



УКРАЇНА

(19) **UA** (11) **16506** (13) **U**  
(51) **МПК (2006)**  
**A61B 10/00**  
**G01N 27/26**  
**G01N 33/483**

МІНІСТЕРСТВО ОСВІТИ  
І НАУКИ УКРАЇНИ

ДЕРЖАВНИЙ ДЕПАРТАМЕНТ  
ІНТЕЛЕКТУАЛЬНОЇ  
ВЛАСНОСТІ

## ОПИС

### ДО ДЕКЛАРАЦІЙНОГО ПАТЕНТУ НА КОРИСНУ МОДЕЛЬ

видається під  
відповідальність  
власника  
патенту

**(54) СПОСІБ ПРОГНОЗУВАННЯ ДОБРОЯКІСНИХ ТА ЗЛОЯКІСНИХ ПРОЛІФЕРАТИВНИХ ПРОЦЕСІВ У МОЛОЧНІЙ ЗАЛОЗІ ЖІНОК**

1

(21) u200601206

(22) 07.02.2006

(24) 15.08.2006

(46) 15.08.2006, Бюл. № 8, 2006 р.

(72) Чехун Василь Федорович, Лозовська Юлія Валеріївна, Шкорбатов Юрій Георгієвич, Шахбазов Валерій Гайович, Бородай Наталія Володимирівна, Досенко Ірина Вікторівна

(73) ІНСТИТУТ ЕКСПЕРИМЕНТАЛЬНОЇ ПАТОЛОГІЇ, ОНКОЛОГІЇ І РАДІОБІОЛОГІЇ ІМ. Р.Є. КАВЕЦЬКОГО НАН УКРАЇНИ

(57) 1. Спосіб прогнозування доброякісних та злоякісних проліферативних процесів у молочній залозі жінок, що включає визначення процентного

2

вмісту електронегативних та електропозитивних ядер епітеліальної тканини, який **відрізняється** тим, що оцінюють електрокінетичні властивості ядер букального епітелію з урахуванням їх амплітуд коливання і при 11-16% вмісті електронегативних ядер прогнозують доброякісний проліферативний процес, а при 17-26% вмісті негативно заряджених ядер та з наявністю електропозитивних ядер прогнозують злоякісний процес у молочній залозі.

2. Спосіб за п. 1, який **відрізняється** тим, що для визначення процентного вмісту електронегативних та електропозитивних ядер букального епітелію використовують прилад "Потенціал-1" чи "Біотест".

Корисна модель належить до медицини, а саме до онкології, і може бути використана для прогнозування перебігу проліферативних процесів у молочній залозі жінок.

На сучасному етапі для виявлення новоутворень у клінічну практику впроваджено різноманітні діагностичні методи з високими технічними можливостями, такі, як ультразвукове дослідження, комп'ютерна томографія, магнітно-резонансна томографія та інші [7]. Ці променеві методи діагностики є основними у своєчасному виявленні пухлин молочної залози, легенів, печінки, нирок та пухлин іншої локалізації. Основними задачами променевих методів діагностики є раннє виявлення пухлин, встановлення ступеня розповсюдженості пухлинного процесу. Одним із широко розповсюджених методів ранньої діагностики доброякісних та злоякісних пухлин молочної залози є маммографія. Це пов'язано, насамперед, з доступністю, відносною безпекою та високими діагностичними можливостями цього методу. Незважаючи на широкі можливості променевих методів у виявленні пухлин різних локалізацій, залишається ряд невирішених проблем диференційної діагностики новоутворень. Основною проблемою є диференціація між доброякісними та

злоякісними новоутвореннями, особливо це стосується невеликих розмірів новоутворень та вірогідність виявлення пухлин, які не виявляються при пальпаторному обстеженні. Таким чином, дані методи не зважаючи на їх високу діагностичну цінність та специфічність не завжди дають можливість ранньої діагностики новоутворень та прогнозування перебігу проліферативних процесів у молочній залозі.

