



MD 3244 F1 2007.02.28

REPUBLICA MOLDOVA



(19) Agenția de Stat
pentru Proprietatea Intelectuală

(11) **3244** (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	
(21) Nr. depozit: a 2006 0139 (22) Data depozit: 2006.05.15	(45) Data publicării hotărârii de acordare a brevetului: 2007.02.28, BOPI nr. 2/2007
(71) Solicitant: INSTITUȚIA MEDICO-SANITARĂ PUBLICĂ INSTITUTUL ONCOLOGIC, MD (72) Inventatori: SOFRONI Dumitru, MD; GUȚU Lilian, MD; TENNER Katja, DE; CERNÎI Anatolie, MD; CARDANIUC Corina, MD; TODIRAȘ Mihail, MD; BADER Michael, DE (73) Titular: INSTITUȚIA MEDICO-SANITARĂ PUBLICĂ INSTITUTUL ONCOLOGIC, MD	

(54) **Metodă de apreciere a agresivității cancerului endometrial**

(57) **Rezumat:**

1
Invenția se referă la medicină, în special la oncologie și poate fi utilizată pentru aprecierea
5 precoce neinvazivă a agresivității cancerului endometrial.

Esența invenției constă în aceea că se determină în țesuturile endometrial și miometrial nivelul de ARN mesager pentru triptofanhidro-

2
xilaza-1, și în cazul în care nivelul constituie
0...15 unități se determină o agresivitate majoră,
16...400 unități – o agresivitate medie, 400 unități
și mai mult se determină o agresivitate scăzută a
cancerului endometrial.

Revendicări: 1

10

MD 3244 F1 2007.02.28

Descriere:

Invenția se referă la medicină, în special la oncologie și poate fi utilizată pentru aprecierea precoce neinvazivă a agresivității cancerului endometrial.

Factori de pronostic deja bine stabiliți ai cancerului endometrial sunt gradul histologic, adâncimea invaziei miometrială și răspândirea extrauterină, inclusiv metastazele în nodulii limfatici retroperitoneali (Morrow C., Bundy B., Kurman R., Creasman W., Heller P., Homesley H., Graham J. Relationship between surgical-pathological risk factors and outcome in clinical stage I and II carcinoma of the endometrium: a Gynecologic Oncology Group study. *Gynecol. Oncol.*, 1991, № 40, 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. New gynecologic cancer staging. *Obstet. Gynecol.*, 1990, № 75, p. 287-288). Stadializarea morfo-patologică 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., Bournoux 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 cu 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 în prezent angiogenezei, susținându-se că formarea vaselor noi de sânge este imperial necesară creșterii și răspândirii metastatice a tumorilor solide (O'Reilly M., Boehm T., Shing Y., Fukai N., Vasios G., Lane W., Flynn E., Birkhead J., Olsen B., Folkman J. Endostatin: an endogenous inhibitor of angiogenesis and tumor growth. 1997, № 88, 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 nivelul proteinei VEGF în celulele tumorale de gradul II și III de diferențiere a fost mai înalt decât în tumorile de gradul I sau endometrul normal menopauzal. În concluzie, VEGF contribuie la neovascularizarea tumorii și este unul din factorii care se referă la creșterea tumorală rapidă a cancerului endometrial [1].

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

Dezavantajele factorilor utilizați pentru diagnostic constau în aceea că sunt utilizate metode invazive pentru stabilire, care sunt utile 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 sunt rar detectate în țesuturile normale, dar care este prezent în cancerul ovarian (72%), endometrioză (75%), adenocarcinomul endometrial (33%) și țesuturile fetale [2].

Markerul cel mai frecvent depistat în cancerul endometrial este CA125. Rezultatele combinate a 5 studii separate arată 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 constituie 22%, la III și IV 82%. Totuși, CA125 nu este specific pentru adenocarcinomul endometrial, deoarece se întâlnește și în endometrioze, alte procese inflamatorii ale organelor reproductive, cancerul ovarian etc. [3].

