



УКРАЇНА

(19) UA (11) 44645 (13) A

(51) 6 G01N33/48, C12N5/00

МІНІСТЕРСТВО ОСВІТИ
І НАУКИ УКРАЇНИДЕРЖАВНИЙ ДЕПАРТАМЕНТ
ІНТЕЛЕКТУАЛЬНОЇ
ВЛАСНОСТІОПИС
ДО ДЕКЛАРАЦІЙНОГО ПАТЕНТУ
НА ВИНАХІДВИДАЄТЬСЯ ПІД
ВІДПОВІДАЛЬНІСТЬ
ВЛАСНИКА
ПАТЕНТУ

(54) СПОСІБ ВИЗНАЧЕННЯ ПОКАЗАНЬ ДО ГОРМОНОТЕРАПІЇ РАКУ МОЛОЧНОЇ ЗАЛОЗИ

1

2

(21) 2001074753

(22) 09 07 2001

(24) 15 02 2002

(46) 15 02 2002, Бюл. № 2, 2002 р.

(72) Чешук Валерій Євгенович, Яремчук Олександр Якович, Бережна Нінель Михайлівна, Ковальчук Альона Вікторівна, Козленко Олександр Васильович

(73) НАЦІОНАЛЬНИЙ МЕДИЧНИЙ УНІВЕРСИТЕТ
ІМ. О. О. БОГОМОЛЬЦЯ

(57) Спосіб визначення показань до гормонотерапії раку молочної залози, що включає дослідження

пухлини і виявлення в ній рецепторів естрогену та прогестерону, який відрізняється тим, що після операційні експлантати з пухлини культивують у дифузійних камерах протягом 5 діб, поділяють на контрольний та досліджувані зразки, в останні додають етинілестрадіол та медроксипрогестерон в розрахунку 0,00002 мг та 0,2 мг, відповідно, на 2 мл культурального середовища, відтворюють тримірний ріст пухлинних клітин, порівнюють результати і при стимуляції чи пригніченні росту клітин у досліджуваному матеріалі судять про показання до гормонотерапії

Винахід відноситься до медицини, а саме до онкології, і може бути використаний для визначення показань до гормонотерапії в комплексному лікуванні раку молочної залози (РМЗ).

Рак молочної залози – це перша за частотою локалізація раку в жінок. В Україні в 90-х роках захворюваність складає 56 випадків на 100000 населення [1] і тенденція до зростання продовжується.

Більш ніж столітній досвід вивчення різних аспектів раку молочної залози і різних методів його лікування вказують на те, що естрогени є ведучими факторами в канцерогенезі пухлин молочної залози в експерименті і клініці. Процес канцерогенезу включає три основних етапи: ініціації, промоції і прогресії. Відомо, що, якщо ініціація нормальної клітини молочної залози відбулася, то естрогени забезпечують реплікацію ушкодженої клітини. Таким чином, естрогени є основним біологічним субстратом розвитку раку молочної залози.

Гормонотерапія раку молочної залози займає визначне місце в комплексному лікуванні даної патології. Починаючи з 1996 року [2] вона зазнала значних змін: якщо на перших етапах це було хірургічне видалення яєчників, то в наступні роки розроблялися методи консервативного впливу на органи, що беруть участь у синтезі естрогенів [3].

В даний час гормональні препарати застосовуються на різних етапах комбінованого і комплексного методів лікування операбельних форм раку молочної залози, а також у випадках генералізації