В останні десятиріччя для виявлення новоутворень широко застосовують молекулярно-генетичні методи [1, 2, 15]. Для аналізу онкомаркерів у віддалених від основної пухлини тканинах (лімфатичних вузлах, кістковому мозку та крові) використовують метод полімеразної ланцюгової реакції. Незважаючи на високу чутливість даного методу він має певні недоліки. Артефактами даного методу діагностики може бути неправильний відбір біологічних зразків (втрата ДНК на етапах виділення) та онкомаркерів для діагностики (можливість знаходження молекулярних онкомаркерів при відсутності клітин пухлини).

В останні роки у клінічній онкології активно досліджуються і впроваджуються молекулярно-біологічні методи із застосуванням маркерів клітинного походження, що змінюються при виник-

(19) **UA** (11) **16506** (13) **U**

ненні та прогресії новоутворень [5, 7, 8]. До них відносяться фактори, що відповідають за пухлинну диференціацію (HER-2/neu, p53), показники проліферативної активності (Ki-67), апоптоз (Be L-2, Вах, CD 95). Однак, ці дослідження базуються на аналізі операційного матеріалу і не можуть бути застосовані для раннього виявлення новоутворень.

З цих міркувань впровадження неінвазивних та безболісних методів діагностики є важливим напрямком сучасної медицини.

Відомим також є дослідження ферментів ротового секрету (кислор фосфотази,  $\alpha$ -амілази, лізоциму) у слині хворих на злоякісні новоутворення, як скринінгового тесту для виявлення груп з підвищеним ризиком онкологічних захворювань [4, 13]. Відмічено, що у даній категорії хворих активність кислор фосфотази,  $\alpha$ -амілази зростає відносно показників цих ферментів у сироватці крові. Також відмічено зниження лізоциму у слині хворих на рак шлунка та передракових станах. Але, діагностична цінність визначення ферментів у ротовому секреті підвищується при додатковому аналізі імунологічних показників, що ускладнює даний метод діагностики.

Перспективним виявилось дослідження інтерфазних ядер букального епітелію (вмісту ДНК за оптичною щільністю) при раку молочної та щитовидної залози, що дає можливість раннього виявлення цих онкологічних захворювань та оцінки характеру розвитку злоякісного процесу за змінами, що відбуваються у даних клітинах [3, 12]. Маючи інформативні переваги, відомий спосіб потребує досить багато часу для його виконання.

Останнім часом у медицині широке застосування знайшов метод мікроелектрофоретичного дослідження клітин букального епітелію людини у нормі та патології [6]. Метод визначення електрокінетичного потенціалу клітинних ядер букального епітелію використовують для розробки практичних рекомендацій для осіб, які використовують такий засіб оздоровлення як дозоване голодування. Матеріалом для дослідження були клітини букального епітелію та еритроцити крові людини. Методика визначення електрокінетичного потенціалу клітинних ядер букального епітелію полягає в проведенні мікроелектрофорезу проби клітин епітеліоцитів за допомогою спеціального приладу, розробленого на кафедрі генетики та цитології Харківського Національного університету ім. Каразіна. Проводили мікроелектрофорез клітин букального епітелію за відомою методикою [9, 11, 14]. В рамках цього методу показано, що електрокінетичний потенціал клітинних ядер букального епітелію змінюється по різному у групи хворих, що проходили курс дозованого голодування. Донори клітин за фоновими значеннями ЕНЯ були розподілені на дві групи. Середній вік обстежених в цих групах був однаковий: в першій групі -  $60,0 \pm 2,0$  роки, у другій -  $59,6 \pm 2,0$ . В першій групі обстежених фонові значення показника ЕНЯ перевищували вікову норму на 25%, а у другій групі ці значення були дещо нижчі за норму на 27,17%. Під час лікування показники ЕНЯ у цих групах змінювалися не однаково. В першій групі обстежених перші 3 доби показник ЕНЯ поступово знижувався і на 4 день спо-