Dezavantajele markerilor cunoscuți constau în aceea că nu sunt specifici îndeosebi pentru cancerul endometrial, ceea ce deseori duce la stabilirea incorectă a genezei tumorii sau la stabilirea incorectă a agresivității și a conduitei tratamentului chirurgical.

Problema pe care o rezolvă invenția constă în elaborarea unei metode de apreciere precoce efective neinvazive a agresivității cancerului endometrial, precum și pentru confirmarea lui, ceea ce dă posibilitate de stabilire a metodei optimale pentru tratamentul adjuvant pre- și postoperator și de determinare a volumului intervenției chirurgicale.

Esența invenției constă în aceea că se determină în țesuturile endometrial și miometrial nivelul de ARN mesager pentru triptofanhidroxilaza-1, și în cazul în care nivelul constituie 0...15 unități se determină o agresivitate majoră, 16...400 unități – o agresivitate medie, 400 unități și mai mult se determină o agresivitate scăzută a cancerului endometrial.

Rezultatul invenției constă în aceea că se efectuează o apreciere precoce neinvazivă a agresivității cancerului endometrial, ceea ce oferă posibilitatea de stabilire a metodei optimale pentru tratamentul adjuvant pre- și postoperator și de determinare a volumului intervenției chirurgicale.

Neoplaziile solide umane ar trebui privite ca un complicat, încă incomplet studiat sistem, a cărui funcție este menținută de o interacțiune dinamică între celulele-gazdă și celulele neoplazice (Ruitter D., Bogenreider T., Herlyn M. Melanoma-stroma interactions: Structural and functional aspects.

Lancet Oncol., 2002, № 3, p. 35-42). Această interacțiune constituie microreaul metabolic tumoral, definit ca entitate patofiziologică complexă ce rezultă în urma interperierii factorilor de auto-influențare care emerg în aceeași direcție: perfuzia tumorală, statutul oxigenării tumorale, distribuția pH-ului și statutul metabolic-bioenergetic (Vaupel P., Kallinowski F., Okunieff P., Blood flow, oxygen and nutrient supply and metabolic microenvironment of human tumors, a review. Cancer Res., 1989, № 49, p. 6449-6465).

5 Tumorile solide tind spre a avea un microreaul mai acid și mai hipoxic decât țesuturile normale. Acest microreaul ostil rezultă dintr-o disparitate între aportul cu oxigen și cerințele țesutului tumoral, totuși, tumoarea induce un aport nou de oxigen, care la rândul-i este inefficient și haotic. Creșterea tumorilor peste masa critică $>1...2 \text{ mm}^3$ (10^9 celule) este în funcție de un aport sangvinic adecvat. Până la o distanță de 100...200 μm de la vasele-gazde focarele inițiale ale celulelor neoplazice primesc oxigenul și nutriențele necesare prin difuzie. Odată cu îndepărtarea de la vase se instalează hipoxia și necesitatea în mărirea aportului sangvinic devine crucială. Oricum, constituirea acestui aport neovascular în încercarea de a contracara hipoxia este inefficientă și iregulară, și poate fi inițiată cu o rată similară celei a proliferației tumorale.

15 Rezultatul rezidă în prezența în masele tumorale a microregiunilor heterogene de celule hipoxice non-proliferative, care sunt înconjurate de celule vitale proliferative bine vascularizate (Freitas I., Baronzio G. Tumor hypoxia, reoxygenation and oxygenation strategies: Possible role in photodynamic therapy. J. Photochem. Photobiol., 1991, № 11, p. 3-30).

