



MD 3222 F1 2007.01.31

REPUBLICA MOLDOVA



(19) Agenția de Stat
pentru Proprietatea Intelectuală

(11) **3222** (13) **F1**
(51) Int. Cl.: *A61B 10/00* (2006.01)
C12Q 1/68 (2006.01)
C07H 21/00 (2006.01)

(12) **BREVET DE INVENȚIE**

Hotărârea de acordare a brevetului de invenție poate fi revocată în termen de 6 luni de la data publicării	
<p>(21) Nr. depozit: a 2006 0093 (22) Data depozit: 2006.03.22</p>	<p>(45) Data publicării hotărârii de acordare a brevetului: 2007.01.31, BOPI nr. 1/2007</p>
<p>(71) Solicitant: INSTITUȚIA MEDICO-SANITARĂ PUBLICĂ INSTITUTUL ONCOLOGIC, MD (72) Inventatori: SOFRONI Dumitru, MD; GUȚU Lilian, MD; TENNER Katja, DE; CERNÎI Anatolie, MD; TODIRAȘ Mihail, MD; BADER Michael, DE (73) Titular: INSTITUȚIA MEDICO-SANITARĂ PUBLICĂ INSTITUTUL ONCOLOGIC, MD</p>	

(54) **Metodă de diagnostic al cancerului endometrial**

(57) **Rezumat:**

1
Invenția se referă la medicină, în special la oncologie și poate fi utilizată pentru diagnosticul neinvaziv precoce și pentru confirmarea diagnosticului de cancer endometrial.

Esența invenției constă în determinarea concentrației de ARN mesager al triptofanhidroxilazei-1 în țesuturile endometrial și miometrial, și în cazul când în țesutul endometrial concentrația este de

2
5 2...100 ori mai mare, se stabilește diagnosticul de cancer endometrial.

Rezultatul invenției constă în posibilitatea diagnosticării precoce diferențiate a cancerului endometrial pentru stabilirea metodei eficiente de tratament pre- și postoperator.

10 Revendicări: 1

MD 3222 F1 2007.01.31

Descriere:

Invenția se referă la medicină, în special la oncologie și poate fi utilizată pentru diagnosticul neinvaziv precoce, precum și pentru confirmarea diagnosticului de cancer endometrial.

Factori de pronostic deja bine stabiliți ai cancerului endometrial sunt gradul histologic, adâncimea invaziei miometriale și răspândirea extrauterină, inclusiv metastazele în nodulii limfatici retroperitoneali (Morrow C. P., Bundy B. N., Kurman R. J., Creasman W. T., Heller P., Homesley H. D., Graham J. E. Relationship between surgical-pathological risk factors and outcome in clinical stage I and II carcinoma of the endometrium. *Gynecol. Oncol.*, № 40, 1991, p. 55-65). Federația Internațională de Ginecologie și Obstetrică (FIGO) oferă un sistem de stadializare chirurgicală care se reflectă asupra evoluției și pronosticului cancerului endometrial (Creasman W. T. New gynecologic cancer staging. *Obstet. Gynecol.*, № 75, 1990, p. 287-288). Stadializarea morfopatologică și chirurgicală a pacientelor este recomandată pentru a determina o metodă de tratament adecvată fiecărei paciente individual, deoarece acești factori de pronostic nu pot fi cercetați preoperator. Oricum, unele paciente sunt supuse unei stadializări incomplete din cauza obezității, vârstei, ori altor probleme medicale (Calais G., Descamps P., Vitu L., Body G., Lansac J., Bougnoux P., Le Floch O. Is lymphadenectomy useful in the treatment of endometrial carcinoma. *Gynecol. Oncol.*, № 38, 1990, p. 71-75). Iată de ce, identificarea preoperatorie a pacientelor ce prezintă un risc majorat pentru un pronostic nefavorabil poate fi utilă în luarea deciziei privitor la manopera chirurgicală și tratamentul adjuvant postoperator. În acest sens, cercetările recente subliniază importanța diferiților factori în pronosticul evoluției tumorii, atribuindu-le rolul de markeri tumorali. O atenție deosebită se acordă astăzi angiogenezei, susținându-se că formarea vaselor noi de sânge este imperial necesară creșterii și răspândirii metastatice a tumorilor solide (O'Reilly M. S., Boehm T., Shing Y., Fukai N., VaSios G., Lane W. S., Flynn E., Birkhead J. R., Olsen B. R., Folkman J. Endostatin: an endogenous inhibitor of angiogenesis and tumor growth. *Cell*, № 88, 1997, p. 277-285).

S-a constatat că factorul endotelial vascular de creștere (VEGF) și receptorii săi sunt abundent exprimați în citoplasma celulelor endoteliale și celulelor tumorale din cadrul carcinomului endometrial, iar nivelurile proteinei VEGF în celulele tumorale de gradul II și III de diferențiere au fost mai înalte decât în tumorile de gradul I sau endometrul normal menopausal. În concluzie, VEGF contribuie la neovascularizarea tumorii și este unul din factorii relați ai creșterii tumorale rapide a cancerului endometrial [1].

