

ФЕДЕРАЛЬНАЯ СЛУЖБА
ПО ИНТЕЛЛЕКТУАЛЬНОЙ СОБСТВЕННОСТИ

(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ПАТЕНТУ

(21)(22) Заявка: 2012102727/15, 26.01.2012

(24) Дата начала отсчета срока действия патента:
26.01.2012

Приоритет(ы):

(22) Дата подачи заявки: 26.01.2012

(45) Опубликовано: 27.09.2013 Бюл. № 27

(56) Список документов, цитированных в отчете о поиске: 2402464 A1, 04.01.2012. US 20110151490 A1, 23.06.2011. PEDRO PIMENTEL-NUNES et al. Decreased Toll-interacting protein and peroxisome proliferator-activated receptor γ are associated with increased expression of Toll-like receptors in colon carcinogenesis. J. Clin. Pathol 7 January 2012; Vol. 65, Iss. 4 pp.302-308. KONSTANTINOS E. TSIMOGIANNIS (см. прод.)

Адрес для переписки:

197758, Санкт-Петербург, пос. Песочный, ул. Ленинградская, 68, ФГБУ "НИИ онкологии им. Н.Н. Петрова" Минздрава России, отдел планирования и координации научных исследований

(72) Автор(ы):

Белоусова Татьяна Александровна (RU),
Раскин Григорий Александрович (RU),
Беляев Алексей Михайлович (RU),
Байкова Оксана Владимировна (RU),
Орлова Рашида Вахидовна (RU),
Протасова Анна Эдуардовна (RU)

(73) Патентообладатель(и):

федеральное государственное бюджетное учреждение "Научно-исследовательский институт онкологии имени Н.Н. Петрова" Министерства здравоохранения Российской Федерации (RU)

C1
02 04 94 40 2 C1

(54) СПОСОБ ОПРЕДЕЛЕНИЯ TLR 2, TLR 3, TLR 4 У БОЛЬНЫХ КОЛОРЕКТАЛЬНЫМ РАКОМ В ПОСЛЕОПЕРАЦИОННОМ ПЕРИОДЕ

(57) Реферат:

Изобретение относится к области медицины, в частности к онкологии, патологической анатомии, и может быть использовано для прогнозирования воспалительных осложнений после операций по поводу колоректального рака. Способ состоит в том, что на 3-5 сутки после операции проводят иммуноцитохимическое исследование с целью выявления TLR 2, TLR 3, TLR 4 на лейкоцитах в перитонеальном выпоте, при этом исследование выполняют разведением антител к данным рецепторам - 1/200 и

инкубацией в течение 12 часов в холодильной камере при температуре +4 - +8°C, и в случае выявления позитивной реакции на TLR 2 и/или TLR 3 и/или TLR 4 прогнозируют воспалительные осложнения в зоне оперативного вмешательства, а в случае негативной реакции - их отсутствие. Способ позволяет прогнозировать развитие воспалительных осложнений в зоне оперативного вмешательства, обладает простотой, доступностью, информативностью и надежностью. 4 пр.

(56) (продолжение):

et al. Toll-like receptors in the inflammatory response during open and laparoscopic colectomy for colorectal

R U 2 4 9 4 4 0 2 C 1

R U 2 4 9 4 4 0 2 C 1

R U 2 4 9 4 4 0 2 C 1

cancer, *Surgical Endoscopy*, 2012, Vol. 26, Iss. 2, pp 330-336, Epub 2011 Sep 5. NIHON-YANAGI Y. et al. Tissue expression of Toll-like receptors 2 and 4 in sporadic human colorectal cancer. *Cancer Immunol. Immunother.*, 2012 Jan, Vol. 61, Iss. 1, pp.71-77. Epub 2011 Aug 4. NIHON-YANAGI Y. et al. Tissue expression of Toll-like receptors 2 and 4 in sporadic human colorectal cancer. *Cancer Immunol. Immunother.*, 2012 Jan, Vol. 61, Iss. 1, pp.71-77. Epub 2011 Aug 4.

R U 2 4 9 4 0 2 C 1

RUSSIAN FEDERATION



FEDERAL SERVICE
FOR INTELLECTUAL PROPERTY

(19) RU (11) 2 494 402⁽¹³⁾ C1

(51) Int. Cl.
G01N 33/53 (2006.01)

(12) ABSTRACT OF INVENTION

(21)(22) Application: 2012102727/15, 26.01.2012

(24) Effective date for property rights:
26.01.2012

Priority:

(22) Date of filing: 26.01.2012

(45) Date of publication: 27.09.2013 Bull. 27

Mail address:

197758, Sankt-Peterburg, pos. Pesochnyj, ul.
Leningradskaja, 68, FGBU "NII onkologii im. N.N.
Petrova" Minzdravsvotsrazvitija RF, otdel
planirovaniya i koordinatsii nauchnykh issledovanij