20 Formarea vaselor sangvine noi depinde de echilibrul dintre inhibitorii și promotorii angiogenezei. Hipoxia și hipoglicemia tumorală regională sunt principalii stimulatori ai expresiei citokinelor locale proangiogenice, în special a Factorului Vascular Endotelial de Creștere (VEGF) (Pugh C., Ratcliffe P. Regulation of angiogenesis by hypoxia role of the HIF system. Nat. Med., 2003, № 9, p. 677-684). Gena răspunsului genetic primar pe care-l face hipoxia este Factorul-1 Indus de Hipoxie (HIF-1), care este o proteină de 120 Kda și este foarte sensibilă la concentrația oxigenului (Semenza G. Homeostatic regulation by Hypoxia inducible factor. Science and Medicine, 2002, № 8, p. 338-347).

25 Adaptarea către hipoxie a celulelor neoplazice proliferative primare se produce prin inducerea genelor care reglează metabolismul anaerob, nitricoxidsintetaza și procesul angiogenezei. Studii recente au indicat că transcriptele HIF-1 și VEGF sunt supraexpresate în cazul multor celule neoplazice umane incluzând glanda mamară, prostata, stomacul, colonul, vezica și endometrul. În-deosebi, aceste transcripte sunt mai active în zonele hipoxice și necrotice (Papetti M., Herman I. Mechanisms of normal and tumor-derived angiogenesis. Am. J. Physiol. Cell. Physiol., 2002, № 282, p. 947-970).

30 Hipoxia pare a fi principalul stimul al producției și stabilizării VEGF, însă datele curente sugerează că VEGF poate fi mărit în mai multe feluri de tumori chiar și în lipsa hipoxiei. Această creștere rezultă din cel puțin 3 factori: (A) pierderea funcției a genei supresoare de tumori (cum ar fi von Hippel-lindau, p.53, p.16); (B) activarea oncogenelor (așa ca raf, ras, src, HER2/erb2(neu)); (C) cantitatea excesivă de factori de creștere produși de celulele tumorale și rețeaua lor înconjurătoare.

40 Achiziția noilor vase în creștere poate avea loc prin diferite mecanisme. Celulele epiteliale în mod normal sunt relativ statice și reglate de echilibrul fin dintre moleculele pro- și antiangiogenice. În prezența unei secreții excesive a moleculelor angiogenice de către tumori, celulele endoteliale sunt stimulate și acestea se autoorganizează în structuri vasculare printr-un proces secvențial distinct, care depinde de tipul tumorii și de localizarea anatomică. Aceste procese includ coaptarea vasculară, vasculogeneza și angiogeneza.

45 Coaptarea vasculară este procesul în cadrul căruia tumorile preiau vasele sangvine normale preexistente și le utilizează pentru creșterea lor inițială. După cum s-a mai specificat, acesta este un proces limitat și irelevant în marea majoritate a tumorilor solide; de fapt, celulele canceroase cresc până când cerințele în oxigen nu depășesc aportul sangvin și distanța de la vasele-gazdă este mai mică de 100...200 μm . Vasculogeneza este procesul în care precursorii celulelor endoteliale din măduva osoasă sunt recrutați de către tumori și agregați pentru a forma vase sangvine noi. Această cale a fost demonstrată recent în tumori experimentale pe animale, însă relevanța ei în neoplaziile umane nu este complet elucidată (Takakura N., Watanabe T., Suenobu S. A role for Hematopoietic stem cells in promoting angiogenesis. 2000, № 102, p. 199-209). Angiogeneza: în urma stimulilor adecvați, celulele endoteliale încep să se ramifice din capilarele preexistente și după degradarea matricei extracelulare (EMC) de către matrix metaloproteaze și expresia moleculelor de adeziune așa ca $\alpha\text{v}\beta_3$ integrin, celulele endoteliale migrează și se organizează în formarea tuburilor capilare și în fine într-o rețea vasculară (Kurebayashi J., Osuki T., Kunishe H. Expression of Vascular endothelial growth factor (VEGF) family members in breast cancer. Jpn. J. Cancer Res. 1999, № 90, p. 977-981).

