

- (11) Patento numeris: **6574** (51) Int. Cl. (2018.01): **C12M 1/00**
- (21) Paraiškos numeris: **2017 504**
- (22) Paraiškos padavimo data: **2017-03-30**
- (41) Paraiškos paskelbimo data: **2018-10-10**
- (45) Patento paskelbimo data: **2018-12-27**
- (62) Paraiškos, iš kurios dokumentas išskirtas, numeris: —
- (86) Tarptautinės paraiškos numeris: —
- (86) Tarptautinės paraiškos padavimo data: —
- (85) Nacionalinio PCT lygio procedūros pradžios data: —
- (30) Prioritetas: —
- (72) Išradėjas:
Valdas ŠABLINSKAS, LT
Gerald STEINER, DE
Feliksas JANKEVIČIUS, LT
Milda PUČETAITĖ, LT
Vidita URBONIENĖ, LT
Martynas VELIČKA, LT
Justinas ČEPONKUS, LT
- (73) Patento savininkas:
Vilniaus Universitetas, Universiteto g. 3, LT-01513 Vilnius, LT
- (74) Patentinis patikėtinis/atstovas:
**Otilija KLIMAITIENĖ, AAA Law, A. Goštauto g. 40B, Verslo centras "Dvyniai",
LT-03163 Vilnius, LT**

- (54) Pavadinimas:
Vėžinėms ląstelėms būdingų spektrinių žymenų identifikavimo būdas

- (57) Referatas:

Išradimas yra susijęs su vėžinių audinių charakterizavimui skirtais būdais, o tiksliau su spektrinės tarpląstelinio skysčio analizės vėžinių audinių charakterizavimui skirtu būdu. Vėžinėms ląstelėms būdingų spektrinių žymenų identifikavimo būdas apima šviesolaidžio zondo (1) foninio spektro be tarpląstelinio skysčio bandinio (2) užregistravimą; ant šviesolaidinio zondo (1) galo esančios visiško vidaus atspindžio prizmės audinio tarpląstelinio skysčio bandinio (2) užnešimą; bandinio (2) džiovinimą sausu oru; tarpląstelinio skysčio bandinio sugerties spektro 4000 - 600 cm⁻¹ spektrinėje srityje užregistravimą; spektro analizės atlikimą spektrinėje srityje nuo 1200 iki 1000 cm⁻¹.

Išradimo sritis

Išradimas yra susijęs su vėžinių audinių charakterizavimui skirtais būdais, o tiksliau su spektrinės tarpląstelinio skysčio analizės vėžinių audinių charakterizavimui skirtu būdu.

Technikos lygio aprašymas

Atliekant naviko pažeisto organo ar audinio rezekciją chirurginės operacijos metu, reikalinga informacija apie tikslią ribą tarp navikinių ir sveikų audinių. Deja, vizualiai ši riba dažnai sunkiai identifikuojama. Rutiniškai naudojamas intraoperacinės audinių diagnostikos būdas - biopsijų arba histologinis užšaldytų pjūvių būdas, užima daug laiko, reikalauja specialaus mėginio paruošimo, priklauso nuo gydytojo patologo subjektyvaus įvertinimo. Yra žinoma, kad audinių infraraudonosios sugerties spektrų skirtumai įgalina atskirti įvairių organų vėžinį audinį nuo normalaus audinio, tačiau šio būdo patikimumo padidinimui turi būti naudojami sudėtingi statistiniai spektrinių duomenų apdorojimo būdai. Statistinės analizės būdų taikymas įveda galimybę papildomoms paklaidoms, nes labai priklauso nuo matematinio aparato taikymo pasirinkimo. Dėl šios priežasties, šis būdas yra netinkamas operatyviam vėžinių audinio sričių aptikimui.