Dezavantajul constă în aceea că VEGF este exprimat și în procesele patologice neoncologice (inflamația, proliferația).

Dezavantajele factorilor utilizați pentru diagnostic constau în aceea că sunt utilizate metode invazive pentru stabilirea diagnosticului care sunt utile îndeosebi la stadii avansate ale proceselor canceromatoase.

Sunt cunoscuți markeri tumorali, care sunt stabiliți în țesuturile afectate.

Sialyl SSEA-1 antigen (SLX) este considerat ca marker tumoral compus din lanțuri carbohidrate care rare detectate în țesuturile normale, dar care este prezent în cancerul ovarian (72%), endometriosis (75%), adenocarcinomul endometrial (33%) și țesuturile fetale [2].

Markerul cel mai frecvent depistat în cancerul endometrial este CA125. Rezultatele combinate a 5 studii separate au stabilit că indicii CA125 au fost măriți la 32% paciente cu cancer endometrial. Indicii CA125 cresc proporțional cu stadiul cancerului. La pacientele cu stadiul I și II acești indici sunt măriți la 22%, cu III și IV la 82%. Totuși, CA125 nu este specific pentru adenocarcinomul endometrial, deoarece se întâlnește și în endometrioză, alte procese inflamatorii ale organelor reproductive, cancerul ovarian, etc. [3].

Un alt marker este P-53, supraexpresia căruia s-a stabilit a fi un factor semnificativ în supraviețuirea pacientelor. La pacientele cu cancer endometrial papilar seros se determină în 71,4% cazuri, iar cancerul endometrial de tip endometrioid doar în 38,1%. Alterația genei p-53 nu este specifică numai pentru cancerul endometrial [4].

Dezavantajele markerilor cunoscuți constau în aceea că ei nu sunt specifici îndeosebi pentru cancerul endometrial și utilizarea lor deseori duce la stabilirea incorectă a genezei tumorii sau a diagnosticului și a conduitei tratamentului.

Problema pe care o rezolvă invenția constă în elaborarea unei metode de diagnostic precoce pentru cancerul endometrial, precum și pentru confirmarea lui, ceea ce oferă posibilitatea de stabilire a metodei optime pentru tratamentul adjuvant pre- și postoperator, indicarea tratamentului hormonal la pacientele cu cancer uterin și stabilirea markerului, care este mult mai specific pentru pronosticul evoluției maladiei.

MD 3222 F1 2007.01.31

4

Esența invenției constă în determinarea concentrației de ARN mesager al triptofanhidroxilazei-1 în țesuturile endometrial și miometrial, și în cazul când în țesutul endometrial concentrația este de 2...100 ori mai mare, se stabilește diagnosticul de cancer endometrial.

5 Rezultatul invenției constă în aceea că se efectuează un diagnostic precoce pentru cancerul endometrial, precum și pentru confirmarea lui, ceea ce dă posibilitate de stabilire a metodei optime pentru tratamentul adjuvant pre- și postoperator, indicare a tratamentului hormonal la pacientele cu cancer uterin și stabilire a markerului, care este mult mai specific pentru pronosticul evoluției

10 Evoluția ascendentă a problemei proceselor hiperplastice și cancerului endometrial solicită o atenție deosebită din partea mai multor specialiști: morfologi, oncologi, ginecologi, endocrinologi etc. În urma cercetărilor complexe a fost stabilită teoria celor două variante patogenetice ale dezvoltării proceselor hiperplastice și cancerului endometrial (Bohman,1985). Prima variantă (hormonal-dependentă) cu incidența de 81% (Sofroni,1996) este caracterizată print-un grad înalt de dereglări endocrine și metabolice, iar pentru cea de-a doua (autonomă) aceste dereglări sunt mai puțin exprimate sau lipsesc.