60 Vasele sangvine asociate tumorilor tind să difere semnificativ în arhitectură de vasele țesutului normal adiacent și manifestă, în prezența VEGF și a altor citokine, o expresie scăzută a moleculelor adeziunii leucocit-endoteliale (ICAM-1, VCAM-1, E-selectin) și o expresie crescută a CD 44 (o

familie heterogenă de proteoglicani și glicoproteine ale membranei plazmatice ce participă la adeziunea matriței celulare, migrația celulară și metastazarea tumorii) (Griffioen A., Tromp S., Hillen H. Angiogenesis modulates the tumor immune response. *Int. J. Exp. Path.* 1998, № 79, p. 363-368). Expresia diminuată a moleculelor de adeziune reduce vădit recrutarea leucocitelor și a killerilor naturali (NKs), parțial contribuie la fenomenul de evaziune imună, în timp ce expresia elevată de CD44 poate conferi un avantaj în creșterea multor celule neoplazice. Mai mult decât atât, VEGF determină neovasele tumorale să devină mai lichide, pierzând proteine și alte macromoleculi în fața interstițiului. Lichidul acumulat în interstițiul tumoral (TIF-tumor interstitial fluid) ocupă 30...60% din volumul tumorii, având o componență diferită de cea a lichidului interstițial normal (Gullino P. Extracellular compartments of solid tumors. In: Beckert FB, ed. *Cancer, a Comprehensive Treatise*. Vol. 3, *Biology of Tumors: Cellular Biology and Growth*. New York: Plenum, 1975, p. 327-354). Retenția TIF cauzează o creștere a presiunii lichidului tumoral interstițial (TIFP) (Freitas I., Baronzio G., Bono B. Tumor interstitial Fluid: Misconsidered component of internal milieu of a solid tumor. *Anticancer Res.* 1997, № 17, p. 165-172).

O altă caracteristică importantă a microarealului tumoral este fluxul sangvin tumoral (TBF-tumor blood flow) care se determină prin divizarea diferenței presiunii arteriovenoase la rezistența fluxului în spațiu geometric (Jain R. Determinants of tumor blood flow: A review. *Cancer Res.*, 1988, № 48, p. 2641-2658). De obicei, în tumori diferența presiunii arteriovenoase este mai joasă decât în microcirculația normală, fapt cauzat de numărul majorat de fistule arteriovenoase prezente în periferia tumorii, ceea ce creează o rezistență la suprafața tumorii și oprește fluxul de a intra în masa tumorală. S-a mai constatat de asemenea că vasele tumorale noi sunt heterogene, bizare, ineficiente și nu au o anumită ierarhizare de la trunchiul de bază spre ramificările finale.

Viscozitatea în vasele tumorale s-a dovedit a fi elevată, ea corelând cu hematocritul și deformabilitatea celulelor circulante sangvine (Sevick E., Jain R. Viscous resistance to blood flow in solid tumors: Effect of hematocrit and intratumor viscosity. *Cancer Res.* 1989, № 49, p. 3513-3519). În mod normal diametrul capilarului variază între 3,5...20 μm, așadar, pe parcursul trecerii prin capilare eritrocitele și leucocitele trebuie să se supună deformării. În microvascularizarea tumorală, însă, diverși factori modifică deformabilitatea eritrocitelor și a leucocitelor. Astfel, presiunea parțială scăzută a oxigenului, pH-ul acid și concentrația crescută a fibrinogenului duc la scăderea deformabilității celulelor circulante sangvine, acestea devenind mai „cleioase” și în fine blochează fluxul sangvin tumoral.