Mokslinėse grupėse atliekami tyrimai pagrįsti audinio spektrinių žymenų analize (Mark A. Mackanos, Christopher H., „Fiber-optic probes enable cancer detection with FTIR spectroscopy“, Trends in Biotechnology, Contag, Volume 28, Issue 6, p317-323, June 2010; A. B. Seddon, "Midinfrared photonics for early cancer diagnosis", 2014 16th International Conference on Transparent Optical Networks (ICTON)). Tačiau audinių spektrinius tyrimus apsunkina keletas problemų. Visų pirma, audiniuose labai daug vandens todėl jų spektriniai tyrimai labai apsunkinami. Vanduo intensyviai sugeria spinduliuotę infraraudonojoje spektro srityje, todėl stipriai iškraipomos kitų medžiagų, galinčių būti navikų indikatoriais, spektrinių juostų intensyvumas. Dažnai šiai problemai spręsti naudojamas krio džiovinimas (audinys (biopsija) yra užšaldomas skystame azote, -195° C temperatūroje, o tuomet atpjaunamas plonas jo sluoksnis, kuris džiovinamas uždėjus ant stiklinės plokštelės). Tačiau tokia procedūra reikalauja daug laiko specialios įrangos, be to šaldymas gali būti papildomas netikslių tyrimų faktorius. Kitas būdas yra naudoti ne sugerties, o Ramano skaidos tyrimų metodikas, tačiau tam reikalinga

intensyvi nuo 0,1 iki 2 W lazerinė spinduliuotė, todėl tokių tyrimų dėl galimų terminių ir fotocheminių audinių pažeidimų negalima naudoti in vivo tyrimų metu. Artimiausias analogas yra atskleistas JAV patentinėje paraiškoje Nr. US 07/478,581. Aprašytas mėginio analizės ant šviesolaidinio zondo spektro analizės būdas. Aprašyta labai bendra spektrinės analizės infraraudonojoje spektrinėje srityje metodika, tinkanti bet kokių pokyčių organinių junginių sistemoje charakterizavimui. Tačiau nėra nurodoma kuriose specifinėse skysto mėginio spektro srityse turėtų būti atliekama analizė.

Šiuo būdu atliekama spektrų analizė, yra tinkama naudoti su prietaisais, tokiais kaip šviesolaidinio pluošto zondai, kurie yra aprūpinti spektrometrais, siekiant padidina tiriamų mėginių spektrus charakterizuojančių duomenų patikimumą ir supaprastina bei pagreitina jų gavimą, siekiant nustatyti spektrines juostas (žymenis) būdingas navikinėms ląstelėms.

Trumpas išradimo aprašymas

Tarpląstelinio skysčio, tokio kaip pavyzdžiui randamo ant inksto vėžinio audinio, infraraudonosios sugerties spektrinių juostų santykiniai intensyvumai yra patikimi vėžinių audinio sričių žymenys. Tokiuose spektruose dominuoja spektrinės juostos, priskiriamos vandens, amino rūgščių, cukraus, riebiųjų rūgščių, fermentų, hormonų, druskų bei ląstelių metabolizmo produktų molekulėms. Dėl labai skirtingo ląstelių augimo greičio, normalių ir vėžinių ląstelių tarpląstelinio skysčio cheminė sudėtis, o tuo pačiu ir infraraudonosios sugerties spektrai, ženkliai skiriasi. Tarpląstelinio skysčio spektrinį tyrimą galima atlikti be specialaus mėginių paruošimo ir tiesiogiai operacinėje chirurginės intervencijos metu.

Trumpas brėžinių aprašymas

Kiti išradimo požymiai ir privalumai yra aprašomi detaliame išradimo aprašyme su nuoroda į žemiau pateiktus brėžinius:

1 Pav. yra pavaizduoti inkstų audinio tarpląstelinio skysčio infraraudonosios sugerties spektrai.

2 Pav. yra pavaizduota principinė bandinio tyrimo sistemos schema.

Prieš pateikiant detalų išradimo aprašymą su nuoroda į išradimo įgyvendinimo pavyzdžių brėžinius, atkreipiame dėmesį, kad identiški elementai yra pažymėti tokiais pačiais skaitmenimis visuose brėžiniuose.

Detalus išradimo aprašymas

Turėtų būti suprantama, kad daugybė konkrečių detalių yra išdėstytos, siekiant pateikti pilną ir suprantamą išradimo pavyzdinio įgyvendinimo aprašymą. Tačiau srities specialistui bus aišku, kad išradimo įgyvendinimo pavyzdžių detalumas neapriboja išradimo įgyvendinimo, kuris gali būti įgyvendintas ir be tokių konkrečių nurodymų. Gerai žinomi būdai, procedūros ir sudedamosios dalys nebuvo detaliai aprašyti, kad išradimo įgyvendinimo pavyzdžiai nebūtų klaidinantys. Be to, šis aprašymas neturi būti laikomas apribojančiu pateiktus įgyvendinimo pavyzdžius, o tik kaip jų įgyvendinimas.

