



УКРАЇНА

(19) UA (11) 55887 (13) U
(51) МПК (2009)
G01N 33/48

МІНІСТЕРСТВО ОСВІТИ
І НАУКИ УКРАЇНИ

ДЕРЖАВНИЙ ДЕПАРТАМЕНТ
ІНТЕЛЕКТУАЛЬНОЇ
ВЛАСНОСТІ

ОПИС ДО ПАТЕНТУ НА КОРИСНУ МОДЕЛЬ

видається під
відповідальність
власника
патенту

(54) СПОСІБ ДІАГНОСТИКИ РИЗИКУ ПРОГРЕСІЇ ГІПЕРПЛАЗІЇ ЕНДОМЕТРІЯ В ПЕРЕДРАК ТА РАК ЕНДОМЕТРІЯ

1

2

(21) u201008128

(22) 29.06.2010

(24) 27.12.2010

(46) 27.12.2010, Бюл. № 24, 2010 р.

(72) КАРТАШОВ СЕРГІЙ МИХАЙЛОВИЧ, ЯКИМОВА ТАМАРА ПЕТРІВНА, КАЛАЄВА АКАМАРАЛ ГУЙЧМУРАДІВНА, КАРТАШОВА МАРИНА ОЛЕКСАНДРІВНА

(73) ХАРКІВСЬКА МЕДИЧНА АКАДЕМІЯ ПІСЛЯ-ДИПЛОМНОЇ ОСВІТИ

(57) Спосіб діагностики ризику прогресії гіперплазії ендометрія в передрак та рак ендометрія, який

здійснюють шляхом проведення гістологічного дослідження, який **відрізняється** тим, що додатково в крові визначають метилування гена ESR, і при визначенні гіперплазії ендометрія без атипії (проста, комплексна) при метильованому ESR гені діагностують ризик розвитку передраку і раку ендометрія, при визначенні атипової гіперплазії ендометрія (проста, комплексна) при метильованому ESR гені діагностують високий ризик розвитку раку ендометрія.

Корисна модель відноситься до медицини, а саме до онкології і може бути використана для діагностики прогресії гіперплазії ендометрія в передрак та рак ендометрія на основі метилування гена ESR.

Існуючі клінічні методи діагностики (ультразвукове дослідження, радіометрія, гістеросальпінгографія, вивчення гормонального статусу, визначення рецепторів стероїдних гормонів в тканині ендометрія, імунологічні методи, гістерокопія, вискоблювання слизової матки, зондування матки) не можуть повністю задовольнити клініцистів зважаючи на недостатню інформативність, відсутність можливості відобразити нозологічну специфічність патологічного процесу, тривалі і трудомісткі у виконання і майже всі є інвазивними методами (Бреусенко В.Г. Патология эндометрия в периоде постменопаузы (Патогенез, клиника, диагностика, терапия) Дисс. док. мед. наук.: Москва, 1989.).

Найбільш поширеним у всьому світі скринінг-методом діагностики раку ендометрія є цитологічний метод дослідження, точність діагностики якого досягає 60-84% (Ганина К.П. Цитогенетическая диагностика в онкоморфологии. Киев: Наукова Думка. 1980. - 176с.).

При цитологічному дослідженні (світловій мікроскопії) аналіз проводиться візуально і результатом є якісний опис морфології, що не дозволяє об'єктивізувати і кількісно оцінити отримані результати. Інтерпретація цитологічних досліджень може бути утруднена із-за поганої якості препаратів, а також чинників, які можуть викликати зміни в ендометрії, особливо запалення.

Електронно-мікроскопічне дослідження дозволяє отримати загальні уявлення про розподіл хроматину в ядрі клітини, але методика не дає можливості оцінити функціональний стан генома, достатньо трудомістка, особливо в підготовці матеріалу для дослідження.

Поширеним у розпізнаванні внутріматкової патології є гістологічне дослідження зскрібків слизової матки, отриманих при діагностичному вискоблюванні (Hoffken H., Hemmersbach E., Hebeirling D., Leppien G.-Möglichkeiten und Grenzen der konventionellen Differential - diagnostik am Endometrium.- Zentralbl Gynakol., 1984, 421-430), який обраний за прототип. Проте при цьому неодмінною умовою є бокова біопсія і видалення всієї слизової матки. Залишення змінених ділянок ендометрія в подальшому може приводити до необґрунтованного діагнозу рецидиву захворювання.

(19) UA (11) 55887 (13) U

До того ж морфологічна будова пухлини не завжди повністю відповідає біологічному перебігу пухлинного процесу, не дозволяє оцінити структурні і функціональні зміни хроматину ядра, що є ключовою ланкою як в процесах онтогенезу і клітинної адаптації, так і на ранніх етапах патогенезу багатьох захворювань, зокрема злоякісних пухлин (Ганина К.П. Цитогенетическая диагностика в онкоморфологии. Киев: Наукова Думка. 1980. - 176с.).

Дослідження останніх років свідчать про те, що пухлини людини відносяться до мультифакторіальної патології, на схильність до якої з різним ступенем впливають як зовнішньо-середовищні, так і генетичні фактори. Це у повній мірі стосується і пухлинної патології ендометрія, оскільки його патогенез обумовлений не тільки гормональним дисбалансом, а й іншими, поки ще мало вивченими факторами, насамперед, генетичними. Тому, задачею сучасної онкології є пошук генетичних маркерів онкологічних захворювань, які дозволять не тільки розпізнавати пухлинний процес на ранніх стадіях його розвитку, а й виявляти пацієнтів, що схильні до виникнення злоякісних новоутворень.

