



ДЕРЖАВНА СЛУЖБА  
ІНТЕЛЕКТУАЛЬНОЇ  
ВЛАСНОСТІ  
УКРАЇНИ

УКРАЇНА

(19) **UA** (11) **76768** (13) **U**  
(51) МПК (2013.01)  
**A61B 10/00**

## (12) ОПИС ДО ПАТЕНТУ НА КОРИСНУ МОДЕЛЬ

(21) Номер заявки: <b>u 2012 09011</b>	(72) Винахідник(и): <b>Харченко Олександр Вікторович (UA), Марковський Володимир Дмитрович (UA), Балацький Віктор Миколайович (UA)</b>
(22) Дата подання заявки: <b>23.07.2012</b>	(73) Власник(и): <b>ХАРКІВСЬКИЙ НАЦІОНАЛЬНИЙ МЕДИЧНИЙ УНІВЕРСИТЕТ, пр. Леніна, 4, м. Харків, 61022, Україна (UA)</b>
(24) Дата, з якої є чинними права на корисну модель: <b>10.01.2013</b>	(74) Представник: <b>Євтушенко Тамара Григорівна</b>
(46) Публікація відомостей про видачу патенту: <b>10.01.2013, Бюл.№ 1</b>	

## (54) СПОСІБ ДІАГНОСТИКИ ІНФІЛЬТРАТИВНО-ВИРАЗКОВОГО РАКУ ШЛУНКА

### (57) Реферат:

Спосіб діагностики інфільтративно-виразкового раку шлунка, який включає патогістологічні та ПЛР дослідження біоптату або крові, причому при виявленні в біоптаті патогістохімічним методом вираженої дисплазії епітелію слизової оболонки шлунка дослідження по виявленню пухлинних клітин продовжують шляхом ПЛР із застосуванням ISSR-PCR методу, при цьому досліджують периферичну кров пацієнта і при виявленні ДНК-профілів розміром 520-620 пар нуклеотидів діагностують виразково-інфільтративний рак шлунка.

UA 76768 U

Корисна модель стосується медицини, а саме онкології та патоморфології, і може бути використаною для діагностики інфільтративно-виразкового раку шлунка.

Прояви клінічної картини раку шлунка пов'язані з локалізацією пухлини, формою росту, поширеністю процесу, ускладненнями. Форми раку шлунка виділяють у зв'язку з перевагою тих або інших симптомів. Серед виразкових форм раку шлунка виділяють первинно-виразкову й інфільтративно-виразкову форми. Найчастіше клінічна картина носить складний характер. Так, інфільтративно-виразкова форма раку шлунка на ранніх стадіях може протікати під маскою доброякісної виразки, добре піддаючись консервативному лікуванню й симулюючи загоєння виразки.

Інфільтративно-виразковий рак характеризують виражена канкроза інфільтрація стінки й укривання виразками пухлини, які можуть конкурувати в часовій послідовності. Морфологія інфільтративно-виразкового раку надзвичайно різноманітна - це невеликі виразки різної глибини з великою інфільтрацією стінки або величезні виразки з горбистим дном і плоскими краями. При гістологічному дослідженні виявляється як аденокарцинома, так і недиференційований рак. Інфільтративно-виразкова форма раку шлунка може давати рентгенологічну й ендоскопічну картину доброякісної виразки. Тому остаточний висновок про характер виразки може бути зроблений тільки після комплексного дослідження біоптатів, взятих із країв і дна виразки.

Диференціальну діагностику між первинно-виразковою формою раку шлунка й виразковою хворобою шлунка виконують поетапно. На першому етапі виконують комплексне рентгено-ендоскопічне обстеження шлунка, причому, як первинний метод дослідження раціонально використовувати рентгенологічний; з урахуванням рентгенологічних ознак, необхідно виконати гастроскопію з біопсією підозрілих ділянок, причому біопсію необхідно виконувати не тільки на підставі візуальних ендоскопічних ознак, але й з урахуванням ознак, виявлених при рентгенологічному, УЗД й РКТ дослідженні навіть якщо під час ендоскопії візуальні ознаки відсутні. На другому етапі виконують трансабдомінальне ультразвукове дослідження, метою якого є пошук додаткових внутрішньоорганних ознак характеру виявленої виразки, а також пошук позаорганних проявів виразки шлунка в черевній порожнині. На третьому етапі при нерозв'язанні диференційно-діагностичних труднощів, а також у випадку відсутності морфологічного підтвердження пухлинного прояву проводять рентгенівську комп'ютерну томографію. На четвертому етапі з метою динамічного спостереження за характером внутрішньоорганних змін у процесі лікування й рубцювання виразки шлунка виконують ендоскопічне (з біопсією) і ультразвукове дослідження.