Tarpląstelinio skysčio, tokio kaip pavyzdžiui randamo ant inksto vėžinio audinio, infraraudonosios sugerties spektrinių juostų santykiniai intensyvumai yra patikimi vėžinių audinio sričių žymenys. Tokiuose spektruose dominuoja spektrinės juostos, priskiriamos vandens, amino rūgščių, cukraus, riebiųjų rūgščių, fermentų, hormonų, druskų bei ląstelių produktų molekulėms. Dėl labai skirtingo ląstelių augimo greičio, normalių ir vėžinių ląstelių tarpląstelinio skysčio cheminė sudėtis, o tuo pačiu ir infraraudonosios sugerties spektrai, ženkliai skiriasi. Tarpląstelinio skysčio spektrinį tyrimą galima atlikti be specialaus mėginių paruošimo ir tiesiogiai operacinėje chirurginės intervencijos metu, naudojant įprastinę įrangą aprūpintą infraraudonųjų spindulių spektroskopijai atlikti tinkamą šviesolaidinį zondą su visiško vidaus atspindžio prizme.

Vėžinėms ląstelėms būdingų spektrinių žymenų identifikavimo būdas naudojant tarpląstelinį skystį apima:

- šviesolaidžio zondo (1) foninio spektro be tarpląstelinio skysčio bandinio (2) užregistravimą;

- ant šviesolaidinio zondo (1), kuris su spinduliuotę generuojančia optika (3) yra sujungtas bent vienu

infraraudonųjų spindulių spektroskopijai atlikti tinkamu įeinančio signalo šviesolaidžiu (4') ir bent vienu išeinančio signalo šviesolaidžiu (4''), kurie yra, pavyzdžiui, polikristaliniai sidabro halidai, ir sujungto su standartiniu infraraudonosios sugerties spektrometru (5), galo esančios visiško jo vidaus atspindžio (ATR) prizmės, tokios kaip silicio ATR prizmės, audinio tarpląstelinio skysčio bandinio (2) užnešimą;

- bandinio (2) džiovinimą sausu oru, pageidautinai 30-300 s;

- tarpląstelinio skysčio bandinio (2) sugerties spektro $4000 - 600 \text{ cm}^{-1}$ spektrinėje srityje užregistravimą.

Spektro analizė yra atliekama konkrečioje siauroje spektrinėje srityje nuo 1200 iki 1000 cm^{-1} . Spektrinės juostos šioje srityje yra sąlygotos gliukozės ir jos polimero glikogeno sugerties. Kadangi gliukozės suvartojimas navikinės ląstelės labai išaugęs lyginant su normaliomis, todėl ir šios medžiagos kiekiai tarpląsteliniame skystyje, aprūpinčiame ląsteles medžiagomis yra stipriai išaugę (Jones, R.G., Thompson, C.S. "Tumor suppressors and cell metabolism: a recipe for cancer growth," GENES & DEVELOPMENT 23, 537-548 (2009).; Gatenby, R.A., Gillies, R.J., "Why do cancers have high aerobic glycolysis?," Nature Reviews Cancer 4 (11), 891-899 (2004).; Zois C. E., Favaro E., Harries, A. L., "Glycogen metabolism in cancer," Biochemical Pharmacology 92,3-11 (2014)). Tarpląstelinio skysčio bandinys gali būti įvertinamas:

a) vizualiai lyginant žinomo sveiko ir tiriamojo audinio tarpląstelinio skysčio bandinių spektrus; arba

b) panaudojant programinę įrangą, ir atliekant:

b1) pirminį spektrų apdorojimą, bazinės linijos korekciją ir normavimą. Tai yra standartinės procedūros, kurias atlieka bet kurio komercinio spektrometro programinė įranga;

b2) spektrinių juostų $1200 - 1000 \text{ cm}^{-1}$ integrinio intensyvumo skaičiavimą;

b3) gautos vertės palyginimą su sveikų audinių tarpląstelinio skysčio būdinga spektrinių juostų $1200 - 1000 \text{ cm}^{-1}$ integrinio intensyvumo verte.