(72) Inventor(s):

Belousova Tat'jana Aleksandrovna (RU),
Raskin Grigorij Aleksandrovich (RU),
Beljaev Aleksej Mikhajlovich (RU),
Bajkova Oksana Vladimirovna (RU),
Orlova Rashida Vakhidovna (RU),
Protasova Anna Ehduardovna (RU)

(73) Proprietor(s):

Federal'noe gosudarstvennoe budzhetnoe
uchrezhdenie "Nauchno-issledovatel'skij institut
onkologii imeni N.N. Petrova" Ministerstva
zdravookhranenija Minzdrava Rossii Rossijskoj
Federatsii (RU)

(54) METHOD OF POSTOPERATIVE TLR 2, TLR 3, TLR 4 DETECTION IN PATIENTS SUFFERING COLORECTAL CANCER

(57) Abstract:

FIELD: medicine.

SUBSTANCE: for the purpose of prediction the postoperative inflammatory complications following a colorectal cancer surgery, on the 3rd-5th postoperative day, the immunocytochemistry aims at leukocyte TLR 2, TLR 3, TLR 4 detection in ascites; the study involves the 1/200 dilution of the above receptor antibodies and the 12-hour incubation in a cold room at temperature +4 - +8°C, and if

observing a positive TLR 2 and/or TLR 3 and/or TLR 4 response, the inflammatory complications within the surgical area are predicted, while a negative response show the absence thereof.

EFFECT: method enables predicting the development of the inflammatory complications within the surgical area; it is characterised by simplicity, availability, information value and reliability.

4 ex

R U 2 4 9 4 0 2 C 1

Изобретение относится к области медицины, в частности к онкологии, патологической анатомии, и может быть использовано для прогнозирования воспалительных осложнений после операции по поводу колоректального рака.

Толл-подобные рецепторы активируются различными лигандами, которые являются структурными компонентами бактерий, вирусов и грибков. Например, толл-подобный receptor 4 типа узнает и связывается со структурой клеточной стенки грамотрицательных бактерий - липополисахаридом, а толл-подобный receptor 2 типа связывается с гликолипидами и липопротеинами стенки грамположительных бактерий, толл-подобный receptor 3 типа связывается с компонентом вирусной стенки. Рецепторы локализуются на клеточной мемbrane и играют ключевую роль во врожденном иммунитете.

Известен способ прогнозирования воспалительных осложнений, основанный на выявлении TLR-4 путем иммуногистохимического исследования [Cammarota R, Bertolini V, Pennesi G et al. The tumor microenvironment of colorectal cancer: stromal TLR-4 expression a potential prognostic marker. J Transl Med. 2010 Nov 8; 8:112].

Недостатками способа являются: 1) сложность получения материала для исследования (рецепторы определяются в перитуморозных тканях) -инвазивность процедуры; 2) длительность подготовки препарата для исследования, не менее 2-х суток, так как используются гистологические срезы, а в этом случае рецепторы - антигены - оказываются менее доступными для взаимодействия с моноклональными антителами.

Известен способ прогнозирования воспалительных осложнений, основанный на выявлении TLR-4 путем иммунофлюоресцентного исследования, при котором TLR рецепторы определяются на моноцитах периферической крови [Ono S, Tsujimoto H, Hiraki S. et al. Preoperative Toll-like receptor expression in monocytes is associated with host immunological responses following gastrointestinal surgery. World J Surg. 2011 Feb; 35(2):365-71].

К недостатку данного способа относят отсутствие точной локализации воспалительного процесса, так как положительная реакция на TLR говорит о том, что это может быть как интраабдоминальная инфекция, так и пневмония.

Техническим результатом предлагаемого изобретения является возможность прогнозирования воспалительных осложнений в зоне оперативного вмешательства после операции по поводу колоректального рака.

Указанный технический результат достигается тем, что в способе прогнозирования воспалительных осложнений после операции по поводу колоректального рака, согласно изобретению на 3-5 сутки после операции проводят иммуноцитохимическое исследование с целью выявления TLR2, TLR3, TLR4 на лейкоцитах в перитонеальном выпоте; при этом, исследование выполняют иммуноцитохимическим методом с разведением антител к данным рецепторам - 1/200 и инкубацией в течение 12 часов в холодильной камере при температуре +4-+8°C, и в случае выявления позитивной реакции на TLR2 и/или TLR 3 и/или TLR 4 прогнозируют воспалительные осложнения в зоне оперативного вмешательства, а в случае негативной реакции - отсутствие данных осложнений.

Проведенные исследования показали, что из 17 больных с положительными TLR 2, 4 у 8 больных развились осложнения (1 перитонит, 6 нагноений послеоперационной раны, у одного пациента - нагноение послеоперационной раны и пневмония). У 8 пациентов TLR 2, 3, 4 не были обнаружены.

