



УКРАЇНА

(19) UA (11) 63483 (13) U
(51) МПК (2011.01)
G01N 21/00
G01N 33/00

ДЕРЖАВНА СЛУЖБА
ІНТЕЛЕКТУАЛЬНОЇ
ВЛАСНОСТІ
УКРАЇНИ

ОПИС ДО ПАТЕНТУ НА КОРИСНУ МОДЕЛЬ

видається під
відповідальність
власника
патенту

(54) СПОСІБ ДИФЕРЕНЦІЙНОЇ ДІАГНОСТИКИ ГІПЕРПЛАСТИЧНИХ ПРОЦЕСІВ ТА АДЕНОКАРЦИНОМИ ЕНДОМЕТРІЯ

1

(21) u201103121

(22) 17.03.2011

(24) 10.10.2011

(46) 10.10.2011, Бюл.№ 19, 2011 р.

(72) ТУМАНСЬКИЙ ВАЛЕРІЙ ОЛЕКСІЙОВИЧ, БАУДАРБЕКОВА МСРУЕРТ МОНТАЇВНА

(73) ЗАПОРІЗЬКИЙ ДЕРЖАВНИЙ МЕДИЧНИЙ УНІВЕРСИТЕТ, ТУМАНСЬКИЙ ВАЛЕРІЙ ОЛЕКСІЙОВИЧ, БАУДАРБЕКОВА МСРУЕРТ МОНТАЇВНА

(57) Спосіб диференційної діагностики гіперпластичних процесів і аденокарциноми ендометрія, що включає морфологічне дослідження зскрібів ендометрія, який **відрізняється** тим, що проводять імуногістохімічне дослідження, визначають маркери рецепторів гормонів естрогенів та прогестерону в тканині ендометрія, а також рецептори білків-маркерів проліферації та апоптозу, визначають гормонозалежність пухлини та потенційну проліферативну активність процесу за рівнем естрогенових рецепторів (максимально - 300 балів, мінімально - 0 балів), рівень прогестеронових

2

рецепторів (максимально - 300 балів, мінімально - 0 балів), визначають чутливість (або її відсутність) до гестагенової терапії за рівнем прогестеронових рецепторів, при цьому високий рівень (більше ніж 200 балів) та помірний рівень (100-200 балів) естрогенових рецепторів свідчить про гормонозалежність процесу та вірогідно високу проліферативну активність, високий рівень рецепторів (більше ніж 200 балів) до прогестерону є сприятливим прогностичним показником, при цьому при визначенні ступенів градації показників маркерів Ki-67, PCNA, p-53 та bcl-2 оцінку в 0-1 бали розцінюють як низьку експресію, 2 бали - як помірну експресію, 3-4 бали - як виразну експресію відповідного маркера, виразна експресія Ki-67 та PCNA свідчить про високу проліферативну активність епітеліоцитів залоз ендометрія, низька експресія білка bcl-2 свідчить про відсутність або слабку виразність процесів апоптозу, а виразна експресія білка p-53 свідчить про високий злоскісний потенціал гіперпластичних процесів і пухлин.

Корисна модель належить до медицини, а саме, гінекології, патологічної анатомії та може бути використана в диференційній діагностиці гіперпластичних процесів та аденокарциноми ендометрія.

Складність діагностики гіперпластичних процесів та злоскісних пухлин ендометрія полягає в тому, що клінічна картина при них тотожна (основний симптом - кровотеча з порожнини матки). Існуючі клінічні методи діагностики (ультразвукове дослідження, радіометрія, гістеросальпінгографія, вивчення гормонального стану, імунологічні методи, гістероскопія, зондування порожнини матки) неспроможні повністю задовольнити клініцистів, оскільки вони недостатньо інформативні, в них відсутня можливість продемонструвати нозологічну специфічність патологічного процесу.

Найбільш близьким за технічною суттю та результатом, що досягається, є спосіб, який полягає в кількісному морфоденситометричному дослідженні змін інтерфазного хроматину ядер залозистих клітин ендометрія при гіперпластичних процесах та аденокарциномі ендометрія. Як біологічний

матеріал беруть відбитки ендометрія, які були отримані при діагностичному вишкрібанні слизової матки, фіксують сумішшю Нікіфорова, проводять рибонуклеазну обробку, забарвлюють галоціанін-хромовими квасцями, фіксують канадським бальзамом, мікроденсують інтерфазний хроматин залозистих клітин ендометрія і на основі отриманих параметрів (Comp IOD 1, C Std OD2, IOD, PERIMETR) розраховують показник:

$$DF=0,00013 \cdot \text{Comp IOD } 1 + 3,98725 \cdot \text{C Std OD2} + 0,00001 \cdot \text{IOD} + 0,01213 \cdot \text{PERIMETR} - 13,4409$$

та при позитивному значенні показника діагностують рак ендометрія, при негативному - доброякісні процеси ендометрія. (Патент РФ № 2127429, МПК 6 G01N33/48. Спосіб діагностики гіперпластических процессов и рака эндометрия. Опубл. 1999.03.10).