Un alt factor modificator al viscozității este hematocritul, care, datorită pierderii de lichid în capilarele tumorale, duce la o hemoconcentrare consecventă și, respectiv, la o înrăutățire continuă a fluxului sangvin. Ca rezultat, fluxul sangvin tumoral nu este reglat în corespundere cu cerințele metabolice ca în cazul țesuturilor normale. Această adaptabilitate metabolică scăzută a celulelor către o ofertă sangvină iregulară (perfuzie sangvină) produce grupuri de celule ce duc lipsa nutrienților și oxigenului (celule hipoxice) (Durand R. Intermittent blood flow in solid tumours an under appreciated source of "drug resistance". *Cancer Metastasis Rev.*, 2001, № 20, p. 57-61). În fine, procesele trombozei intravasculare care se dezvoltă ca consecință a dereglărilor fluxului sangvin merită o atenție sporită (Baronzio G., Freitas I., Kwann H. Tumor microenvironment (hypoxia-interstitial fluid) and haemorrhagic abnormalities. *Semin Thromb Hemost.* 2003, № 29, p. 489-497). De fapt, majoritatea pacienților cu cancer au anomalități de coagulare asociate hipoxiei (Denko N., Giaccia A. Tumor hypoxia, the physiological link between Trousseau's Syndrome (carcinoma - induced Coagulopathy) and metastasis. *Cancer Res.*, 2001, № 61, p. 795-798). În studiile recente s-a demonstrat că hipoxia nu induce numai VEGF, dar de asemenea stimulează celulele endoteliale să hiperexpresze factorul tisular (TF) și inhibitorul activatorului de plasminogen (PAI). Acești factori determină endoteliul să devină protrombotic și cauzează formarea de fibrină și activarea plachetară (Verheul H., Hoekman J., Broxterman H. Vascular endothelial factor-stimulated endothelial cells promote adhesion and activation of platelets. 2000, № 96, p. 4216-4221). În adăție, VEGF se fixează către fibrinogen și fibrină stimulând proliferarea endotelială (Sahni A., Francis C. Vascular endothelial growth factor binds to fibrinogen and fibrin stimulates endothelial cell proliferation. 2000, № 96, p. 3772-3778). Fibrina s-a dovedit a fi esențială pentru susținerea migrării și răspândirii celulelor endoteliale. Sistemul hemostatic, într-un anumit sens, a devenit un regulator al angiogenezei, iar hipoxia este un mecanism perpetuu, capabil să inițieze angiogeneza, acumularea intratumorală a lichidului și tromboza.

Metoda propusă constă în utilizarea combinată a determinării nivelului Triptofan-hidroxilazei-1 și metodei histologice în diagnosticul cancerului endometrial. În urma efectuării RPA s-a determinat nivelul Tph-1, ulterior țesuturile preluate de la aceleași paciente au fost incluse într-un studiu morfopatologic. Piesele tisulare au fost fixate în formol 10%, deshidratate în soluție de alcool cu concentrații crescând și în clorofom, apoi au fost incluse în parafină la temperatura de 60%. Secțiunile au fost confecționate la microtom și colorate cu hematoxilină și eozină.

MD 3244 F1 2007.02.28

6

5 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 triptofan hidroxilază: 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.

În studiu s-a analizat nivelul 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.

10 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 phage polimerazei (T3, T7, or SP6) prin clonarea într-un vector plazmid sau prin utilizarea unui PCR primer ce conține secvența
15 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 poliacrila-
20 mid și vizualizat 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
25 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 metoda cu soluție hibridizantă aplicată 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
30 mapping-poziționarea joncțiunilor interne și externe în mRNA (Kekule et al., 1990, Melton et al., 1984, and Calzone et al., 1987).

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

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

- 35
- adăugarea 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

40

 - păstrarea timp de 2...3 min la temperatura camerei
 - 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

45

 - centrifugarea timp de 20 min, la un turaj de 12000 g la temperatura de 4°C
 - lichidul se aruncă, iar pe peretele eprubetei se formează „palete” 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 paletetele se desprind de pe peretele eprubetei

50

 - centrifugarea timp de 5 min, la un turaj de 7500 g la temperatura de 4°C
 - lichidul se aruncă, eprubetele se usucă bine în termoshaker la 37°C timp de 10 min, dar nu mai mult
 - adăugarea a câte 50 ul apă DEPC
 - urmează cuantificarea RNA-ului sau eprubetele se păstrează la -80°C.