Tyrimas

1 paveiksle yra pateikti užregistruoti inkstų audinio tarpląstelinio skysčio infraraudonosios sugerties spektrai, kurie buvo gauti būdu, apimančiu aukščiau išvardintus žingsnius. Tarp sveiko ir navikinio audinio tarpląstelinio skysčio spektrų matomi labai aiškūs skirtumai $1000 - 1200 \text{ cm}^{-1}$ spektrinėje srityje. Matomos sugerties juostos yra susijusios su gliukozės ir glikogeno molekulių sugertimi. Jų navikinio audinio tarpląsteliniame skystyje gali būti iki 200 kartų daugiau nei normalaus audinio tarpląsteliniame skystyje. Glikogeno kiekio sveikame ir navikiniame audinyje vertinimai pagal Gatenby, R.A., Gillies, R.J., "Why do cancers have high aerobic

glycolysis?," Nature Reviews Cancer 4 (11), 891-899 (2004). Stebint tokius didelius skirtumus nėra reikalinga papildoma statistinė duomenų analizė. Naviko buvimas/nebuvimas gali būti įvertintas tiesiog vizualiai žiūrint į spektrą. Tokių akivaizdžių spektrinių skirtumų buvimas/nebuvimas taip pat gali būti įvertinamas programiškai. Programiško įvertinimo būdas apima tokius žingsnius: suskaičiuoja integrinį spektrinių juostų intensyvumą (spektrinio kontūro apribotą plotą (optinis tankis $\times$ bangos skaičius cm^{-1})) srityje nuo $1000\text{--}1200\text{ cm}^{-1}$ ir pasiekus integrinio intensyvumo slenkstinę vertę viršijančią būdingą sveikam audiniui informuoja programos naudotoją, jog aptikti navikiniai audiniai. Ribinė integrinio intensyvumo vertė nustatoma iš sukauptos sveikų audinių spektrų bibliotekos.

Tokie dideli spektriniai skirtumai stebimi tik tarpląstelinio skysčio spektruose. Tiriant pačių audinių, o ne tarpląstelinio skysčio spektrą, tokie ryškūs spektriniai tyrimai nėra stebimi.

Išradimas leidžia greitai ir patikimai gauti navikinių audinių diagnostikai reikalingus duomenis, analizei nereikalaujant specifinių su prietaisu dirbančių operatoriaus žinių. Duomenys analizei gali būti gaunami ir *in situ* operacijos metu, per laiko trukmės neviršijančias 10 min. Analizės duomenims gauti nereikia jokio bandinio paruošimo, ar sensibilizacijos.

Nors išradimo aprašyme buvo išvardinta daugybė charakteristikų ir privalumų, kartu su išradimo struktūrinėmis detalėmis ir požymiais, aprašymas yra pateikiamas kaip pavyzdinis išradimo išpildymas. Gali būti atlikti pakeitimai detalėse, ypatingai medžiagų formoje, dydyje ir išdėstyme nenutolstant nuo išradimo principų, vadovaujantis plačiausiai suprantamomis apibrėžties punktuose naudojamų sąvokų reikšmėmis.

IŠRADIMO APIBRĖŽTIS

1. Vėžinėms ląstelėms būdingų spektrinių žymenų identifikavimo būdas apimantis mėginio infraraudonosios sugerties spektrų analizę naudojant šviesolaidžio zondą (1) b e s i s k i r i a n t i s tuo, kad infraraudonosios sugerties spektrų analizę apima žingsnius:

a) šviesolaidžio zondo (1) foninio spektro be tarpląstelinio skysčio bandinio (2) užregistravimą;

b) ant šviesolaidinio zondo (1), kuris su spinduliuotę generuojančia optika (3) yra sujungtas bent vienu infraraudonųjų spindulių spektroskopijai atlikti tinkamu įeinančio signalo šviesolaidžiu (4') ir bent vienu išeinančio signalo šviesolaidžiu (4''), ir sujungto su standartiniu infraraudonosios sugerties spektrometru (5), galo esančios visišką o vidaus atspindžio (ATR) prizmės audinio tarpląstelinio skysčio bandinio (2) užnešimą;