Клінічні критерії диференціальної діагностики виразок злоякісної й доброякісної природи не можуть бути визнані досить надійними, навіть констатація доброякісного характеру виразки шлунка далеко не вичерпує всіх діагностичних проблем. Але досягнення молекулярної біології зробили можливим виявлення окремих пухлинних клітин в біологічних зразках, перш за все в периферичній крові. Ці циркулюючі пухлинні клітини можуть бути виявлені в крові за допомогою надзвичайно чутливого методу, який базується на полімеразній ланцюговій реакції (ПЛР).

Висока чутливість методу дозволяє виявити аномальну ДНК в мізерній кількості ( $10^{-15}$  -  $10^{-18}$  ступені), що означає виявлення неопластичних клітин на доклінічній стадії пухлинного процесу [Пат. № 2204835 Россия, МПК G01N 33/50, C12Q 1/68. Діагностика рака желудка на ранней стадии / Ристимьяки Ари (FI), Хярккенен Матти (FI), Сиппонен Пентти (FI); БИОХИТ ОЙИ (FI). - 3. № 99121656/14; заявл. 18.03.1998; опубл. 20.06.2003].

Даний спосіб діагностики раку шлунка є найбільш близьким до того, що заявляється, за технічною суттю і результатом, який може бути досягнутим, тому його вибрано за прототип.

Основним недоліком способу-прототипу є складність його використання.

У зв'язку з вищевикладеним, в основу корисної моделі поставлено задачу спрощення способу діагностики інфільтративно-виразкового раку шлунка при високій точності.

Задачу, яку поставлено в основу корисної моделі, вирішують тим, що у відомому способі діагностики інфільтративно-виразкового раку шлунка, який включає патогістологічні та ПЛР дослідження біоптату або крові, згідно з корисною моделлю, при виявленні в біоптаті патогістохімічним методом вираженої дисплазії епітелію слизової оболонки шлунка дослідження по виявленню пухлинних клітин продовжують шляхом ПЛР із застосуванням ISSR-PCR методу, при цьому досліджують периферичну кров пацієнта і при виявленні ДНК-профілів розміром 520-620 пар нуклеотидів діагностують виразково-інфільтративний рак шлунка.

Технічний ефект способу, що заявляється, обумовлений синергізмом сукупності етапів розробленої технології, порядком виконання цих етапів та умовами, при яких кожний із етапів може бути виконаним. Методика ISSR-PCR розрахована на чутливий та специфічний пошук пухлинних клітин, який дає можливість лікарю-патологоанатому диференціювати дисплазію від раку та виявляти пухлинні клітини в периферичній крові. Виявлені пухлинні клітини в крові

вказують на підвищену здатність клітин первинної пухлини до дисемінування та ризик раннього метастазування в різні органи. У хворих на рак шлунка з категорією M<sub>0</sub> необхідне проведення досліджень по виявленню пухлинних клітин в периферичній крові з метою уточнення стадії захворювання, формування груп ризику за раннім метастазуванням та складання оптимальних схем лікування. Такі дослідження можуть бути корисними і для прогнозування перебігу захворювання та вибору найбільш ефективного в кожному конкретному випадку методу терапії і ранньої оцінки її ефективності.

Спосіб виконують наступним чином: при виявленні в біоптаті патогістохімічним методом вираженої дисплазії (Д-III) епітелію слизової оболонки шлунка продовжують дослідження по виявленню пухлинних клітин шляхом ПЛП із застосуванням ISSR-PCR методу. Досліджують периферичну кров пацієнта і при виявленні ДНК-профілів розміром 520-620 пар нуклеотидів діагностують виразково-інфільтративний рак шлунка.