Спільними суттєвими ознаками прототипу і корисної моделі, що заявляється, є такі:

- морфологічне дослідження зскрібів ендометрія.

(13) U

(11) 63483

(19) UA

Цей спосіб є недостатньо ефективним, тому що він не може бути запропонованим всім патогістологічним лабораторіям, оскільки має багатоступеневість виконання, досить коштовний та потребує спеціального навчання як середнього медичного персоналу, так і лікарів. Не може бути проведено повторного дослідження на тому ж матеріалі (контрольного, повторного тощо), оскільки відбитки з біопсійного матеріалу ендометрія можуть бути виконані одноразово. З цієї ж причини не може бути проведений ретроспективний аналіз біопсійного матеріалу хворих. Також проведення комп'ютерно-денситометричного аналізу пов'язано з низкою складностей, а саме: необхідністю абсолютної стандартизації проводки, виготовлення зрізів та забарвлення матеріалу, а також необхідністю абсолютно ідентичних умов при проведенні цифрового аналізу зображень на різних препаратах, досягнення чого на практиці є вкрай складним.

В основу корисної моделі поставлено задачу удосконалення способу диференційної діагностики гіперпластичних процесів і аденокарциноми ендометрія шляхом застосування імуногістохімічного методу дослідження експресії рецепторів до гормонів, маркерів проліферації та апоптозу в біопсійному матеріалі ендометрія, що забезпечить більш точну діагностику гіперпластичних процесів та аденокарциноми ендометрія з подальшим вибором лікування та прогнозуванням для кожної конкретної хворої.

Поставлена задача вирішується тим, що у способі, який включає морфологічне дослідження зскрібів ендометрія, новим є те, що проводять імуногістохімічне дослідження, визначають маркери рецепторів гормонів естрогенів та прогестерону в тканині ендометрія, а також рецептори білків-маркерів проліферації та апоптозу, і, оскільки рівень естрогенових рецепторів (максимально - 300 балів, мінімально - 0 балів) визначає гормонозалежність пухлини та потенційну проліферативну активність процесу, а рівень прогестеронових рецепторів (максимально - 300 балів, мінімально - 0 балів) свідчить про прогноз щодо певного конкретного випадку та чутливість (або її відсутність) до гестагенової терапії, високий рівень (більше ніж 200 балів) та помірний рівень (100-200 балів) естрогенових рецепторів свідчить про гормонозалежність процесу та вірогідну високу проліферативну активність, а високий рівень рецепторів (більше ніж 200 балів) до прогестерону є добрим прогностичним показником, оскільки відображає чутливість до гестагенової терапії. При визначенні ступенів градації показників маркерів Ki-67, PCNA, p-53 та bcl-2 оцінка в 0-1 бали розцінюється як низька експресія, 2 бали - як помірна експресія, 3-4 бали - як виразна експресія відповідного маркера. Виразна експресія Ki-67 та PCNA свідчить про високу проліферативну активність епітеліоцитів залоз ендометріїв. Низька експресія білка bcl-2 свідчить про відсутність або слабку виразність процесів апоптозу, що призводить до дисбалансу між процесами проліферації та програмованої загибелі клітин у пухлинах. Виразна експресія білка p-53 свідчить про високий злоякісний потенціал

гіперпластичних процесів і пухлин та вказує на поганий прогноз.

Причинно-наслідковий зв'язок між сукупністю ознак, що заявляються, та технічним результатом полягає у такому.

Основними регуляторами стану гормонозалежних тканин є естрогени (естрадіол) та гестагени (прогестерон). Естрадіол є головним медіатором проліферативних змін в ендометрії. Рецептори до нього - α і β рецептори естрогенів (RE_{α} і RE_{β}) в нормі експресуються в епітеліальних та стромальних клітинах під час фази проліферації. Під час фази секреції їх експресія зменшується.

Прогестерон є одним з найбільш суттєвих регуляторів дії естрогенів в матці. Доведено, що прогестерон знижує велику кількість естрогенідукованих ефектів в ендометрії.

Проліферація, обумовлена за рівнем експресії її маркерів Ki-67 і PCNA, у свою чергу, залежить від кількості естрогенових рецепторів в ендометрії.

Активатори проліферативної активності ендометрія (PCNA, Ki-67) необхідні для реплікації геномної ДНК.

Для гіперплазії ендометрія та аденокарциноми ендометрія характерні не тільки підвищена проліферативна активність ендометрія, а й пригнічення процесів апоптозу. Важливу роль в регуляції апоптозу відіграє ген p-53 - представник групи протоонкогенів та bcl-2 - фізіологічний інгібітор процесів апоптозу.

Таким чином, використання всіх перелічених маркерів дозволить покращити процес диференційної діагностики між атипovими гіперплазіями та аденокарциномою ендометрія, що важливо для подальшого вибору тактики лікування цієї групи хворих. Також удосконалюється процес прогнозування перебігу захворювання в групі хворих на гіперплазію ендометрія.

Спосіб здійснюють таким чином.

