



УКРАЇНА

(19) UA (11) 67237 (13) U  
(51) МПК  
G01N 33/48 (2006.01)

ДЕРЖАВНА СЛУЖБА  
ІНТЕЛЕКТУАЛЬНОЇ  
ВЛАСНОСТІ  
УКРАЇНИ

## ОПИС ДО ПАТЕНТУ НА КОРИСНУ МОДЕЛЬ

видається під  
відповідальність  
власника  
патенту

**(54) СПОСІБ ПРОГНОЗУВАННЯ КЛІНІЧНОГО ПЕРЕБІГУ ГЛАДКОМ'ЯЗОВИХ ПУХЛИН ТІЛА МАТКИ НА ОСНОВІ БІОЛОГІЧНИХ ВЛАСТИВОСТЕЙ ПУХЛИН**

1

2

(21) u201108615

(22) 11.07.2011

(24) 10.02.2012

(46) 10.02.2012, Бюл.№ 3, 2012 р.

(72) ШПОНЬКА ІГОР СТАНІСЛАВОВИЧ, ПОТАПОВ ВАЛЕНТИН ОЛЕКСАНДРОВИЧ, ГОНЧАРОВА ГАННА СЕРГІЇВНА, МЕДВЕДЄВ МИХАЙЛО ВОЛОДИМИРОВИЧ, ГРИЦЕНКО ПЕТРО ОЛЕКСІЙОВИЧ

(73) ШПОНЬКА ІГОР СТАНІСЛАВОВИЧ, ПОТАПОВ ВАЛЕНТИН ОЛЕКСАНДРОВИЧ, ГОНЧАРОВА ГАННА СЕРГІЇВНА, МЕДВЕДЄВ МИХАЙЛО ВОЛОДИМИРОВИЧ, ГРИЦЕНКО ПЕТРО ОЛЕКСІЙОВИЧ

(57) Спосіб прогнозування клінічного перебігу гладком'язових пухлин тіла матки на основі біологіч-

них властивостей пухлини із застосуванням комплексного імуногістохімічного дослідження матеріалу пухлини, отриманого за допомогою трансцервікальної пункційної біопсії, який **відрізняється** тим, що проведено визначення експресії маркерів Ki-67, ER, PGR, p53, p21, bax, VEGF, TSP, CD34 у тканині гладком'язових пухлин матки перед початком лікування, що дозволило з чутливістю та специфічністю 100 % діагностувати тип пухлини та призначити правильне хірургічне або медикаментозне лікування, виконавши радикальну операцію 17,6 % жінкам із злоякісною пухлиною, яким насамперед планувалось органозберігаюче лікування, що недопустимо при даному типі пухлин, що робить необхідним широко використовувати методику в гінекології, онкогінекології, патоморфології.

Спосіб належить до розділу медицини, а саме для прогнозування перебігу лейоміом и лейоміосарком тіла матки, вірогідності метастазування, швидкості росту пухлини, тривалості життя, а також для вибору найбільш доцільної тактики лікування.

Може бути використаний в гінекології, онкології, патоморфології. Передумовами для розроблення даного способу є подібність морфологічної та клінічної картини деяких форм лейоміом та лейоміосарком при різному потенціалі злоякісності, чутливості до проводжуваного лікування та прогнозу перебігу.

Відомий спосіб прогнозування ризику метастазування лейоміосаркоми матки дозволяє уточнити вірогідність розвитку віддалених метастазів при злоякісних гладком'язових новоутвореннях матки. Для цього визначають ступінь васкуляризації (СВ) - максимальна кількість судин в одному полі зору на поверхневому, середньому та глибокому шарах пухлини. Якщо величина СВ більше чи дорівнює 50, ризик метастазування вважається високим, при значенні від 20 до 49 - вірогідність розвитку метастазів розцінюється як середня, у випадках, коли СВ менше 20 - ризик виникнення вторинних вогнищ пухлини мінімальний. Проте цей спосіб

має невисоку об'єктивність, дозволяє оцінити властивості пухлини лише по одному параметру і розроблений виключно для лейоміосаркоми.