Ефективність способу доказана експериментально: в комплексі заходів з діагностики раку шлунка, особливо ранніх його форм, виконували дослідження ендоскопічних біопсій. При цьому контролювали репрезентативність матеріалу (взяття численних шматочків, особливо при підозрі під час ендоскопії на інфільтративне новоутворення, і вирізка їх на всю глибину слизової оболонки), а також якість його обробки. Недостатньо репрезентативний матеріал може бути причиною хибнонегативних висновків. Неправильна орієнтація шматочків тканини при зануренні їх в парафін складає додаткові диференційно-діагностичні труднощі і може привести патологоанатома до хибнопозитивного висновку.

Відомо, що основний спосіб розмноження клітин - ділення шляхом мітозу. Це найкращий спосіб репродукції, що забезпечує виникнення генетично рівноцінних клітин і зберігає наступність хромосом в ряду клітинних поколінь. Порушення розмноження клітин і прогресуючий необмежений ріст - основні ознаки злоякісних пухлин. Базою для вивчення закономірностей пухлинного росту і проліферації клітин в процесі канцерогенезу слугує дослідження життєвого циклу клітин і кінетики популяцій.

Тому для оцінки вираження певних порушень мітозу в дослідженні було використано методу виявлення мітотичного режиму. Під мітотичним режимом (MP) тканини розуміли сукупність кількісних показників, що характеризують мітотичне ділення клітин. Виявлення таких спонтанно виниклих змін мітотичного режиму тканини, як збільшення мітотичної активності із збільшенням клітин, що знаходяться в стадії метафази, і зростанням частоти патологічних мітозів, характерно для злоякісного пухлинного росту.

Дослідження виявило, що в тілі шлунка показники мітотичного індексу, кількості мітозів у метафазі, патологічних мітозів були нижчими в пілоричному відділі і на малій кривизні. При інфільтративному раку шлунка достовірно вища кількість мітозів у метафазі в порівнянні з показниками при хронічній виразці дванадцятипалої кишки і шлунка. Але їх зменшення відбувалось в напрямку інфільтративно-виразковий рак шлунка→хронічна виразка шлунка→хронічна виразка дванадцятипалої кишки.

В слизовій оболонці навколо пухлини показники мітотичного індексу превалювали над такими навколо виразки шлунка. Щодо кількості мітозів у метафазі в полі виникнення пухлини, різниця достовірно більша в порівнянні з такою навколо виразки. Достовірно більшою була і кількість патологічних мітозів на вказаній ділянці слизової оболонки шлунка (СОШ).

В пілоричному відділі і на малій кривизні мітотичний індекс слизової оболонки, а також кількість мітозів у метафазі при інфільтративному раку був більший в порівнянні з хронічною виразкою шлунка і достовірно більший ніж при хронічній виразці дванадцятипалої кишки. Кількість патологічних мітозів на цих ділянках СОШ при інфільтративно-виразковому раку шлунка також превалювали над такими при виразковій хворобі. За даними дослідження стало очевидним превалювання показників MP при інфільтративно-виразковому раку шлунка над такими при виразковій хворобі.

Загалом спостерігалася певна залежність між показниками MP та частотою і розповсюдженням вираженої дисплазії (Д-III) епітелію в регіонах шлунка. Підтвердженням цього є те, що в тілі шлунка в порівнянні з іншими регіонами менші показники MP, отже достовірно рідше виявляється і Д-III.

Тобто показники зростання Д-III знаходяться в прямій залежності із зростанням показників MP.

Всі вище вказані аналітичні дані є свідченням певних змін на рівні тканин і клітин, тобто фенотипічні, а гістологічний метод хоч і є базисним методом в морфологічній диференційній діагностиці дисплазій і раку шлунка, має обмежену роздільну здатність. Тому в комплексі з гістологічним методом виконали генотипування (ДНК-типування), що суттєво покращило диференційну діагностику передпухлинних процесів і раку.

Генотипування епітелію СОШ пацієнтів, хворих на хронічну виразку дванадцятипалої кишки, хронічну виразку шлунка та інфільтративно-виразковий рак шлунка, виявило різноманітні ампліфікаційні профілі ДНК. ДНК-профілі згрупувались відповідно до фенотипічних ознак, що виділило ПЛР-типи за максимумом вираження в кожному випадку.

5 Серед нозологічних груп ДНК-профілі відрізнялись від аналогічних в своїй групі.