55 Deoarece în diverse mostre de țesut cantitatea de RNA variază, este nevoie de a standardiza probele prin efectuarea spectrofotometriei sau cuantificarea RNA cu determinarea concentrației RNA:

- eprubetele cu RNA-ul extras se dezgheață și se păstrează pe gheață obișnuită (atenție! RNA-ul este foarte sensibil și degradează rapid)
- pentru fiecare eprubetă s-au notat altele două cu același număr

MD 3244 F1 2007.02.28

7

- în eprubetele noi s-au instilat câte 198 µl apă dublu-distilată și 2 µl de lichid ce conține RNA din țesutul extras, obținându-se astfel concentrația de 1:200
- agitarea 10 s
- conectarea fotospectrometrului și spălarea chiuvetei
- 5 • instilarea pe rând a câte 100 µl și determinarea concentrației RNA
- introducerea datelor în computer, calcularea valorii medii a concentrației RNA și stabilirea automată de către computer a volumului necesar de soluție ce trebuie extras din eprubetele păstrate la -80°C pentru RPA propriu-zis.

Descrierea RPA:

10 **I etapă: Marcarea cu ³²P radioactiv**

Transcripția *in vitro*:

- Proba (Plazmid linearizat) 0,5...1 µg
- Soluție tampon de transcripție (5x) 5 µl
- 15 • 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
- 20 • H₂O (DEPC) (10x) µl

În camera radioactivă (se lucrează cu un dozimetru special):

- P32 UTP 3 µl Atenție ! foarte radioactiv
- 25 • SP6 sau T7 polimeraze 1 µl
Total 25 µl

- agitarea și centrifugarea probelor 10 s
- incubarea la 37°C timp de 1 h

Între timp se toarnă gelul:

- 30 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

- 35 • De instilat 1 ml de DNase la fiecare tub și de centrifugat scurt (spin)
- Incubare la 37°C pe 20 min
- Între timp, gelul se toarnă în camerele de migrare și aparatul se conectează la 250 V
- Coloanele de încărcare cu probele RNA se spală cu ajutorul unei eprubete speciale
- Se ia 1 µl de probă și 8 µl de soluție tampon necesară
- 5 min incubare la 95°C, agitare și centrifugare
- 40 • Gelul se lansează pe 1h la 300 V
- Developarea gelului timp de 10 min și deschiderea lui
- Se măsoară radioactivitatea și se păstrează la -20°C

a II-a etapă sau I zi RPA

- 45 • 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
- Plasarea eprubetelor cu capacele deschise în vacuum centrifugă, centrifugarea 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
- 50 • 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)

55 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

MD 3244 F1 2007.02.28

8

2,6 µl hGAPDH

- 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

5

a III-a etapă sau a II-a zi RPA

- Buferul de digestie al RNasei, soluția de dezactivare a buferului. Buferul încărcat și glycoblu (marker de culoare albastră) se scot de la -25°C și se dezgheață la temperatura camerei timp de 30 min
- Pregătirea RNase-mix (s-au folosit 4 µl RNase A/T₁ la 200 µl de bufer de digestie pentru o probă) pentru 25 probe (în „yeast -” nu se pune) :
 1. 100 µl RNase
 2. 5000 µl (5 ml) bufer de digestie
- Se amestecă doar 5 s la master-mix (aparatură). Atenție ! RNase e foarte sensibilă. În camera radioactivă :
 - Se scot eprubetele cu probele din incubator, spin scurt
 - La fiecare probă s-au instilat câte 200 µl RNase-mix, iar în „yeast -” doar 200 µl de buferul de digestie
 - Incubare la 37°C pe 1 h
 - Între timp, se pregătește gelul :
 1. Ureea 9M 38,75 ml
 2. 10x TBE 5 ml
 3. Acrilamid 6,25 µl
 4. APC 10% 400 µl
 5. Temed 54 µl
 - Se amestecă bine, pe sticla de bază se aplică pe margini fâșia de cauciuc 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 inactivation-Mix (1,5 µl glycoblu la 300 µl de bufer de inactivare)
 - 300 µl inactivation-Mix 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 !
 - Între timp se montează sticlele cu gel în aparatul de migrare, se scot combele, în aparat se toarnă buferul de lucru 1x TBE (pe care l-am pregătit anterior: 100 ml 10x TBE + 900 ml apă dublu distilată și păstrat la 4°C), coloanele se spală de 3 ori cu aceeași soluție.
 - După ce s-a oprit centrifuga, se înlătură foarte atent supernatantul (faza superioară) ca să nu se aspire și paleta de culoare albastră (datorată glycoblu). Supernatantul se aruncă într-un vas special pentru lichide radioactive.
 - Spin scurt
 - Aspirarea cu pipeta de 20 µl a restului de supernatant
 - Adăugarea la fiecare tub a câte 8 µl de bufer de inactivare
 - Agitare, spin
 - Incubarea la 95°C pe 5 min
 - Agitare, spin
 - Spălarea repetată a coloanelor de gel
 - 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
 - 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