Відомий спосіб прогнозування росту міоми матки заснований на визначенні в тканинах міоматозних вузлів імуногістохімічним методом щільності та інтенсивності фарбування рецепторів до прогестерону і при збільшенні цих показників прогнозується ріст міоми протягом 12 місяців. Однак застосування цього способу можливе тільки для доброякісних гладком'язових пухлин тіла матки, відсутній комплексний підхід до урахування властивостей новоутворення.

Найбільш близьким за сукупністю ознак серед об'єктів аналогічного призначення до корисної моделі, що заявляється, є спосіб прогнозування клінічного перебігу рака молочної залози що включає патогістологічне та імуногістохімічне дослідження зразка пухлини за допомогою моноклональних антитіл до Ki-67 як маркерів проліферації, визначення експресії маркерів bcl-2 як блокатора апоптозу, p53 як ключового регулятора апоптозу та контролера цілісності геному, реакції рецепторів до естрогену та прогестерону як стероїдних гормонів, оцінку ймовірності генералізації онкологічного процесу за проліферативною активністю пух-

(13) U

(11) 67237

(19) UA

линних клітин і розробку відповідних показань до комплексного лікування, який відрізняється тим, що додатково визначають рівні інтегрину pS2 як маркера прихованої естрогенії, HER-2/neu як фактора епідермального росту та VEGF як фактора росту ендотелію судин, при оцінці реакцій до естрогену та прогестерону досліджують активність ER- і PgR-рецепторів, відповідно, при цьому, якщо спостерігають збільшення експресії pS2 по реакції понад 10 % клітин, то визначають приховану естрогенію, якщо при дослідженні факторів епідермального росту HER-2/neu та/або ендотелію судин VEGF виявляють забарвлення мембран пухлинних клітин в межах від 2+ до 3+, то встановлюють позитивний статус пухлини та її здатність до розвитку рецидивів, раннього регіонарного й віддаленого метастазування, з можливістю встановлення показань до використання блокувальних рецепторів, зв'язаних з пригніченням факторів епідермального росту HER-2/neu та/або ендотелію судин VEGF, якщо визначають збільшення активності ER- і PgR-рецепторів, то пухлину кваліфікують ER- і/або PgR-позитивною, якщо співвідношення кількості позитивних клітин до інтенсивності реакції перевищує 50 ум.од. Даний спосіб забезпечує комплексну оцінку властивостей пухлини, виявлення прогностично сприятливих і несприятливих варіантів PM3, оптимізацію терапевтичних заходів, але розроблений виключно для епітеліальних пухлин молочної залози.

В основу даної корисної моделі поставлена задача розробки способу прогнозування клінічного перебігу гладком'язових пухлин тіла матки шляхом розширення уявлень про біологічні властивості пухлини за рахунок збільшення кількості реагуючих субстанцій для поліпшення якості діагностики та лікування, а таким чином, і поліпшення якості і збільшення тривалості життя пацієнток.

Технічний результат досягається комплексною оцінкою таких параметрів як розміри пухлини, гістологічна форма, проліферативна активність (на підставі визначення експресії моноклонального антитіла Ki-67), кількість рецепторів до стероїдних гормонів (естрогену і прогестерону), зміни регуляції апоптозу шляхом визначення експресії маркерів p53, p21 і bax, активність неопластогенезу методом виявлення експресії фактору росту ендотелію судин VEGF і його інгібітора TSP, а також маркера ендотелію CD34.