В основу корисної моделі поставлено задачу удосконалення способу діагностики ризику прогресії гіперплазії ендометрія в передрак та рак ендометрія, в якому за рахунок додаткового дослідження, досягається визначення метилування гену, який є маркером ризику виникнення онкозахворювань.

Поставлена задача вирішується в способі діагностики ризику прогресії гіперплазії ендометрія в передрак та рак ендометрія, який здійснюють шляхом проведення гістологічного дослідження, згідно з корисною моделлю, додатково в крові визначають метилування гена ESR, і при визначенні гіперплазії ендометрія без атипії (проста, комплексна) при метильованому ESR гені діагностують ризик розвитку передраку і раку ендометрія, при визначенні атипової гіперплазії ендометрія (проста, комплексна) при метильованому ESR гені діагностують високий ризик розвитку раку ендометрія.

ESR ген - ген рецепторів естрогену кодує рецептор естрогену, активізований лігандом фактор транскрипції, складений з кількох областей, важливих для гормонального закріплення, закріплення ДНК, і активації транскрипції. Рецептори естрогену також втягнуті до патологічних процесів, включаючи рак молочної залози, ендометріальний рак.

Спосіб, що заявляється, здійснюють таким чином.

Виконують гістологічне дослідження тканин, яке містить вивчення зіскрібків з порожнини матки, пухлинної тканини ендометрія, лімфатичних вузлів, тканини сальника. Обробку матеріалу і отримання гістологічних препаратів проводять відповідно до стандартної методики. Відповідно класичній гістологічній методиці при обробці тканин застосовують фіксацію у 10% розчині нейтрального формаліну, проводка по спиртам зростаючої концентрації, заливка в парафінові блоки. Виготовляють зрізи товщиною 5-7мкм, які зафарбовують гематоксиліном і еозином, і за методом Ван-Гізона. При гістологічному дослідженні врахо-

вують характер патологічного процесу і визначають мітотичний індекс і кількість патологічних мітозів за методом Алова А.І. Крім того, вивчають частоту патологічних мітозів в групах пацієнток при різних формах гіперплазії ендометрія. Після огляду препарату під мікроскопом визначають тип пухлини, гістологічну структуру, ступень диференціювання. Для характеристики морфологічної структури раку тіла матки керуються гістологічною класифікацією пухлин BOO3.

У всіх хворих в сироватці крові методом полімеразно-цепної реакції (ПЦР) було вивчено наявність метилування гена ESR. Після виділення ДНК з сироватки крові визначають метилування промоторної області гена ESR, для цього ДНК обробляють метилчутливими рестриктазами. Пошук сайтів рестрикції здійснюють за допомогою програми «WIN-SUN» (Sambrook, Fritsch, Maniatis. Molecular cloning. // Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989. - 250).

Приклад 1.

Хвора М. 45 років, діагноз: проста гіперплазія ендометрія без атипії, обстежена - набрана кров для визначення гена ESR - ген не метильований. Проведено діагностичне вискоблювання порожнини матки. Гістологічно: проста гіперплазія ендометрія без атипії. Проведений курс гормональної терапії (депо-перевірка 1000мг внутрішньом'язово 1 раз на тиждень 3 місяці). Проведено повторно вискоблювання порожнини матки. Не виявлено гістологічно рецидиву гіперплазії ендометрія.

Приклад 2.

Хвора М. 42 років, діагноз: проста гіперплазія ендометрія без атипії, обстежена - набрана кров для визначення гена ESR - ген метильований. Проведено діагностичне вискоблювання порожнини матки. Гістологічно: проста гіперплазія ендометрія без атипії. Проведений курс гормональної терапії (депо-перевірка 1000мг внутрішньом'язово 1 раз на тиждень 3 місяці). Проведено повторно вискоблювання порожнини матки. Виявлено гістологічно рецидив гіперплазії ендометрія.

Приклад 3.

Хвора П., 40 років, проведено діагностичне вискоблювання порожнини матки, гістологічно-аденокарцинома. Набрана кров на визначення гену ESR - метильований. Враховуючи вище викладене, вирішено провести хірургічне лікування в об'ємі екстирпації матки з придатками.

Наявність епігенетичних порушень (метилування) гена ESR було проведено у 159 хворих PE і у 94 пацієнток з гіперплазією ендометрія (68 гіперплазія без атипії і 26 хворих - гіперплазія с атипії). До операції досліджувану сироватку крові заморожують (до 10-18 градусів C). Наступним етапом дослідження було виділення ДНК, для чого з тканини отримують гомогенізатор, до якого додають протеїназу і інкубують 12 годин при 37°C. Потім виконують екстракцію ДНК і полімеразну цепну реакцію (ПЦР) за допомогою програмованого термочеклера фірми «Techne» з використанням термофільної ДНК - полімерази (НПО «Ферментас», м. Вільнюс). Для визначення метилування промоторної області генів ESR ДНК обробляють метилчутливими рестриктазами. Пошук сайтів рестрик-

тації здійснюють за допомогою програми «WIN-SUN».

Проведені дослідження виявили, що при гіперплазії ендометрія без атипії (простій, комплексній) при метильованому ESR гені ризик розвитку передраку і раку ендометрія у 3,5 рази вище, ніж при не метильованому ESR гені ($0,75/2,63=3,5$).

При атипічній гіперплазії ендометрія (простій, комплексній) при метильованому ESR гені ризик розвитку передраку і раку ендометрія в 5,5 рази вище, ніж при не метильованому ESR гені ($0,62/3,42=5,5$).