15 Investigațiile legate de sistemul endocrin difuz la nivel uterin au pus în evidență o legătură specifică dintre morfologia și patogeneza hiperplaziei atipice și a cancerului endometrial. Celulele endocrine se depistează la 18,6...25,6% pacienți cu cancer endometrial. S-a constatat că apudocitele secretă amine biogene și hormoni polipeptidici, care influențează metabolismul bazal și apoptoza celulară. Endometriul normal conține o cantitate infimă de apudocite (5,4 în 10 câmpuri de vedere x 280), iar cel atrofic este lipsit de celule endocrine. Incidența depistării apudocitelor crește odată cu gradul de hiperplazie a endometrului. Pe baza metodei argirofile (Grimelius) s-a văzut că cantitatea medie de apudocite în hiperplazia glandulară atipică constituie 24,6 celule (în 10 câmpuri de vedere x 280), iar în caz de cancer endometrial numărul lor se ridică la 105,3. În funcție de originea procesului diferă și frecvența depistării celulelor argirofile. Așadar, în hiperplazia glandulară a endometriului apudocitele se depistează la 18,3% pacienți, iar în hiperplazia endometrială atipică la 25,5%. În adenocarcinomul cu grad înalt de diferențiere incidența depistării apudocitelor se ridică la 47,7%, iar în cancerul endometrial moderat diferențiat scade la 15%. Anicicov N.M. (1992) susține că, dacă numărul apudocitelor este mai mare de 20% din toate celulele parenchimotoase, indicele mitotic al celei este mic, producția de serotonină și de alți hormoni este marcată, iar incidența dereglărilor endocrine este înaltă, atunci pronosticul evoluției maladiei este relativ favorabil. Pe de altă parte, numărul scăzut de apudocite asociate cu un indice mitotic înalt, dereglări endocrine și producție de hormoni diminuată sugerează pronostic nefavorabil. Hiperplazia apudocitelor endometriului se soldează cu augmentarea sindromului paraneoplazic caracteristic tipului I (endocrindependent)

20

25

30

35

patogenetic de cancer endometrial influențând procesele mitotice. Bohman și colab. susțin că depistarea unui număr mare (> 35 celule x 10 cv) în hiperplazia glandulară sau cea atipică indică asupra unui risc sporit de malignizare.

În prezent sunt încă neelucidate căile enzimice implicate în geneza serotoninei din apudocitele endometriale. Pe animale de laborator, recent s-a depistat că serotonină rezultă prin intermediul a două verigi distincte, dependente de subtipul de TpH (triptofanhidroxilaza), prin intermediul cărora se produce amina din triptofan. Prima, Tph-1 dependentă realizează serotonină circulatorie, iar pe calea Tph-2 rezultă serotonină de origine neurogenă, care este implicată în transmiterea sinaptică. Estimarea prezenței enzimelor menționate este posibilă prin depistarea expresiei genelor responsabile de sinteza acestor enzime în cancerul endometrial. Depistarea ARN-ului mesager ar confirma atât expresia genelor, cât și activarea lor, iar legarea enzimelor cu anticorpi monoclonali ar aprecia izotipul hidroxilazei responsabile de sinteza serotoninei în cancerul endometrial.

40

45

Țesutul tumoral secretă un șir de factori biologic activi, care pe de o parte modulează procesele autonome specifice tumorii (cancerogeneza, angiogeneza, apoptoza etc.), iar pe de altă parte, determină disfuncții morfologice și funcționale în țesutul paraneoplazic.

50

Carcinoamele neuroendocrine (carcinozi, carcinom cu celule argirofile, apudom, carcinom în celule mici, carcinom endocrin) sunt tumori ale sistemului APUD (Amine Precursor Uptake Decarboxilation) care cuprind următoarele maladii: carcinomul paratiroidian, carcinomul medular tiroidian, carcinoiz bronhial, feocromocitom malign, carcinomul insular (pancreatic), carcinoizul malign (stomac, intestine), paraganglion malign.

55

60

Prezența celulelor endocrine în tumorile neoplazice ale organelor genitale la femeie este raportată de numeroase studii. Conform studiilor (Anichkov N.M., Serezhin B.S., Lomakina I.I., Smirnov O.A. Apud cells in endometrial cancer Arkh Patol. № 54, 1992, p. 33-39), s-au studiat 55 carcinoame endometriale conținând celule apudocite, corelația dintre dereglările endocrine-metabolice și indicele mitotic, pe de o parte și a numărului de celule endocrine, pe de altă parte, a fost relevată și s-a stabilit că dacă procentajul celulelor endocrine este mai mare de 20 față de celulele parenchimotoase, indicele mitotic al tumorii este mic, producția de serotonină și alți hormoni este mică, iar incidența dereglărilor

endocrine este înaltă, atunci pronosticul evoluției tumorii este relativ-favorabil. Invers, dacă numărul mic al celulelor endocrine este asociat cu un indice mitotic înalt, dereglări endocrine și producție de hormoni diminuate sau absente, pronosticul evoluției este nefavorabil.