В дослідженні приймало участь 34 жінки пременопаузального віку з клінічними проявами лейоміоми тіла матки, її швидким ростом, ознаками підвищеного кровопостачання на УЗД (підозра на лейоміосаркому матки). З метою вибору оптимального методу лікування було проведено трансцервікальну біопсію клінічно-значимих вузлів (вузлів великих розмірів, розташованих субмукозно або вузлів з ознаками проліферативного росту, дегенерації та некрозу на УЗД та МРТ), яка виконувалась у фолікулярну фазу менструального циклу. Відібрані ділянки пухлини фіксували у нейтральному формаліні і потім заливали у парафін. Виготовлені гістологічні препарати забарвлювали за стандартною методикою гематоксиліном і еозином, а також проводили імуногістохімічне дослідження з моноклональними антитілами до маркерів Ki-67, ER, PGR, p53, p21, bax, VEGF, TSP, CD34.

Проліферативну активність оцінюють на підставі підрахунку кількості клітин з забарвленими ядрами моноклональним антитілом Ki-67 (MIB 1), що реагує з усіма клітинами, що готуються, здійснюють або завертають поділ. При реакції більш ніж в 10 % клітин експресія маркера вважається високою.

Онкосупресорний ген p53 є одним з ключових регуляторів апоптозу і контролером цілісності геному. Мутацію цього гена, що призводить до втрати цих важливих функцій, знаходять більш ніж у половині відомих пухлин людини, в тому числі в лейоміосаркомах тіла матки. При реакції більш ніж у 10 % ядер клітин пухлина рахується з позитивним статусом з p53. Для лейоміом характерна негативна експресія p53.

Гіперекспресія протеїну p21, що належить до групи інгібіторів циклінзалежної кінази та пригнічує прогресію клітинного циклу, свідчить про високий онкосупресивний потенціал тканини. В лейоміомах спостерігається позитивна або рідше слабо позитивна експресія p21 в порівнянні зі здебільшого негативною або слабо позитивною реакцією в лейоміосаркомах.

При оцінці реакції клітин до естрогену та прогестерону враховують тільки інтрануклеарну реакцію, причому позитивним вважають лише статус пухлини із коефіцієнтом більше 50 ум. од. (за допомогою напівкількісного аналізу), що враховує інтенсивність ядер, що прореагували, та їх кількість. Доброякісні гладком'язові пухлини демонструють позитивний статус, злоякісні частіше негативний.

Відсутність імуногістохімічного забарвлення з bax у більшості лейоміосарком в порівнянні зі здебільшого позитивними реакціями у лейоміомах ( $p < 0,05$ ) може свідчити про інактивацію мітохондріального шляху апоптозу у злоякісних клітинах як прояв однієї з головних якостей, притаманних малігнізуючим новоутворенням - автономного росту.

Маркери ендотелію, VEGF та CD34, забарвлюючи стінки судин, демонструють ступінь розвитку мікроциркуляторного русла пухлини.

Інгібітором VEGF є тромбоспондин-1, що відіграє визначальну роль в ангіогенезі: його зниження асоціюється зі зміною фенотипу пухлини з антиангіогенного на ангіогенний, що є ранньою прогностично несприятливою ознакою.

З допомогою VEGF, CD 34 та тромбоспондину виявляють забарвлення мембран пухлинних клітин у межах 0-3+, при цьому статус із 0 та 1+ рівнем вважають негативними, а від 2+ до 3+ - позитивним. У лейоміомах ми спостерігали здебільшого позитивний статус за VEGF, CD34 та тромбоспондином, а в лейоміосаркомах - переважно негативний статус за цими показниками.

Використовуючи значення маркерів Ki-67, ER, PGR, p53, p21, bax, VEGF, TSP, CD34 оцінюють злоякісний потенціал та властивості гладком'язових пухлин тіла матки, а на підставі розширення уявлень про біологічні властивості пухлини - покращують об'єктивність та інформативність кінцево-

го результату, а також визначають тактику лікування для кожного випадку лейоміоми чи лейоміосаркоми.

При встановленні морфотипу з підвищеним індексом проліферації (більше 10), підвищеною експресією VEGF, CD34, p53, TSP та значно зниженою експресією ER, PGR, p21, бах виконувалась гістеректомія з гістологічною верифікацією діагнозу. При нормальному морфотипі, характерному для лейоміоми - позитивна реакція ER, PGR, p21, бах, помірне забарвлення з VEGF, CD34 та майже відсутня експресія p53, TSP при індексі проліферації менше 10 вважали допустимим очікувальну тактику або виконання органозберігаючого лікування - консервативної міомектомії. Період спостереження за жінками, які обрали очікувальну тактику, склав 3 роки.