пухлинного процесу. Значний прогрес у лікуванні раку молочної залози внесли дослідження з виявлення і кількісного визначення в пухлинних клітинах рецепторів до естрогенів і прогестерону [4]. У 1962 р. вперше вдалося припустити існування рецепторів естрогенів у пухлинах, а пізніше використовувати визначення рівня цих рецепторів для прогнозування гормоночутливості. Виявлення рецепторів стероїдних гормонів (естрогенів, прогестерона) на оболонці клітин рака молочної залози відкрило великі перспективи. Відомо, що пухлини з позитивними гормональними рецепторами чутливі до гормонотерапії в 50-65% випадків. У той же час, якщо пухлина містила один тип рецептора, чутливість пухлини значно знижувалася. Приблизно 20% пухлин резистентні до лікування. Поряд з цим у 15% випадків, при відсутності гормональних рецепторів в пухлині спостерігається ефективність гормонотерапії. В даний час є загальноприйняте положення, що, якщо більш 10% пухлинних клітин містять рецептори до естрогену чи прогестерону, то пухлину варто вважати гормоночутливою [3].

Відомий спосіб визначення показань до гормонотерапії раку молочної залози, розроблений Санкт-Петербурзькою школою мамологів [5] шляхом виділення патогенетичних груп хворих, які ґрунтувалися на віці хворих, менструальному статусі, спадковості та ін. Цей напрямок був відображений в методичних рекомендаціях патогенетичного лікування РМЗ [6] і є аналогом визначення показань до гормонотерапії раку молочної залози.

(19) UA (11) 44645 (13) A

За прототип нами вибраний спосіб визначення показань до гормонотерапії РМЗ шляхом визначення рецепторів естрогену та прогестерону в пухлині [3, 4]

До недоліків прототипу слід віднести те, що визначення рецепторів гормонів в пухлині РМЗ не повністю співпадає з ефективним лікуванням гормонами [2, 3]. Це обумовлено тим, що первинна пухлина складається з біологічно різних популяцій клітин, які можуть мати різний вміст рецепторів і відповідно мати різну чутливість до гормонотерапії [7]. Суттєвим є те, що у 28% хворих у перименопаузі і 17% хворих у постменопаузі рецептори до естрогенів і прогестерону відсутні [3], що потребує інших підходів до призначення гормонотерапії. Наявність рецепторів до гормонів не завжди визначає ступінь чутливості пухлини до гормональних препаратів. Задачею заявленого винаходу є підвищення точності визначення показань до гормонотерапії раку молочної залози.

Технічний результат, який отримують в результаті вирішення задачі, полягає у правильному виборі тактики гормонотерапії, що сприяє покращанню результатів лікування хворих на рак молочної залози, подовженню тривалості життя хворих та підвищенню безрецидивної виживаності. Залежно від того чи буде стимуляція росту клітин пухлини, пригнічення його чи деструкція клітин індивідуально будуть призначені рекомендації до гормонотерапії. Спосіб дозволяє визначити хворих, у яких не буде ефекту від гормонального лікування і навпаки визначити хворих з тим чи іншим ступенем чутливості до гормонів. Такий підхід дозволить утриматися від неправильного призначення гормонотерапії, в тих випадках, де ефекту не буде і навпаки, можливе прогресування захворювання при призначенні стандартних схем гормонотерапії.

Поставлену задачу досягають тим, що у відомому способі, який включає дослідження пухлини і виявлення в ній рецепторів естрогену та прогестерону, відповідно до винаходу, післяопераційні експлантати з пухлини культивують у дифузійних камерах протягом 5 діб, поділяють на контрольний та досліджувані зразки, в останні додають етинілестрадіол та медроксипрогестерон в розрахунку 0,00002мг та 0,2мг, відповідно, на 2мл культурального середовища, відтворюють тривимірний ріст пухлинних клітин, порівнюють результати і при стимуляції чи пригніченні росту клітин у досліджуваному матеріалі судять про показання до гормонотерапії.