5 În urma cercetării (Aguirre P., Scully R.E., Wolfe H.J., DeLellis R.A. Endometrial carcinoma with argyrophil cells: a histochemical and immunohistochemical analysis. Hum. Pathol. 1984, № 15 (3), p.210-217) a 53 cazuri s-a stabilit la 14 din ele (26%) un număr moderat de celule argirofile, fapt pus în evidență prin colorarea cu nitratul de argint (metoda Grimelius) a secțiunilor fixate în parafină. În 8 cazuri argirofilia a fost prezentă în regiunea apicală a celulelor glandulare (celule de tip I) sau în
10 toată citoplasma celulelor glandulare (celule de tip II). Distribuția argirofiliei în aceste celule a fost paralelă distribuției de mucină și glicogen. În 6 cazuri celulele argirofile cu forme rotunde, ovoide sau neregulate au fost prezente de asemenea în interiorul epiteliului glandular (celule de tip III). În toate aceste 6 cazuri celulele au fost pozitive imunohistochimic la serotonină. Celule de tip I și II au fost depistate în mai multe mostre de endometru normal proliferativ și secretor, pe când celulele de tip III în acestea nu s-au depistat. Autorul menționează că chiar dacă argirofilia este o particularitate
15 frecventă a carcinomului endometrial, prezența celulelor argirofile de tip III ce conțin serotonină este mai joasă, circa 11%. Aceste caracteristici sunt oferite și de un alt studiu, în care se mai menționează că și în cancerul ovarian varianta endometrioidă frecvent se depistează celule argirofile conținând serotonină care prezintă activitate endocrină (Inoue Y., Ueda G., Yamasaki M., Inoue M., Tanaka Y., Nishino T., Saito J., Abe Y., Tanizawa O. Immunohistological demonstration of peptide hormones and serotonin in ovarian mucinous and endometrioid tumors with argyrophil cells Nippon Sanka Fujinka Gakkai Zasshi. 1986, № 38(3), p. 361-365).

Fetissov (Fetissov F., Berger G., Dubois M.P., Arbeille-Brassart B., Lansac J., Sam-Giao M., Jobard P. Endocrine cells in the female genital tract. Histopathology. 1985, № 9(2), p. 133-145) susține că celulele endocrine sunt inhabitanți obișnuiți ai glandelor parauretrale, Bartolini, endocervicale, endometriale (în special cu resturi mesonefrale). Aceste celule sunt caracterizate prin
25 depozitari de serotonină. Numeroase celule ce conțin serotonină au fost depistate în adenocarcinoamele endometriale, tumorile Brenner ale uterului. Aceasta sugerează că un mecanism endocrin similar poate fi împărțit de țesuturi originare din ductul Muller, dar și din sinusul urogenital.

Sivridis ș.a. (Sivridis E., Buckley C.H., Fox H. Argyrophil cells in normal, hyperplastic, and neoplastic endometrium. J. Clin. Pathol. 1984, № 37(4), p. 378-381) afirmă că celulele argirofile sunt prezente substanțial în endometriul normal, în particular în faza de secreție a ciclului menstrual. Ele sunt de asemenea decelate în variate tipuri de hiperplazie endometrială și sunt depistate în mai mult de jumătate din carcinoamele endometriale. În unele neoplasme endometriale ele sunt prezente din
30 abundență, dar nu au o clinică tipică unui carcinoid și sunt morfologic aproape identice adenocarcinoamelor fără celule argirofile. O serie de studii, din contra, subliniază agresivitatea evoluției clinice în cazul depistării cancerului endometrial, de col uterin ce conțin celule neuroendocrine, acestea fiind tratate chirurgical, actinic, chimioterapeutic, dar o metodă optimă de tratament nu este definitivată (Huntsman D.G., Clement P.B., Gilks C.B., Scully R.E. Small-cell carcinoma of the endometrium. A clinicopathological study of sixteen cases. Am. J. Surg. Pathol. 1994, № 18(4), p. 364-375).

Uele studii constată în 18...26% cazuri ale carcinoamelor endometriale prezența celulelor endocrine, care la microscopia electronică se prezintă ca celule cu multiple granule neurosecretoare, preponderent rotunde ca formă, cu un nucleu electronic dens. La o amplificare mai mare, ele consistă
45 dintr-un conglomerat de substanțe granulare fine cu o densitate electronică mare (Okudaira Y., Tateishi R., Sato Y., Saji F., Hayakawa K., Matsui Y., Sawada M. Argyrophil cell of the endometrial adenocarcinoma -light and electron microscopic observations Nippon Sanka Fujinka Gakkai Zasshi. 1980, № 32 (10), p.1541-1550).

În sursa (Ueda G., Yamasaki M., Inoue M., Tanaka Y., Hiramatsu K., Inoue Y., Kurachi K. Effects of amine precursor administration on the morphological findings of transplanted argyrophil cell adenocarcinoma of the endometrium. Nippon Sanka Fujinka Gakkai Zasshi. 1982, № 34(3), p. 388-390) se lansează teoria existenței într-o formă latentă a celulelor APUD în celulele argirofile ale adenocarcinomului endometrial și activarea lor se produce în anumite condiții. Hiperplazia apudocitelor duce la dezvoltarea variantei I de patogeneză a cancerului endometrial cu manifestarea
55 sindromului paraneoplazic endocrino-metabolic și influențează evoluția clinică a tumorii, inhibând procesele de mitoză celulară. S-a constatat că endometriul normal conține 5...10 apudocite în câmpul de vedere, iar în endometrul atrofie ele lipsesc, ceea ce denotă un nivel scăzut al procedelor metabolice din țesutul atrofiat. În cazul hiperplaziei glandulare celulele endocrine se decelează în 18% cazuri, în hiperplazia glandulară atipică – în 25%. În adenocarcinomul înalt diferențiat celulele endocrine se determină în 47%, iar în adenocarcinomul slab diferențiat scad până la 14...15%. Celulele endocrine se depistează cu precădere la pacientele cu varianta de tipul I patogenetic, iar
60 activitatea antiproliferativă a serotoninei poate servi ca un argument indirect al unei evoluții mai