В результаті проведеного дослідження радикальне втручання (гістеректомію) було виконано 6 жінкам, консервативне втручання - 24 жінкам, спостереження обрали 4 жінки. За результатами ретельного гістологічного і імуногістохімічного дослідження операційних матеріалів:

- у 6 жінок з 6 з патологічним морфотипом, отриманим під час трансцервікальної біопсії, було підтверджено діагноз лейоміосаркома матки;
- у 24 жінок був діагноз лейоміома матки.

Таким чином, чутливість і специфічність запропонованого методу у нашому дослідженні склали 100 %. Це дозволило обрати правильну лікувальну тактику із збереженням матки жінкам, які бажали обрати цей варіант лікування. Метод дозволяє з точністю, що наближена до 100 %, діагностувати лейоміосаркому матки і обирати вірну лікувальну тактику - гістеректомію з придатками матки. Жінки з нормальним морфотипом можуть обрати будь-який органозберігаючий метод лікування лейоміоми матки, наприклад міомектомію, емболізацію маткових артерій, медикаментозне лікування або очікувальну тактику.

Тож заходи заявника, що запропоновані у корисній моделі, дозволяють використовувати вдосконалені досягнення об'єктів-аналогів з метою точної діагностики типу пухлини, завдяки чому значно підвищується якість лікування жінок з лейоміомою та лейоміосаркомою матки.

Отже, заявлена корисна модель відповідає умові «промислова придатність».

Джерела інформації:

1. Вихляева Е.М. Руководство по диагностике и лечению лейомиомы матки, 2004. - М.: Медпрес-информ. - 399 с.

2. Clinical Practice Gynecology Committee Society of Obstetricians and Gynecologists of Canada. The management of uterine leiomyomas / Lefebvre G., Vilos G., Allaire C. et al // J Obstet Gynecol Can. - 2003. - № 25. - P. 396-418.

3. Патент № 31876 Україна, МПК А61В8/00. Спосіб діагностики субмукозних міом матки / Ледін Д.С.; Ледін Д.С. - № u200713966; заявл. 12.12.2007; опубл. 25.04.2008, бюл. № 8.

4. Гладчук І.З., Лищук В.Д. Лапароскопическая миомэктомия // Український журнал малоінвазивної та ендоскопічної хірургії. - 2005. - № 9. - с. 29-32.

5. Савельева Р.М., Бреусенко В.Г., Голова Ю.А. Современные технологии в диагностике и лечении заболеваний матки // Российский медицинский журнал. - 2006. - № 5. - с. 22-25.

6. Патент № 40460 Україна, МПК А61К31/00. Спосіб органозберігаючого лікування лейоміоми матки / Татарчук Т.Ф., Косей Н.В., Березовська О.І., Васильчук Г.М.; Татарчук Т.Ф. - № u200812977; заявл. 07.11.2008; опубл. 10.04.2009, бюл. № 7.

7. Sapmaz E., Celik H. Comparison of the effects of the ligation of ascending branches of bilateral uterine artery with tourniquet method on the intraoperative and post-operative hemorrhage in abdominal myomectomy cases // Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol. - 2003. - Vol. 111, № 1. - P. 74-77.

8. Holub Z., Eim J., Jabor A. et al. Complications and myoma recurrence after laparoscopic uterine artery occlusion for symptomatic myomas // J Obstet Gynaecol Res. - 2006. - Vol. 32, № 1. - P. 55-62.

9. Liu W.M. Laparoscopic bipolar coagulation of uterine vessels to treat symptomatic leiomyomas // J Am Assoc Gynecol Laparosc - 2000. - Vol. 7, № 1. - P. 125-129.