Спосіб виконують таким чином. Під час операції у хворих на рак молочної залози (після секторальної резекції залози з пухлиною) беруть операційний матеріал (кусок пухлини, розміром 2 x 2мм і поміщують його в культуральне середовище RPMI-1640. Матеріал транспортують до лабораторії протягом 1-3 годин, хоч можливе перебування кусочка пухлини в середовищі і холодильній камері до 1 доби. Операційний матеріал подрібнюють до шматочків 1мм, їх розміщують на фільтри дифузійної камери, і поміщують в 24 лубочні планшети з культуральним середовищем RPMI-1640 з додаванням глютаміну та 20% ембріональної телячої сироватки терміном на 5 діб при +37°C і

5% вмісту CO₂. Через 5 діб фільтри дифузійної камери фіксують спиртом-фармолом, забарвлюють гематоксилином за Карачі, просвітлюють в ксилопі та заключають в канадський бальзам [8]. За допомогою дифузійних камер відтворюють тривимірний ріст пухлинних клітин у короткострокових культурах. Через три доби культивування на поверхні мілпорних фільтрів формуються багаточисельні колонієподібні структури, орієнтовані по спіралі навколо центра (сфероїди). Виділяють контрольну культуру та досліджувані, в які додають окремо етинілестрадіол (синтетичний естроген) з розрахунку 0,001мг/кг – в пропорційному перерахунку на 2мл культурального середовища з експлантатом тобто 0,00002мг та медроксипрогестерон (синтетичний прогестин) Останній додають в дозі 10мг/кг, тобто 0,2мг на 2мл культурального середовища. Дози були перераховані в пропорціях з клінічного використання в онкологічній практиці [9]. Окремо вирощують контрольну групу клітин для порівняння дії гормонів, куди не додають гормональних препаратів. Для диференційного визначення особливостей росту експлантатів пухлин, ізольованих пухлинних клітин та їх взаємодії з гормонами використовували 9-бальну систему морфологічної оцінки [8], яка давала можливість детально охарактеризувати ріст пухлинних клітин в дифузійних камерах і представити дані в графічному режимі: 1 Ріст відсутній 2 Невиразний ріст, міграція пухлинних клітин 3 Створення моношару початкові етапи 4 Поява моношару низької густини (опосередкований ріст) 5 Створення моношару середньої густини 6 Початкові етапи сфероїд утворення конгломерати клітин 7 Сфероїд утворення (1-2 сфероїди в полі зору) 8 Сфероїдоутворення (3-5 сфероїдів у полі зору) 9 Інтенсивне сфероїдоутворення (10-12 сфероїдів у полі зору).

Паралельно із другої частини пухлини після виконання основного об'єму операції вивчають гістологічну будову пухлин та вміст в них рецепторів гормонів за допомогою імуногістохімічних методик [10], для співставлення результатів з отриманими результатами в експерименті *in vitro*.

Приклади конкретних виконань

Хвора Грищенко В.М., 48 років, № аік-1573-01, № і хв-1360 7.02.2001 р. оперована з приводу раку лівої молочної залози 1 стадії, T₁ N₀ M₀, 2 клінічна група. Виконана секторальна резекція молочної залози з експрес патогістологічним дослідженням пухлини. Після того, як отримали гістологічне підтвердження діагнозу – хворий продовжена операція (через 30 хвилин), обсяг якої розширений до мастектомії за Пейті. Одночасно в стерильних умовах взяли кусочок пухлини розміром 2 x 2мм і помістили його в культуральне середовище RPMI-1640. Матеріал транспортували до лабораторії, де проводили дослідження росту експлантатів пухлини в культуральному середовищі з додаванням туди стероїдних гормонів (етинілестрадіол та медроксипрогестерон). У пухлині імуногістохімічно виявили рецептори до естрогену-ER++, та прогестерону-PR+++ Реакція експлантатів пухлини була наступною: контроль – 1 бал росту, в середовищі з етинілестрадіолом – теж 1 бал, та з медроксипрогестероном 2 бали. Як видно з

експерименту – ріст пухлини стимулює прогестерон, тоді як для естрогену не відрізняється від контролю

Хвора Малиновська В.В. № аік 4180/00, 49 років, № 1 хв 2782 12.03.2001 р. оперована з приводу раку правої молочної залози 1 стадії T1NOMO 2 клінічної групи. Виконано мастектомію за Пейті. В пухлині імуногістохімічно не виявили рецептори до естрогену-ER-, та прогестерону-PR. Реакція експлантатів пухлини була наступною: контроль – 1 бал росту, в середовищі з етинілестрадіолом та з медроксипрогестероном – теж 1 бал. Як видно з експерименту при відсутності гормональних рецепторів на поверхні клітин пухлини РМЗ не буде реакції на дію стероїдних гормонів.