Профілі маркеру СОШ в нормі містили фрагменти розміром 190, 180, 160, 140, 120, 110, 90, 70, 60 п. н. (пар нуклеотидів) і були ідентичні в межах своєї групи і суттєво відрізнялись від ДНК-профілів інших досліджуваних груп.

10 ДНК-профілі СОШ із слабковираженою дисплазією (Д-I) мали 63,6 % подібності з маркером норми.

Але ДНК-профілі, що за фенотипічними ознаками відповідали Д-I при хронічній виразці дванадцятипалої кишки, відрізнялись від таких при хронічній виразці шлунка на 36,4 %.

15 ДНК-профілі, що відповідали фенотипічним ознакам помірно вираженої дисплазії (Д-II), також відрізнялись. Серед останніх виділили профілі двох типів. Профілі першого типу при хронічній виразці дванадцятипалої кишки відрізнялись від таких при хронічній виразці шлунка на 18,2 %, тоді як профілі другого типу відрізнялись від аналогічних на 45,4 %. Фенотипу Д-II при хронічній виразці дванадцятипалої кишки відповідали два варіанти ДНК-профілів з присутністю ампліконів розміром в межах 500 п. н. та без них. Ці профілі мали значну подібність на рівні 36,4 % з ДНК-профілями СОШ типу Д-III. Це свідчить, що ДНК-профілі Д-II лабільні і мають

20 перехідні форми щодо ПЛР типу Д-III. При хронічній виразці дванадцятипалої кишки Д-III виявлені ДНК-профілі тільки одного варіанту (520, 500, 480, 460, 440, 420, 410, 380, 360, 340, 320 п. н.), тоді як при хронічній виразці шлунка знайдені профілі двох варіантів: перший розміром - 560, 540, 520, 500, 480, 460, 420, 410, 340, 320, 310 п. н. і другий - 600, 580, 560, 540, 520, 500, 480, 460, 440, 420, 410 п.н.

25 ДНК профілі СОШ Д-III як при хронічній виразці дванадцятипалої кишки так і при хронічній виразці шлунка мали амплікони розміром 520 п. н. і вище. ДНК-профілі СОШ Д-II містили два варіанти з присутністю ампліконів розміром 320 п. н. і 520 п. н. Ці профілі мали значну подібність на рівні 63,6 % з першим варіантом ДНК-профілів СОШ типу Д-III. Тобто ДНК-профілі Д-II змінюються і мають перехідні форми щодо ПЛР типу Д-III.

30 В ДНК-профілях СОШ Д-III переважали амплікони розміром від 520 п. н. до 620 п. н. і мали значну генетичну відмінність від інших груп спостереження та повністю відрізнялись від норми.

35 ДНК-профілі за результатами проведення типування методом ISSR-PCR в кожному випадку виявляли за максимумом вираження. Якщо фенотипічно в слизовій оболонці виявлено одночасно дисплазія від Д-I до Д-III, то результат генотипування відповідав максимальному показникові Д-III з ДНК-профілями, що мають амплікони розміром 520 п. н. і більше.

40 Генотипування епітелію слизової оболонки шлунка пацієнтів, хворих на інфільтративно-виразковий рак шлунка, виявило досить стабільні ДНК-профілі розміром від 520 до 620 п. н. в усіх спостереженнях та мали повну відмінність від профілю норми, це свідчить, що вони відповідають ДНК-профілям пухлини.

#### ФОРМУЛА КОРИСНОЇ МОДЕЛІ

45 Спосіб діагностики інфільтративно-виразкового раку шлунка, який включає патогістологічні та ПЛР дослідження біоптату або крові, який **відрізняється** тим, що при виявленні в біоптаті патогістохімічним методом вираженої дисплазії епітелію слизової оболонки шлунка дослідження по виявленню пухлинних клітин продовжують шляхом ПЛР із застосуванням ISSR-PCR методу, при цьому досліджують периферичну кров пацієнта і при виявленні ДНК-профілів розміром 520-620 пар нуклеотидів діагностують виразково-інфільтративний рак шлунка.

---

Комп'ютерна верстка Д. Шеверун

---

Державна служба інтелектуальної власності України, вул. Урицького, 45, м. Київ, МСП, 03680, Україна

---

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