10

15

20

25

30

35

40

45

50

55

MD 3244 F1 2007.02.28

9

- 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 imprimat pe placa de absorbție de către RNA, în componența căruia este o bază marcată radioactiv.
- 5 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, dacă în endometrul recoltat din uterale de la paciente cu cancer endometrial nivelul ARN mesager pentru Tph-1 constituie 0...15 unități, se determină o agresivitate majoră, 16...400 unități – o agresivitate medie, 400 unități și mai mult se determină o agresivitate scăzută a cancerului endometrial.
- 10 După determinarea nivelului de ARN mesager pentru Tph-1, au fost studiate histologic țesuturile de endometru pregătite printr-o metodă, unde au fost studiați factorii ABCDE:
- A este nivelul de invazie al țesutului tumoral
- 1a – 1 punct
1b – 2 puncte
15 1c – 3 puncte
- B este diferențierea tumorii (grading)
- G1 – bine diferențiat (1 punct)
G2 – moderat diferențiat (2 puncte)
G3 – puțin diferențiat (3 puncte)
20 G4 – nediferențiat (4 puncte)
- C este numărul de straturi nucleare în glande : 1, 2, 3... (respectiv puncte)
D este polimorfismul nuclear
- Mic – 1 punct
Moderat – 2 puncte
25 Pronunțat – 3 puncte
- E este numărul de mitoze în câmpul de vedere 10x40 (respectiv puncte)
- 0 – absența diviziunilor mitotice
1 – o diviziune mitotică
2 – două diviziuni mitotice
30 3 – trei și mai multe diviziuni mitotice.
- Luând în considerație că cei mai siguri indici reprezentativi ai proliferării și diferențierii parenchimului tumoral sunt B, C, D, E, care, altfel fie spus, caracterizează agresivitatea tumorii, acești indici au fost calculați în ansamblu și s-a constatat cu certitudine că tumorile de cancer de endometru sunt cel mai bine diferențiate și au un potențial de creștere mai mic. Diferențierea tumorii este mai înaltă, numărul straturilor nucleare în glande mai mic, polimorfismul nuclear vădit mai mic, fapt ce denotă o diferențiere mai înaltă și activitatea proliferativă (numărul mitozelor) foarte redusă în grupul pacientelor cu nivelul ARN-ului mesager pentru Tph-1 înalt, și anume dacă nivelul este de 2...100 ori mai mare decât în miometru.
- 40 *Exemplul 1*
- Pacienta A., a.n. 1957, a fost internată în Institutul Oncologic, oncoginecologie pe 05.08.10 cu diagnosticul clinic de cancer al corpului uterin st.I T_{1b}N_xM₀, Tph1=344,8 unități. Pacienta a fost investigată clinic și paraclinic. Analiza generală a sângelui: hemoglobina 140 g/l; eritrocitele 4,6 mln.; hematocritul 0,44; leucocitele 5,3 mii.
- 45 Patologie concomitentă: Cardiopatie ischemică și dismetabolică, I.C. I N.I.H.A., colecistopancreatită cronică, diabet zaharat tip II (glicemia 8), obezitate gradul 3.
- După o serie de tratament preoperator, pacienta a fost supusă pe 05.08.20 la o intervenție chirurgicală de Histerectomie totală cu înlăturarea anexelor bilateral. Intraoperator: procesul tumoral ocupa toată cavitatea endometrială cu trecere pe canalul cervical. Histologia postoperator: adenocarcinom diferențiat cu invazie 1/3 miometrului.
- 50 La examenul histologic B-1, C-2, D-1, E-0, B+C+D+E=4 puncte.
- Pacienta a urmat, în cadrul tratamentului complex, o serie de tratament actinic postoperator. A fost externată în stare satisfăcătoare.
- 55 *Exemplul 2*
- Pacienta G., a.n. 1948, a fost internată în Institutul Oncologic, oncoginecologie cu diagnosticul clinic de cancer al corpului uterin T₂N_xM₀ Tph1= 64,2 unități.
- Pacienta a fost investigată clinic și paraclinic. Analiza generală a sângelui: hemoglobina 118 g/l; eritrocitele 3,4 mln.; hematocritul 0,4; leucocitele 7,5 mii.
- 60 Patologie concomitentă: Cardiopatie ischemică, colecistopancreatită cronică. După o serie de tratament preoperator, pacienta a fost supusă intervenției chirurgicale în volum de Histerectomie