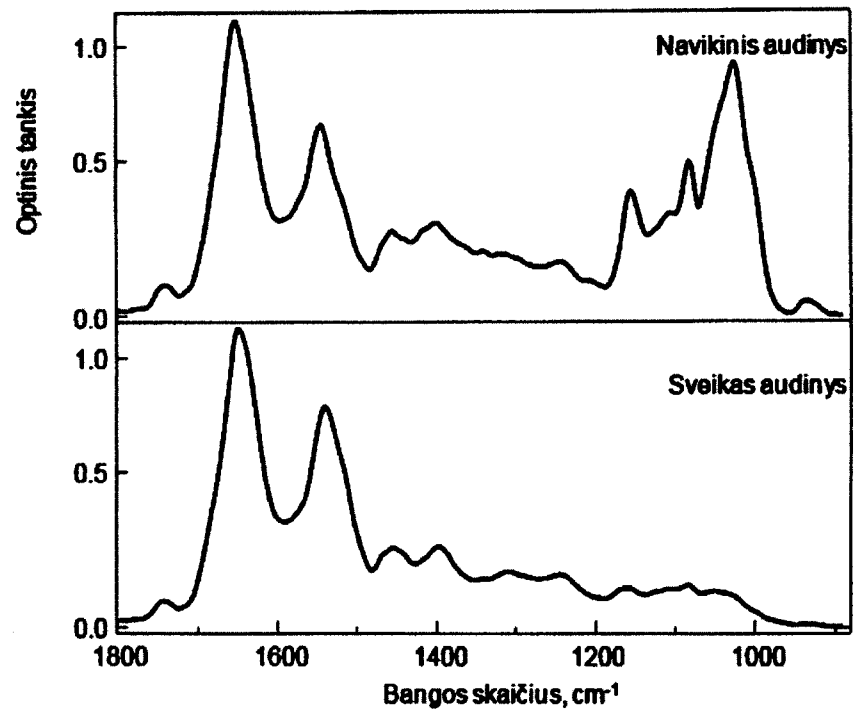
c) bandinio (2) džiovinimą sausu oru;

d) tarpląstelinio skysčio bandinio sugerties spektro $4000 - 600 \text{ cm}^{-1}$ spektrinėje srityje užregistravimą;

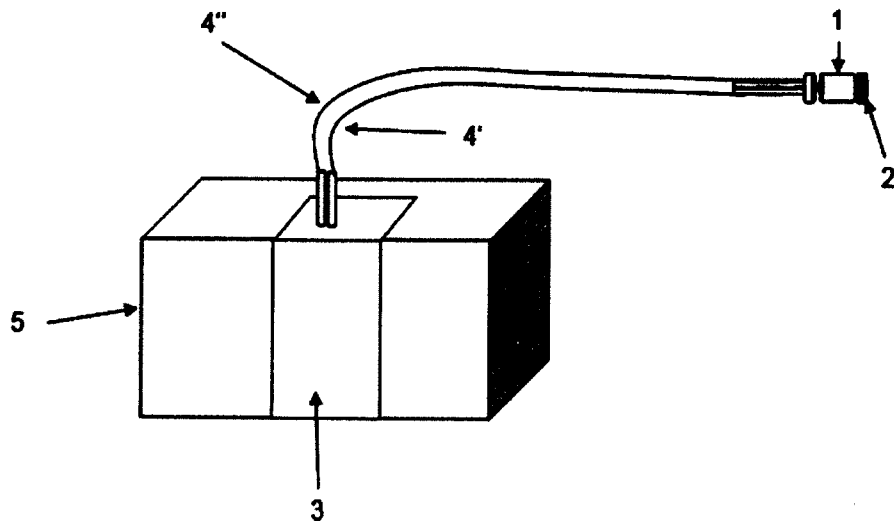
e) spektro analizės atlikimą spektrinėje srityje nuo 1200 iki 1000 cm^{-1} .

2. Būdas pagal 1 punktą, kur infraraudonosios sugerties spektrinės juostos yra vandens, amino rūgščių, cukraus, riebiųjų rūgščių, fermentų, hormonų, druskų bei ląstelių produktų molekulių spektrinės juostos.

3. Būdas pagal 1 punktą, kur infraraudonosios sugerties spektrinės juostos yra sąlygotos gliukozės ir jos polimero glikogeno sugerties.



1 Pav.



2 Pav.