стереження становив 22,75%. На 8-й день досліджень цей показник досягав контрольного рівня, а на 9-й день перевищував його. У другій групі обстежених значення ЕНЯ до 9-го дня голодування було значно нижче показників контролю і лише на 10-й день досягло контрольного рівня. Результати дослідження свідчать, що голодування як засіб оздоровлення не слід використовувати особам з низьким вихідним рівнем ЕНЯ. Недолік цього дослідження полягає в тому, що оцінюють зміни ЕНЯ у динаміці лікування у донорів лише певної вікової категорії, що дещо обмежує широке застосування даного підходу в клінічній практиці. Також недоліком цього методу є те, що обстежені не були розподілені на групи за статтю, а отже і не було проведено порівняльного аналізу змін ЕНЯ у чоловіків та жінок даної вікової групи.

Найближчим аналогом до способу, що заявляється є дослідження електрокінетичних властивостей епітелію слизової оболонки шлунка при раковому ураженні, який ми обрали за прототип [10]. Електрокінетичні властивості епітелію визначали як у ділянках патологічного ураження шлунка так і не уражених зонах. Матеріал для дослідження отримували під час фіброгастроскопії, або після оперативного видалення пухлин. Контрольну групу склали 40 осіб, кількість хворих на виразкову хворобу шлунка - 18 осіб, на рак шлунка - 21. Діагнози були підтверджені гістологічним дослідженням. При виразковій хворобі шлунка значно знижена кількість електронегативних ядер у всіх відділах шлунка згідно вікової норми. У осіб з виразковою хворобою шлунка старше 40 років виявлено значну кількість (50-60%) електропозитивних ядер в області патологічного ураження та у віддалених від неї ділянках. У хворих на рак шлунка незалежно від віку спостерігали значне збільшення кількості електропозитивних ядер відносно кількості електронегативних ядер. Ця закономірність була характерною для зони патологічного ураження, що слугувало підтвердженням даного клінічного діагнозу. Отримані дані свідчать про високу специфічність даної ознаки і її діагностичну цінність при експрес-діагностиці раку шлунка. Недоліком є вивчення електрокінетичних властивостей епітеліоцитів шлунка безпосередньо ураженої зони без аналізу електрокінетичних властивостей епітеліоцитів віддалених від пухлини ділянках, що дало б змогу значно скоротити та спростити процедуру оцінки функціонального стану організму хворих з даною онкопатологією.

Отже, спосіб прототип, як і інші відомі способи ранньої діагностики новоутворень та прогнозування перебігу проліферативних процесів мають певні негативні властивості, що в першу чергу характеризуються складністю та довготривалістю.

Задача запропонованого винаходу полягає в створенні неінвазивного та доступного способу прогнозування доброякісних та злоякісних проліферативних процесів у молочної залозі жінок, завдяки аналізу електрокінетичних властивостей ядер букальних епітеліоцитів.

Задача вирішується шляхом визначення процентного вмісту електронегативних та електропозитивних ядер букальних епітеліоцитів з урахуванням їх амплітуд коливання.

Суть корисної моделі полягає у прогнозуванні проліферативних процесів у молочній залозі жінок, шляхом оцінки електрокінетичних властивостей ядер букального епітелію, з урахуванням їх амплітуд коливання і при 11-16% вмісті електронегативних ядер прогнозують доброякісний проліферативний процес у молочній залозі, а при 17-26% вмісті негативно заряджених ядер та з наявністю електропозитивних ядер прогнозують злоякісний процес у молочній залозі.

У дослідженні використана модифікована методика внутрішньоклітинного мікроелектрофорезу, що була розроблена на кафедрі генетики і цитології ХНУ під керівництвом проф. В.Г.Шахбазова.

Електрокінетичний потенціал клітинних ядер (ЕПКЯ) дає можливість дати оцінку функціональним особливостям на клітинному рівні і може бути мірою оцінки рівня порушень цього стану у жінок з доброякісними та злоякісними процесами у молочній залозі.