Жінкам проводиться діагностичне вишкрібання порожнини матки, біоптат фіксується в 10 % нейтральному забуференому формаліні. Після рутинного виготовлення парафінових блоків з їхнім наступним різанням на санному мікромомі й фарбуванням препаратів гематоксиліном і еозином при світловій мікроскопії проводиться визначення патогістологічного діагнозу. Паралельно проводиться депарафінізація серійних парафінових зрізів і демаскування антигенів у цитратному буфері на водяній бані протягом 20 хвилин. Як первинні антитіла використовуються мишачі антитіла ER, PR, Ki-67, PCNA, bcl-2 і p-53. Візуалізація результатів реакції проводиться з використанням системи EnVision+ з діамінобензидином (ДАБ). Препарати дофарбовуються гематоксиліном, фіксуються бальзамом. Оцінка результатів імуногістохімічного дослідження проводиться за допомогою світлового мікроскопа.

Результат експресії маркерів рецепторів естрогену та прогестерону здійснюється за формулою: $S = 3 \cdot N_1 + 2 \cdot N_2 + 1 \cdot N_3$, де N_1 - кількість клітин з виразною експресією, N_2 - кількість клітин з помірною експресією та N_3 - кількість клітин зі слабкою експресією. Кількість клітин вираховується на 100

клітин. В результаті маємо одержати максимально - 300 балів, мінімально - 0 балів. Рівень естрогенових рецепторів визначає гормонозалежність пухлини та потенційну проліферативну активність процесу. Рівень прогестеронових рецепторів свідчить про прогноз щодо певного конкретного випадку та чутливість (або її відсутність) до гестагенової терапії.

Результат (кількість клітин, імунореактивних за маркерами Ki-67, PCNA, bcl-2 і p53 оцінюється при світловій мікроскопії за п'ятибальною шкалою:

0 - 0-5 % імунопозитивних клітин,

1-6-25 % імунопозитивних клітин,

2-26-50 % імунопозитивних клітин,

3-51-75 % імунопозитивних клітин,

4-76-100 % імунопозитивних клітин. При визначенні ступенів градації за цими показниками оцінка в 0-1 бали розцінюється як низька експресія, 2 бали - як помірна експресія, 3-4 бали - як виразна експресія відповідного маркера. Виразна експресія Ki-67 та PCNA свідчить про високу проліферативну активність епітеліоцитів залоз ендометрія. Низька експресія білка bcl-2 свідчить про відсутність або слабку виразність процесів апоптозу, що призводить до дисбалансу між процесами проліферації та програмованої загибелі клітин у пухлинах. Виразна експресія білка p53 свідчить про високий злоякісний потенціал гіперпластичних процесів і пухлин та вказує на поганий прогноз.

Приклад 1.

Хворій Н. 1960 р.н., яка звернулась зі скаргами на нециклічні кров'янисті виділення зі статевих органів, в умовах гінекологічного відділення було діагностовано гіперпластичний процес ендометрія, підозра на рак ендометрія. Після проведення лікувально-діагностичного вишкрібання порожнини матки та рутинного гістологічного дослідження поставлений діагноз «Комплексна неатипова гіперплазія ендометрія з формуванням залозисто-

фіброзних поліпів». Після проведення імуногістохімічного дослідження виявлено, що рівень естрогенових рецепторів $S_{естр}$ дорівнював 190 балам, рівень прогестеронових рецепторів $S_{пр}$ - 210 балам. Експресія маркера Ki-67 дорівнювала 3 балам, PCNA - 4 балам, bcl-2 - 3 балам і маркера p-53 - 0. За результатами імуногістохімічного дослідження було визначено, що наданий випадок є естроген-залежною комплексною гіперплазією, схильною до гестагенової терапії (високий рівень експресії прогестеронових рецепторів), з високою проліферативною активністю, збалансованою процесами апоптозу та відсутністю злоякісного характеру.

Приклад 2.

Хвора Р. 1954 р.н., яка звернулась зі скаргами на кров'янисті виділення зі статевих органів в постменопаузальному періоді, в умовах гінекологічного відділення було діагностовано гіперпластичний процес ендометрія, підозра на рак ендометрія. Після проведення лікувально-діагностичного вискоблювання порожнини матки та рутинного гістологічного дослідження поставлений діагноз «Комплексна гіперплазія ендометрія з тяжкою атипією, з фокусами росту високодиференційованої аденокарциноми». Після проведення імуногістохімічного дослідження виявлено, що рівень естрогенових рецепторів $S_{естр}$ дорівнював 120 балам, рівень прогестеронових рецепторів $S_{пр}$ - 46 балам. Експресія маркера Ki-67 дорівнювала 2 балам, PCNA - 4 балам, bcl-2 - 0 балам і маркера p-53 - 3 балам. За результатами імуногістохімічного дослідження було визначено, що даний випадок є естрогензалежною пухлиною, толерантною до гестагенової терапії (рівень прогестеронових рецепторів - 46), з високою проліферативною активністю, пригніченими процесами апоптозу та високим рівнем злоякісного перетворення, тобто аденокарциномою ендометрія.