MD 3244 F1 2007.02.28

10

totală cu înlăturarea anexelor bilateral. Intraoperator: procesul tumoral ocupa 2/3 superioare din cavitatea endometrială. Histologia postoperator: adenocarcinom papilar cu invazie a 1/3 din miometru.

La examenul histologic B-2, C-2, D-1, E-1, B+C+D+E=6 puncte.

5 Pacienta a urmat, în cadrul tratamentului complex, o serie de tratament actinic postoperator.

Exemplul 3

Pacienta C., a.n. 1935, a fost internată în Institutul Oncologic, oncoginecologie pe 05.08.15 cu diagnosticul clinic de cancer al corpului uterin, st.III T₃N_xM₀, Tph1=11,9 unități.

10 Pacienta a fost investigată clinic și paraclinic. Analiza generală a sângelui (05.08.12): hemoglobina 120 g/l; eritrocitele 3,7 mln.; hematocritul 0,4; leucocitele 6,0 mii.

Patologie concomitentă: colecistopancreatită cronică, boala varicoasă a membrelor inferioare, tromboflebită.

15 După o serie de tratament preoperator, pacienta a fost supusă pe 05.08.28 la o intervenție chirurgicală de Histerectomie totală cu înlăturarea anexelor bilateral. Intraoperator: procesul tumoral ocupa 2/3 superioare din cavitatea endometrială. Histologia postoperator: adenocarcinom papilar cu invazie a 2/3 din miometru cu trecere pe canalul cervical.

La examenul histologic B-3, C-3, D-2, E-1, B+C+D+E=9 puncte.

20 Pacienta a urmat, în cadrul tratamentului complex, o serie de tratament actinic postoperator.

(57) Revendicare:

25 Metodă de apreciere a agresivității cancerului endometrial, care constă în determinarea în țesuturile endometrial și miometrial a nivelului de ARN mesager pentru triptofanhidroxilaza-1, și în cazul în care nivelul constituie 0...15 unități se determină o agresivitate majoră, 16...400 unități – o agresivitate medie, 400 unități și mai mult se determină o agresivitate scăzută a cancerului endometrial.

30

(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, 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
3. Jacobs I., Bast R. The CA125 tumour-associated antigen: a review of the literature. Human Reprod., № 4, 1989, p. 1-12

Director adjunct Departament:

GUȘAN Ala

Examinator:

GROSU Petru

Redactor:

CANȚER Svetlana