Проведено дослідження у 30 пацієнток віком 28-72 років, при поширеності процесу T1-2,NO-1,MO. Передопераційне опромінення та хіміотерапія не проводились для того, щоб не пригнітити ріст клітин пухлини в культивувальному середовищі.

Результати. Склад рецепторів у клітинах пухлин РМЗ відповідав літературним даним: 80% пухлин містили гормональні рецептори, але кількість і склад їх були різними. Відмічено, що при відсутності гормональних рецепторів на клітинах пухлини, відповідно був відсутній будь-який ефект на дію гормонів. У 20% експлантатів пухлин, що теж відповідає літературним даним, відмічено відсутність ефекту від дії гормонів при наявності гормональних рецепторів у клітинах пухлини. Серед решти пухлин з позитивними гормональними рецепторами у 10% експлантатів пухлини реакція пригнічення росту клітин пухлини порівняно з контролем під дією мікрофоліну та прогестерону, це може бути показанням до застосування їх в терапії даної хворої. У 20% відмічена стимуляція росту клітин під дією провери і в 30% експлантатів пухлин відмічена стимуляція росту клітин під дією мікрофоліну і провери.

Література

1. Федоренко З.П., Бондар С.В., Войкшнарас Є.Б., Злоякісні новоутворення в Україні в 1993-

1995 рр. //національний канцер реєстр України – К 1996 – 103 с.

2. Beatson G.T. On the treatment of inoperable cases of carcinoma of the mamm. Suggestions for a new method of treatment with illustrative cases. //Lancet 2 104,162, – 1986.

3. McGuire et al. Evaluation of estrogen receptor assays in human breast cancer tissue. Cancer Res, 1977, 37, 637-639.

4. Jensen E.V., DeSombre E.R., Jungblut P.N. Estrogen receptors in hormone responsive tissues and tumors. Endogenous Factors Influencing Host-Tumor Balance. Chicago, University of Chicago Press, 1967, p. 5.

5. Семиглазов В.Ф., Винин А.Г., Моисеєнко В.М. Минимальный рак молочной железы – Санкт-Петербург "Гиппократ", 1992 – 240 с.

6. Тарутінов В.І., Досенко І.В., Шпильова С.І. Принципи формування індивідуальних планів етапного лікування хворих на рак молочної залози з урахуванням основних патогенетичних форм захворювання – Київ, 1999 – 24 с.

7. Tubiana M. The scientific bases of cancer management at the interface between fundamental research and clinical practice. J. Cancer Res. Clin. Oncol., 1991, 117, 275.

8. Якимович Л.В., Бережная Л.М., Семенова-Кобхарт Р.А., Коноваленко В.Ф., Толстомятов Б.А. Использование метода Диффузионных камер для выявления больных со злокачественными образованиями, подлежащих иммунотерапии рекомбинантным интерлейкином-2. //Информационное письмо – Киев – 1988 – 10 с.

9. Комpendиум 1999/2000 – лекарственные препараты. //Под ред. В.Н. Коваленко, А.П. Викторова – К. Морион, 1999 – 1200 с.

10. Ермилова В.Д., Литвинова Л.В., Бассалык А.С., Кузьмина З.В. Сравнительное иммуногистохимическое и биохимическое изучение рецепторов эстрогенов в раке молочных желез. // Архив патологии – 1989 – Т.5, Вып. 2 – С. 60-63.