено діагноз: Ca vesicae urinae T2aNxM0 G2 стадія II клінічна група 2. За тиждень вирішено розпочати проведення курсу поліхімеотерапії (ПХТ) за схемою Гемцетабін-Цисплатин. Після проведення 3-х курсів ПХТ виконана повторна цистоскопія та ТУР –біопсія утворення.

Для визначення нуклеосомної фрагментації ДНК *in situ* провели TUNEL-аналіз, використовуючи набір In Situ Cell Death Detection Kit, TMR red # 12156792910 (Pierce, Німеччина) за такою послідовністю:

Triton X-100 в 0,1 цитраті натрію протягом 5 хв. на льодовій бані;

- депарафінізували підготовлені зрізи пухлин ксилолом протягом 5 хвилин при кімнатній температурі;
- до зразків додали чистий розчин ксилолу та інкубували їх протягом 7 хвилин при кімнатній температурі на шейкері.
- дегідратацію зразків виконували шляхом інкубації зразків у серії етилових спиртів: абсолютному спирті, 90%-му, 80%-му, 70%-му розчині етилового спирту та 50%-му етанолі;
- зразки промили тричі в розчині фосфатного буферу PBS;
- пермеабілізацію плазматичної мембрани провели в 0,1%-му розчині б, до зразків додали реакційну суміш, що містить флуоресцентно мічений дезоксинуклеотид і термінальну дезоксинуклеотидил трансферазу та інкубували при 37⁰С впродовж 1 години в темряві.

Ядра клітин візуалізували за допомогою 4,6-діаміно-2-феніліндолу (DAPI) (Sigma, США) в концентрації 10 мг/л. TUNEL-реакцію детектували, використовуючи конфокальний лазерний скануючий мікроскоп LSM 510 META (Carl Zeiss).

Приготовлені зразки досліджували з наступною мультиканальною конфігурацією:

- канал для DAPI: збудження діодним лазером ультрафіолетового діапазону (UV) з довжиною хвилі 405 нм (інтенсивність роботи лазера 10-15 %), розділяючий фільтр HFT 405/488, дзеркало, фільтр емісії BP 420-480 нм.
- канал для візуалізації тетраетил-родаміну (детекція апоптотичних клітин): збудження лазером видимого діапазону світла (VIS) гелій-неонним лазером з довжиною хвилі 543 нм (інтенсивність роботи лазера 65 %), розділяючий фільтр HFT 488/543, дзеркало, фільтр емісії LP 560.
- використовували об'єктив Plan-Apochromat 63*/1,4 Oil DIC. На основі серійних оптичних зрізів, зроблених з інтервалом 0,3-0,5 мкм, будували тривимірні моделі за допомогою програмного забезпечення version 4.0 SP2 (Carl Zeiss, Німеччина).

Виявлено, що 55% ракових клітин дали позитивну реакцію (фіг. 1). Таким чином, кількість апоптично змінених ракових клітин сечового міхура (55%) знаходиться в межах 30-60%, що свідчить про помірну ефективність заснованої полі хіміотерапії.

П. Хворий Ф., 59 років. Історія хвороби № 1023. Звернувся за допомогою 02.02.2009 р. зі скаргами на гематурію протягом останніх 5-ти місяців. При до обстеженні за результатами КТ виявлене утворення сечового міхура. 25.08.2009 р. виконано цистоскопія, ТУР –біопсія утворення. Патогістологічний висновок №63-82/06: високо диференційований перехідноклітинний рак сечового міхура з глибокою інвазією м'язового шару. Встановлено діагноз: Ca vesicae urinae T2bNxM0 G1 стадія II клінічна група 2. Вирішено розпочати проведення курсу поліхіміотерапії (ПХТ) за схемою Гемцетабін-Цисплатин , після проведення 3х курсів ПХТ виконана повторна цистоскопія, ТУР –біопсія утворення. Матеріал слизової оболонки сечового міхура відправлено для дослідження за методом TUNEL

Для визначення нуклеосомної фрагментації ДНК *in situ* провели TUNEL-аналіз, використовуючи набір In Situ Cell Death Detection Kit, TMR red # 12156792910 (Pierce, Німеччина) за такою послідовністю:

Triton X-100 в 0,1 цитраті натрію протягом 5 хв. на льодовій бані;

- депарафінізували підготовлені зрізи пухлин ксилолом протягом 5 хвилин при кімнатній температурі;
- до зразків додали чистий розчин ксилолу та інкубували їх протягом 7 хвилин при кімнатній температурі на шейкері.
- дегідратацію зразків виконували шляхом інкубації зразків у серії етилових спиртів: абсолютному спирті, 90%-му, 80%-му, 70%-му розчині етилового спирту та 50%-му етанолі;
- зразки промили тричі в розчині фосфатного буферу PBS;
- пермеабілізацію плазматичної мембрани провели в 0,1%-му розчині 6, до зразків додали реакційну суміш, що містить флуоресцентно мічений дезоксинуклеотид і термінальну дезоксинуклеотидил трансферазу та інкубували при 37⁰С впродовж 1 години в темряві.

Ядра клітин візуалізували за допомогою 4,6-діаміно-2-феніліндолу (DAPI) (Sigma, США) в концентрації 10 мг/л. TUNEL-реакцію детектували, використовуючи конфокальний лазерний скануючий мікроскоп LSM 510 META (Carl Zeiss).

Приготовлені зразки досліджували з наступною мультиканальною конфігурацією:

- канал для DAPI: збудження діодним лазером ультрафіолетового діапазону (UV) з довжиною хвилі 405 нм (інтенсивність роботи лазера 10-15 %), розділяючий фільтр HFT 405/488, дзеркало, фільтр емісії BP 420-480 нм.
- канал для візуалізації тетраетил-родаміну (детекція апоптотичних клітин): збудження лазером видимого діапазону світла (VIS) гелій-неонним лазером з довжиною хвилі 543 нм (інтенсивність роботи

лазера 65 %), розділяючий фільтр НФТ 488/543, дзеркало, фільтр емісії LP 560.

- використовували об'єктив Plan-Apochromat 63*/1,4 Oil DIC. На основі серійних оптичних зрізів, зроблених з інтервалом 0,3-0,5 мкм, будували тривимірні моделі за допомогою програмного забезпечення version 4.0 SP2 (Carl Zeiss, Німеччина).

В зразках пухлини РСМ за допомогою TUNEL-реакції було виявлено збільшення загальної кількості клітин, які загинули шляхом апоптоза (78%), тобто більше 60%, що корелювало з позитивною динамікою в клінічній картині. Таким чином, заснована ПХТ була високоефективною.

Джерела інформації

1. Сапожников А.Г. Гистологическая и микроскопическая техника / А.Г. Сапожников, А.Е. Доросевич : Руководство. – Смоленск: САУ, 2000. – 476 с.
2. Клиническая лабораторная аналитика Том II. Частные аналитические технологии в клинической лаборатории / Под редакцией В.В. Меньшикова – М.: Лабинформ-РАМЛД. – 1999. – 352 с.
3. Letworasirikul T. A rapid measurement of apoptosis-associated light scatter changes using a hematology analyzer / T. Letworasirikul, A. Bunyaratvej // *Cytometry*. – 2000. – Vol. 42. – P. 215-217.
4. Impaired DNA repair as assessed by the "comet" assay in patients with thyroid tumors after a history of radiation therapy: a preliminary study / F. Leprat et al. // *Int. J Radiat. Oncol. Biol. Phys.* – 1998 – Vol. 40. – P. 1019-1026 (прототип).
5. Detection of apoptotic cells in cytology specimens: an application of TdT-mediated dUTP-biotin nick end labeling to cell smears / H. Sasano et al. // *Diagn. Cytopatol.* – 1998. – Vol. 18. – P. 398-402.

6. Two-color fluorescence detection of Poly (ADP-Ribose) Polymerase-1 (PARP-1) cleavage and DNA strand breaks in etoposide-induced apoptotic cells / C. Soldani et al. // *Eur. J. Histochem.* – 2001. – Vol. 45. – P. 389-392.