Запропонований спосіб прогнозування доброякісних та злоякісних проліферативних процесів у молочній залозі виконують таким чином.

1. Клітини букального епітелію зіскрібають з внутрішньої поверхні щок пацієнта за допомогою шпателя та проводять мікроелектрофорез за відомою методикою при наявності приладу "Потенціал-1" чи "Біотест".

2. Забір матеріалу у всіх пацієнтів проводять у ранішній час до прийому їжі, в однакову фазу менструального циклу та з урахуванням вікових особливостей.

3. Визначають електрокінетичний показник клітинних ядер, що являє собою відношення електронегативних та електропозитивних ядер до загальної кількості клітин у пробі.

4. Оцінюють амплітуду коливання клітинних ядер за трьохбальною шкалою: 1 - максимальна, 2 - середня, 3 - мінімальна. Визначали процентний вміст ядер букальних епітеліоцитів з відповідними амплітудами коливання.

3 метою забезпечення точності досліджень у кожного пацієнта брали три проби зіскобів та оцінювали їх середнє значення.

Запропонований спосіб прогнозування доброякісних та злоякісних проліферативних процесів у молочній залозі жінок підтверджуються прикладами конкретного виконання.

#### Приклад 1

Хвора Н., 25р., Історія хвороби №9669, поступила у відділення захворювань молочної залози з діагнозом: фіброаденома лівої молочної залози. За заявленим способом проводили електрокінетичне дослідження клітин букального епітелію та визначали процентний вміст електронегативних та електропозитивних ядер з урахуванням амплітуди коливання. Виявлено 14% електронегативних ядер з середньою амплітудою коливання (70%) та відсутність електропозитивних ядер у букальному епітелії. Це дозволяє судити про позитивний прогноз перебігу захворювання. Гістологічно діагноз підтверджено.

#### Приклад 2

Хвора В., 54р., Історія хвороби №9596, поступила у відділення захворювань молочної залози з

діагнозом: фіброаденома лівої та правої молочної залози. Виявлено 20% електронегативних ядер з середньою амплітудою коливання (50%) та 2% електропозитивних ядер букальних епітеліоцитів. Це дозволяє судити про негативний прогноз перебігу захворювання, що також підтверджено патогістологічними заключениями.

#### Приклад 3

Хвора Т., 54р., Історія хвороби №5126, поступила у відділення захворювань молочної залози з діагнозом: рак лівої молочної залози, стадія ІІА, клінічна група ІІ. Виявлено 25% електронегативних ядер з малою амплітудою коливання (70%) та 3% електропозитивних ядер у букальному епітелії. Це дозволяє судити про негативний прогноз перебігу захворювання. Гістологічно діагноз підтверджено. Висновок: запропонований спосіб дозволяє доступно та неінвазивно контролювати та прогнозувати перебіг проліферативних процесів у молочній залозі жінок.

Запропонований спосіб прогнозування доброякісних та злоякісних проліферативних процесів у молочній залозі застосовували у 70 пацієнтів з верифікованими діагнозами. Після аналізу електрокінетичних властивостей ядер букального епітелію у пацієнтів із доброякісними процесами (фіброаденомою та фіброаденоматозом) виявлено зниження кількості електронегативних ядер букального епітелію у хворих всіх вікових груп у 3 та 4 рази відносно значень контролю.

У хворих на рак молочної залози на фоні загального зниження кількості електронегативних ядер букального епітелію у 2 рази відносно контролю було виявлено незначну кількість електропозитивних ядер, що складала 2-5% від загальної кількості ядер. За умовною трьохбальною шкалою у букальному епітелії хворих було виявлено значну кількість ядер (95%) з низькими та середніми амплітудами коливання.

Дані результати дали можливість диференціювати функціональний стан епітеліоцитів букального епітелію у пацієнтів з доброякісними та злоякісними процесами у молочній залозі.