MD 3222 F1 2007.01.31

6

favorabile a cancerului endometrial. Totodată, creșterea numărului apudocitelor în hiperplazia glandulară și hiperplazia glandulară atipică indică un risc sporit de malignizare (Столярова Е. С. Эндокринные клетки при гиперпластических процессах и раке эндометрия. Руководство по онкогинекологии. Глава 14, с. 283-285).

5 Serotonina, derivat al triptofanului (sinteză realizată prin hidroxilarea acestui aminoacid, urmată de decarboxilare) a fost pentru prima dată studiată în anii 30 ai secolului XX, când s-a văzut că este un agent contractil al vaselor sangvine și al musculaturii gastrice. Denumirea de serotonină a fost dată în anul 1948 de către Ropport M.M. și colab. pentru a evidenția acest potențial vasoconstrictor din serul sangvin izolat și caracterizat de ei. Ulterior, în anul 1954 Page I.H. a descris efectele fiziologice ale 5-hidroxytryptaminei (5-HT).

10 Efectele biologice ale serotoninei (5-HT) sunt complexe și sunt mediate prin activarea a 7 clase distincte de receptori specifici din sistemul nervos central (SNC) și periferic, recunoscute actualmente de către Uniunea Internațională a Comitetului Farmacologic referitor la Nomenclatorul Receptorilor și Medicamentelor (NC-IUPHAR).

15 Triptofanhidroxilaza (Tph) este o enzimă care participă la convertirea triptofanului (aminoacid semiesențial) în 5-hidroxitriptofan, iar ultimul este precursor al serotoninei. Există două forme de triptofanhidroxilază : Tph-1 este exprimată și funcționează la periferie și până nu demult era considerată unica enzimă responsabilă de sinteza serotoninei; și Tph-2, recent identificată, care activează în creier.

20 S-a făcut un studiu asupra nivelului ARN-ului mesager al Tph-1 în țesutul endometrial și miometrial prelevat de la paciente în timpul histerectomiei pentru 162 de paciente cu cancer uterin și 54 paciente operate pentru miom uterin.

Ribonuclease Protection Assay (RPA) este o procedură extrem de sensibilă pentru detectarea și cuantificarea speciilor RNA (de obicei mRNA) într-un amestec complex de probă totală sau Poly(A) RNA selectat. Pentru RPA se sintetizează o probă RNA marcată nonizotopic sau radioactiv care este complementară unei părți a RNA-țintă ce urmează a fi investigat. Aceasta se realizează prin plasarea capătului 3' al secvenței probei adiacente unuia din promotorii polimerazei (T₃, T₇, ori SP₆) prin clonarea într-un vector plasmid sau prin utilizarea unui PCR primer ce conține secvența promotorului. Polimerazele T₃, T₇, sau SP₆ corespunzător sunt folosite în generarea unui transcript RNA prin *in vitro* transcripție. Proba marcată și proba RNA sunt incubate în condiții care favorizează hibridizarea secvențelor complementare. După hibridizare, amestecul este tratat cu ribonuclează pentru a degrada probele nehibridizate. Proba marcată care este hibridizată către RNA-ul complementar al RNA-țintă va fi protejată de digestia ribonucleazei și poate fi separată pe un gel poliacrilamid și vizualizată fie prin autoradiografie (probele marcate radioactiv), fie prin procedura detecției secundare (în cazul celor marcate non-izotopic). Când proba este prezentă în exces molar față de țintă în reacția de hibridizare, intensitatea fragmentului protejat va fi direct proporțională cu cantitatea de RNA-țintă din amestecul de probe. Ribonuclease Protection Assay este astfel analogul S1 Nuclease Protection Assay, însă prima este mai exactă, mai facilă și mai puțin predispusă spre a degrada acidul nucleic dublu-spiralat (Molecular Cloning, 1989; and Friedberg *et al.*, 1990). Comparată cu protocoalele de hibridizare bazate pe fixarea RNA-ului de un suport solid (i.e. Northern blots), chiar și o prezență minimă de mRNA este detectată și cuantificată mai precis folosind procedura soluției hibridizante aplicate în cazul RPA (Frayn, *et al.* 1993, Lee and Costlow, 1987). Datorită rezoluției înalte a sistemului de gel acrilamid folosit în analizarea fragmentelor protejate, RPA este aplicabilă în mapping-poziționarea joncțiunilor interne și externe în mRNA (Kekule *et al.*, 1990, Melton *et al.*, 1984, and Calzone *et al.*, 1987).