Всего было обследовано 25 пациентов после операции по поводу колоректального

рака.

При положительной реакции - вероятность развития гнойно-воспалительных осложнений составляет 47%.

При отрицательной реакции - вероятность развития гнойно-воспалительных осложнений составляет 0%.

Способ осуществляют следующим образом.

Перитонеальный выпот собирают на 3-е - 5-е сутки послеоперационного периода, в зависимости от времени нахождения дренажа в брюшной полости, что в свою очередь зависит от его функциональной активности. К полученным 20-40 мл жидкости добавляется равное количество раствора Хенкса (глюкозо-солевой раствор для хранения и транспортировки клеток) и доставляется в лабораторию. В случае отсутствия выпота выполняется смыв с брюшины раствором Хенкса в количестве 40 мл.

Выпотные жидкости центрифугируют с образованием осадка, который в дальнейшем обрабатывают на цитоцентрифуге Cytospin 4 при среднем ускорении, 800 оборотах в минуту в течение 4-х минут. Для приготовления одного цито-препарата используют 200 мкл осадка, который вносится при помощи микропипетки Biohit до 1000 мкл в собранную пробирку Cytophanel (состоящей из цитоклипа, cytophanel, белого фильтра Cytospin и предметного стекла толщиной 1 мм со шлифованным полем для записи). Полученные цито-препараты высушивают и окрашивают по стандартной методике Романовского и гематоксилин-эозином.

Окрашенный препарат подвергают микроскопическому исследованию. Врач-цитолог оценивает цитологическую картину, клеточную концентрацию, после чего выбирается нужное количество осадка для образования одного мазка при помощи Cytospin 4. Цитологический препарат фиксируются в холодном ацетоне в течение 10 минут и обрабатывается раствором для ингибирования эндогенной пероксидазы в течение 5 минут. После промывки трис-буфере осуществляется инкубация первых антител к TLR2 (abeam, клон ab9100, разведение 1:200), TLR3 (abeam, клон ab13915, разведение 1:200), TLR4 (abeam, клон ab47093-100, разведение 1:200) в течение ночи в условиях холодильной камеры (+4-+8°C). Выявление реакции осуществляется при помощи системы визуализации EnVision в течение 30 минут, в качестве хромогена используется диаминобензидин. Окрашенный препарат оценивается врачом-цитологом. Оценивается мембранные и цитоплазматическая реакция.

Оценивают процент позитивных лейкоцитов, положительной считается реакция, если количество окрашенных лейкоцитов более 10%. В данном случае у пациента прогнозируют развитие воспалительных осложнений.

Сущность способа подтверждается следующими клиническими примерами.

Пример 1. Больная А. 51 года, поступила с диагнозом: рак прямой кишки. В перитонеальной жидкости на 5-е сутки после операции определили положительную реакцию на TLR 4. На 8-е сутки послеоперационного периода у пациентки обнаружилось обширное нагноение послеоперационной раны.

Пример 2. Больная Э. 54 лет, поступила с диагнозом: рак прямой кишки. На 5-е сутки послеоперационного периода в выпоте из брюшной полости определили положительную реакцию на TLR 2 и TLR 4. В последующем у пациентки возникло обширное нагноение послеоперационной раны.

Пример 3. Больной Т. 64 лет, поступил с диагнозом: рак прямой кишки. На 3-е сутки после низкой передней резекции прямой кишки в выпоте из брюшной полости

реакция на TLR 2, 3, 4 была отрицательная. На 5-е сутки дренаж из брюшной полости был удален и дальнейший послеоперационный период протекал без воспалительных осложнений.

Пример 4. Больная П. 65 лет, поступила с диагнозом: рак прямой кишки. На 3-е сутки после видеоассистированной передней резекции прямой кишки в выпоте из брюшной полости реакция на TLR 2, 3, 4 была отрицательная. В послеоперационном периоде воспалительных осложнений не было отмечено.

Предлагаемый способ позволяет прогнозировать развитие воспалительных осложнений в зоне оперативного вмешательства. Способ обладает простотой, доступностью, информативностью и надежностью.

Формула изобретения

Способ прогнозирования воспалительных осложнений после операции по поводу колоректального рака, отличающийся тем, что на 3-5-е сутки после операции проводят иммуноцитохимическое исследование с целью выявления TLR 2, TLR 4, TLR 3 на лейкоцитах в перитонеальном выпоте; при этом исследование выполняют иммуноцитохимическим методом с разведением антител к данным рецепторам 1/200 и инкубацией в течение 12 ч в холодильной камере при температуре 4 - 8°C и в случае выявления позитивной реакции на TLR 2, и/или TLR 3, и/или TLR 4 прогнозируют воспалительные осложнения в зоне оперативного вмешательства, а в случае негативной реакции - отсутствие данных осложнений.

25

30

35

40

45

50