При наявності приладу "Потенціал-1" чи "Біотест", запропонований спосіб може бути використаний в медичних закладах для прогнозування перебігу проліферативних процесів у молочній залозі. При цьому використовуються недорогі вітчизняні реактиви, а спосіб прогнозування не займає багато часу.

#### Джерела інформації:

1. Автандилов Г.Г., Перов Ю.Л., Григорьева С.Г., Зайратьянц О.В. Патогистологическая диагностика предопухолевых процессов и опухолей молочной железы // Архив патологии. - 2001 - Т. 63. - №3 - С.14-17.

2. Белохвостов А.С., Новик А.А. Роль молекулярно-генетических исследований в диагностике солидных опухолей. // Вопросы онкологии. - 1999. Т.45. - №6. - С.599-606.

3. Бородай Н.В. Цитогенетичні пухлиноасоційовані зміни букального епітелію при доброякісних процесах та раках молочної та щитовидної залоз // Автореф. д-ра. мед. наук: 27.06.2000/ ІЕПОР. - Київ, 2000. - 36с.

4. Веремеєнко К.М., Кизим О.Й. Біохімія рото-

вого секрету та його дослідження у клініці // Лабораторна діагностика. - 2005. - №2 (32). - С.9-14.

5. Зайратьянц О.В., Колобов С.В., Акопян И.Г., Опаленов К.В., Барсанова Т.Г. Особенности экспрессии рецепторов эстрогенов, прогестерона и HER-2 клетками рака молочной железы // Архив патологии. - 2004 - Т. 6. - №5. - С.9-12.

6. Колупасева Т.В., Шахбазов В.Г. Зв'язок осідання еритроцитів і електрокінетичних показників епітеліальних клітин людини при екстремальних станах // Медицина сегодня и завтра. - 2004. - №2. - С.8-12.

7. Одинцов С.В., Крючкова О.В., Виноградова Н.Н. Диагностика первично-множественного рака молочной железы // Российский онкологический журнал. - 2004. - №2. - С.33-37.

8. Степанова Е.В., Загрекова Е.И., Ермилова В.Д., Турбин А.Д. и др. Молекулярно-биологические маркеры как факторы прогноза при раке молочной железы I-IIA стадии // Архив патологии. - 2003. - №3. - С.14-17.

9. Шахбазов В.Г., Григорьева Н.Н., Колупасева Т.В. Новый цито-биофизический показатель биологического возраста и физиологического состояния организма человека // Физиология человека - 1996. - Т. 22. - №6. - С.71-75.

10. Шахбазов В.Г., Флорикян А.К., Колупас-

ва.Т.В. Электрокинетические свойства ядер клеток эпителия слизистой оболочки желудка при его раковом поражении // Биологические свойства клеточного ядра и состояние организма. Тезисы докладов установочного совещания - Харьков - 1989. - С.48.

11. Шкорбатов Ю.Г. Структурні та електрокінетичні властивості ядер клітин букального епітелію людини у зв'язку з дією фізико-хімічних факторів та зміною функціонального стану організму // Автореф. Дис. докт. наук. - Київ, 2005. - 40с.

12. Brooks R., Willismson J., Hensley A., et. al. Buccal cells as a source of DNA for comparative animal genomic analysis // Biotechnol Lett. - 2003. - V. 25. - P.451-455.

13. Dickinson D.P. Cysteine peptidases of mammals: their biological roles and potential effects in the oral cavity and other tissues in health and disease // Crit. Rev. Biol. Med. - 2002. - V. 13, №3. - P.238-275. H. Shcorbatov Y.G. Reply: Some considerations about the method of intracellular microelectrophoresis // Bioelectromagnetics. - 2000. - V. 21, №4. - P.326-327.

15. Yamamoto N., Kata V., Vanagisana A. Et al. Predictive value of genetic diagnosis for cancer micrometastasis // Cancer (Philad.). - 1997. - V. 80, - P.1393-1398.