45 **În studiul dat a fost utilizat Kitul RPA II TM, Ambion, Inc.**

Pentru a studia un anumit RNA, din țesutul interesat se extrage RNA-ul total, procedură care a fost efectuată prin Izolarea RNA prin metoda Trizolului:

- 50 • adăugarea a 1 ml de Trizol în fiecare eprubetă ce conține 50...100 mg de țesut
- fărâmițarea țesutului cu omogenizatorul timp de 60 s
- păstrarea timp de 8 min la temperatura camerei
- adăugarea a câte 0,2 ml cloroform
- agitarea (amestecarea la aparat) timp de 15 s
- păstrarea timp de 2...3 min la temperatura camerei
- 55 • centrifugarea timp de 20 min, la un turaj de 12000 g la temperatura de 4°C
- transferarea fazei superioare (supernatantului) în alt tub marcat cu același număr
- adăugarea a 0,5 ml izopropanol
- păstrarea timp de cel puțin 10 min la temperatura camerei
- centrifugarea timp de 20 min, la un turaj de 12000 g la temperatura de 4°C

MD 3222 F1 2007.01.31

7

- lichidul se aruncă, iar pe peretele eprubetei se formează „palette” albe sau transparente cu un diametru de 0,2...0,4 cm
 - adăugarea a câte 1 ml de etanol de 70% la eprubetă
 - agitarea timp de 10 s, ca urmare palettele se desprind de pe peretele eprubetei
 - centrifugarea timp de 5 min, la un turaj de 7500 g la temperatura de 4°C
 - lichidul se aruncă, eprubetele se usucă bine în termostat la 37°C timp de 10 min, dar nu mai mult
 - adăugarea a câte 50 µl apă DEPC
 - urmează cuantificarea RNA-ului sau eprubetele se păstrează la -80°C.
- 10 Deoarece în diverse mostre de ţesut cantitatea de RNA variază, este nevoie de a standardiza probele prin efectuarea spectrofotometriei sau cuantificării RNA cu determinarea concentraţiei RNA :
- eprubetele cu RNA-ul extras se dezgheaţă şi se păstrează în gheaţă obişnuită (atenţie! RNA-ul este foarte sensibil şi degradează rapid)
 - pentru fiecare eprubetă s-au notat altele două cu acelaşi număr
 - în eprubetele noi s-au instilat câte 198 µl apă dublu distilată şi 2 µl de lichid ce conţine RNA din ţesutul extras, obţinându-se astfel concentraţia de 1:200
 - agitarea 10 s
 - conectarea fotospectrometrului şi spălarea chiuvetei
 - instilarea pe rând a câte 100 µl şi determinarea concentraţiei RNA
 - introducerea datelor în computer, calcularea valorii medii a concentraţiei RNA şi stabilirea automată de către computer a volumului necesar de soluţie ce trebuie extras din eprubetele păstrate la -80°C pentru RPA propriu-zis.
- 20
- Descrierea RPA :
- 1 etapă : Marcarea cu ³²P radioactiv**
- 25 Transcriptia *in vitro*:
- Proba (Plasmid linearizat) 0,5...1 µg
 - Soluţie tampon de transcripţie (5x) 5 µl
 - UTP mix 4 µl (UTP mix= ATP 10 mM : 1 µl
CTP 10 mM : 1 µl
GTP 10 mM : 1 µl
UTP 10 mM : 1 µl)
 - DTT (100 mM) 1 µl
 - Rnasin 1 µl
 - H₂O (DEPC) (10x) µl
- 30
- 35 În camera radioactivă (se lucrează cu un dozimetru special):
- P32 UTP 3 µl Atenţie ! foarte radioactiv
 - SP6 sau T7 polimeraze 1 µl
 - Total 25 µl
- 40
- agitarea şi centrifugarea probelor 10 s
 - incubarea la 37°C timp de 1 h
- Între timp se toarnă gelul:
- | | |
|-------------------------|----------|
| 1. Ureea (Harnstoff) 9M | 38,75 ml |
| 2. Acrilamid | 6,25 ml |
| 3. 10 x TBE | 5 ml |
| 4. APS 10% | 400 µl |
| 5. Temed | 54 µl |
- 45
- De instilat 1 ml de DNase la fiecare tub şi de centrifugat scurt (spin)
 - Incubare la 37°C pe 20 min
- 50
- Între timp gelul se toarnă în camerele de migrare şi aparatul se conectează la 250 V
 - Coloanele de încărcare cu probele RNA se spală cu ajutorul unei eprubete speciale
 - Se iau 1 µl de probă şi 8 µl de soluţie tampon necesară
 - 5 min incubare la 95°C, agitare şi centrifugare
 - Gelul se lansează pe 1 h la 300 V
- 55
- Developarea gelului timp de 10 min şi deschiderea lui
 - Se măsoară radioactivitatea şi se păstrează la -20°C

MD 3222 F1 2007.01.31

8

a II-a etapă sau I zi RPA

- Instilarea în eprubete noi în așa volum ca toate probele să conțină 20 µg de RNA total. Acest volum l-a determinat automat programa din computer
- 5 • Plasarea eprubetelor cu capacele deschise în vacuum centrifugă, centrifugare timp de 10 min, astfel încât apa se evaporează și rămâne doar substanța uscată
- Extragerea eprubetelor și plasarea pe gheață obișnuită, cele care nu s-au uscat bine, se mai centrifughează încă 10 min
- 10 • Între timp, se pregătește mix-ul (amestecul) pentru fiecare probă:
 1. 20 µl soluție tampon hibridizată
 2. mix-ul hGAPGH (10000 cpm-unități de măsură a radioactivității)
 3. mix-ul hTPH1 (40000 cpm)
- 15 • Într-o experiență se plasează 22 probe de cercetat și 2 probe de control cu fungi „yeast +” și „yeast -”, de aceea avem 24 volume + 2 volume suplimentare, fiindcă în timpul instilării se pierde soluție. Așadar, mix-ul se pregătește pentru 26 probe :
 - 520 µl soluție tampon hibridizată
 - 5,2 µl hTPH1
 - 2,6 µl hGAPDH
- 20 • Se instilează câte 20 µl la fiecare probă
- Agitare, centrifugare scurtă (spin)
- Incubare pe 5 min la 95°C
- Agitare, centrifugare
- Incubare la 42°C peste noapte

a III-a etapă sau a II-a zi RPA

- 25 • Soluția tampon de digestie a RNA-sei, soluție tampon de dezactivare. Soluția tampon de dezactivare și un marker de culoare albastră se scot de la -25°C și se dezgheață la temperatura camerei timp de 30 min
- 30 • Pregătirea RNA-sei-mix (s-au folosit 4 µl RNA-sei A/T₁ la 200 µl soluție tampon de digestie pentru o probă) pentru 25 probe (în „yeast -” nu se pune) :
 1. 100 µl RNA-sei
 2. 5000 µl (5 ml) soluție tampon de digestie
- Se amestecă doar 5 s la master-mix (aparatură). Atenție ! RNA-sa este foarte sensibilă.
- În camera radioactivă :
 - 35 • Se scot eprubetele cu probele din incubator, spin scurt
 - La fiecare probă s-au instilat câte 200 µl RNA-sei-mix, iar în „yeast -” doar 200 µl soluție tampon de digestie. Incubare la 37°C pe 1 h
 - Între timp se pregătește gelul :
 - 40 1. Ureea 9M -38,75 ml
 2. 10 x TBE -5 ml
 3. Acrilamid -6,25 µl
 4. APC 10% -400 µl
 5. Temed -54 µl
 - 45 • Se amestecă bine, pe sticla de bază se aplică pe margini fâșia de gumă și se ajustează a doua sticlă, fixându-se la părți cu clești. Cu seringă se toarnă gelul lichid în spațiul dintre sticle, cu grijă pentru a nu face bule de aer, de aceea sticlele se ridică la 40° și se înclină pe o parte. Se pun combele (pieptene cu 24 de dinți)
 - Gelul se solidifică timp de 30 min
 - Pregătirea Mix de inactivare (1,5 µl de marker de culoare albastră la 300 µl de soluție tampon de inactivare)
 - 50 • 300 µl Mix de inactivare se instilează la fiecare probă
 - Agitare, spin
 - Incubare la -20°C pe 20 min
 - Centrifugare 20 min, 13000 rot/min la 4°C (centrifuga trebuie pornită anterior, pentru ca ea să se răcească până la -4°C). Atenție! Rinse-urile eprubetelor se vor îndrepta spre centrul centrifugii!
 - 55 • Între timp se montează sticlele cu gel în aparatul de migrare, se scot combele, în aparat se toarnă soluție tampon de lucru 1x TBE (pe care am pregătit-o anterior : 100 ml 10x TBE + 900 ml apă dublu distilată și păstrată la 4°C), coloanele se spală de 3 ori cu aceeași soluție.

MD 3222 F1 2007.01.31

9

- După ce s-a oprit centrifuga se înlătură foarte atent supernatantul (faza superioară) ca să nu se aspire și paleta de culoare albastră (datorată markerului de culoare albastră). Supernatantul se aruncă într-un vas special pentru lichide radioactive.
- 5 ▪ Spin scurt
- Aspirarea cu pipeta de 20 μl a restului supernatantului
- Adăugarea la fiecare tub a câte 8 μl de soluție tampon de dezactivare
- Agitare, spin
- Incubarea la 95°C pe 5 min
- 10 ▪ Agitare, spin
- Spălarea repetată a coloanelor gelului
- Instilarea probelor RNA în coloane
- Lansarea gelului la 250 V pe 5 min
- Apoi pe 1 h la 300 V
- Transferarea gelului pe o hârtie Wattman
- 15 ▪ Se acoperă cu folie de argint și se decupează împrejur
- Se pune la uscat în aparatul de vacuum la 70°C pe 1,5 h
- Gelul se extrage din vacuum, se pune într-o casetă specială și se acoperă cu o placă de absorbție a radioactivității pe 24 h
- Măsurarea semnalului radioactiv impregnat pe placa de absorbție de către RNA în componența căruia este o bază marcată radioactiv.
- 20 Prin metoda RPA s-a constatat că în endometru de la 72,6% paciente cu cancer endometrial nivelul ARN-ului mesager pentru Tph-1 este de 2...100 ori mai mare decât în miometru. De remarcat că în endometrul recoltat din uterele fără cancer (miom uterin), miometrul fără cancer (miom), miometrul de la paciente cu cancer endometrial nivelul ARNm pentru Tph-1 a fost egal (aproximativ
- 25 8 Unități ale intensității semnalului).
- Exemplul 1*
- Pacienta M., a.n. 1953, a fost internată în Institutul Oncologic, Secția Oncoginecologie pe 01.08.05 cu diagnosticul clinic de Ca corpului uterin, st. III, T₃N_xM₀. La RPA –152 Unități.
- 30 Pacienta a fost investigată clinic și paraclinic. Analiza generală a sângelui (02.08.05): hemoglobina – 140 g/l ; eritrocitele – 4,6 mln.; hematocritul – 0,44; leucocitele – 5,3 mii.
- Patologie concomitentă: Cardiopatie ischemică și dismetabolică, I.C. I N.I.H.A., colecistopancreatică cronică, diabet zaharat tip II (glicemia - 8), obezitate gradul 3.
- După o serie de tratament preoperator, pacienta a fost supusă pe 10.08.05 la intervenție chirurgicală, unde s-a efectuat histerectomie totală cu înlăturarea anexelor bilateral. Intraoperator: procesul tumoral ocupa toată cavitatea endometrială cu trecere pe canalul cervical. Histologia postoperator: adenocarcinom papilar cu invazie 2/3 miometrului cu trecere pe canalul cervical, metastaze în ovarul drept. Pacienta a urmat, în cadrul tratamentului complex, o serie de tratament actinic postoperator.
- 35 *Exemplul 2*
- 40 Pacienta T., a.n. 1935, a fost internată în Institutul Oncologic, Secția Oncoginecologie pe 10.08.05 cu diagnosticul clinic de Ca corpului uterin, st. I, T_{1b}N_xM₀. La RPA –123 Unități.
- Pacienta a fost investigată clinic și paraclinic. Analiza generală a sângelui (12.08.05): hemoglobina – 120 g/l ; eritrocitele – 3,7 mln.; hematocritul – 0,4; leucocitele – 6,0 mii.
- 45 Patologie concomitentă: colecistopancreatică cronică, boala varicoasă a membrelor inferioare, tromboflebită.
- După o serie de tratament preoperator, pacienta a fost supusă pe 23.08.05 la intervenție chirurgicală, unde s-a efectuat histerectomie totală cu înlăturarea anexelor bilateral. Intraoperator : procesul tumoral ocupa 1/3 superioară a cavității endometriale.
- 50 Histologia postoperator: adenocarcinom bine diferențiat cu invazie 1/3 a stratului muscular.
- Pacienta a urmat, în cadrul tratamentului complex, o serie de tratament actinic postoperator.

(57) Revendicare:

- 5 Metodă de diagnostic al cancerului endometrial care constă în determinarea concentrației de ARN mesager al triptofanhidroxilazei-1 în țesuturile endometrial și miometrial, și în cazul când în țesutul endometrial concentrația este de 2...100 ori mai mare se stabilește diagnosticul de cancer endometrial.

10

(56) Referințe bibliografice:

1. Wang H., Chen G., Zhang B. Expression of vascular endothelial growth factor and its receptors in endometrial carcinoma. *Zhonghua Bing Li Xue Za Zhi.* 2002, № 31(5), p. 391-395
2. Iwanari O., Miyako J., Date Y., Nakayama S., Kijima S., Moriyama M., Karino K., Endoh J., Kitao M. Clinical evaluations of the tumor marker sialyl SSEA-1 antigen for clinical gynecological disease. *Gynecol Obstet Invest.* 1990, № 29, p. 214-218
3. Jacobs I., Bast R. The CA125 tumour-associated antigen: a review of the literature. *Human Reprod.* № 4, 1989, p. 1-12
4. Sung C., Zheng Y., Quddus M., Kang X., Zhang Z., Lauchlan S., Zheng W. P53 as a significant prognostic marker in endometrial carcinoma. *Int J Gynecol Cancer.* 2000 Mar, № 10(2), p. 119-127

Director adjunct Departament:

GUȘAN Ala

Examinator:

GROSU Petru

Redactor:

CANȚER Svetlana