



УКРАЇНА

(19) **UA** (11) **29861** (13) **U**
(51) МПК (2006)
A61B 10/00

МІНІСТЕРСТВО ОСВІТИ
І НАУКИ УКРАЇНИ

ДЕРЖАВНИЙ ДЕПАРТАМЕНТ
ІНТЕЛЕКТУАЛЬНОЇ
ВЛАСНОСТІ

ОПИС ДО ПАТЕНТУ НА КОРИСНУ МОДЕЛЬ

видається під
відповідальність
власника
патенту

(54) СПОСІБ ПРОГНОЗУВАННЯ ВИЖИВАНOSTІ ХВОРИХ НА М'ЯКОТКАНИННІ САРКОМИ МОЛОЧНОЇ ЗАЛОЗИ

1

(21) u200711827

(22) 26.10.2007

(24) 25.01.2008

(72) ЧЕХУН ВАСИЛЬ ФЕДОРОВИЧ, UA, ЗАХАР-
ЦЕВА ЛЮБОВ МИХАЙЛІВНА, UA, ГАЛАХІН КОС-
ТЯНТИН ОЛЕКСАНДРОВИЧ, UA, СМОЛАНКА
ІВАН ІВАНОВИЧ, UA, ЛУК'ЯНОВА НАТАЛІЯ ЮРІЙ-
ВНА, UA, ШУЛІГА-НЕДАЙХЛЕБОВА ОКСАНА ВА-
СИЛІВНА, UA

(73) ДЕРЖАВНА УСТАНОВА "ІНСТИТУТ ОНКО-
ЛОГІЇ" АКАДЕМІЇ МЕДИЧНИХ НАУК УКРАЇНИ, UA,
ДЕРЖАВНА УСТАНОВА "ІНСТИТУТ ЕКСПЕРИ-
МЕНТАЛЬНОЇ ПАТОЛОГІЇ, ОНКОЛОГІЇ ТА РАДІО-

2

БІОЛОГІЇ ІМ. Р.Є. КРАВЕЦЬКОГО" НАЦІОНАЛЬ-
НОЇ АКАДЕМІЇ НАУК УКРАЇНИ, UA

(57) Спосіб прогнозування виживаності хворих на
м'якотканинні саркоми молочної залози, що вклю-
чає імуногістохімічний аналіз клітинного складу
пухлини, який **відрізняється** тим, що в полі зору
визначають процентне співвідношення клітин, які
експресують білок, що кодується геном множинної
лікарської стійкості, і загального об'єму пухлинних
клітин, і при його величині, рівній або меншій 5 %
цитоплазми пухлинних клітин, визначають високі
показники виживаності, а при наявності більше 5
% пухлинних клітин - низькі показники виживаності.

Заявка належить до галузі медицини, зокрема
до онкології та онкоморфології і може бути вико-
ристана при визначенні прогнозу перебігу захво-
рювання у хворих на злоякісні м'якотканинні сар-
коми молочної залози.

Відомо, що традиційним критерієм прогнозу
перебігу захворювання у хворих на саркоми моло-
чної залози (СМЗ) є визначення ступеню злоякіс-
ності пухлини, яка залежить від рівня диференцію-
вання саркоматозних клітин [1]. Однак, вказана
методика прогнозування СМЗ має суттєвий недо-
лік. Ступінь злоякісності СМЗ встановлюється при
мікроскопії суб'єктивно "ad oculus" з приблизним
визначенням високого, помірного або низького
ступеня диференціювання саркоматозних клітин
[2, 3].

Прототипом щодо поданої заявки є спосіб про-
гнозування перебігу множинної мієломної хвороби,
шляхом проведення імуногістохімічного дослі-
дження (ІГХД) пухлинних клітин з визначенням на
гістологічних зрізах пухлини рівня експресії гену
множинної медикаментозної стійкості [Пат.
№2282852, RU, МПК G01N33/48. Метод прогнози-
рования течения множественной миеломы
/Бакиров А., Калимулина Д., Бакиров Б., Викторова
Т. (RU). - З. №2005106447/15; Заявл.09.03.2005;
Опубл.27.08.2006].

Позитивним в цьому способі є об'єктивна мо-
жливість визначати "сприятливий" або "несприят-

ливий" прогноз перебігу захворювання в залежно-
сті від рівня експресії Р-глікопротеїну (Р-gp), що
кодується геном множинної медикаментозної стій-
кості (multidrug resistance gene - MDR-1).

Недоліком прототипу є технічна дороговизна
та трудоемність методики, що передбачає виді-
лення ДНК з лімфоцитів периферичної венозної
крові та проведення генотипування, що призво-
дить до помилкового прогнозу у 5-25% випадків.

В основу корисної моделі поставлена задача
створити спосіб прогнозування виживаності хворих
на м'якотканинні саркоми молочної залози шля-
хом встановлення рівня експресії білка Р-
глікопротеїну, що дозволить визначити ймовірність
ризiku метастазування, спрогнозувати клінічний
перебіг захворювання та відкоригувати тактику
лікування.

Поставлена задача виконується наступним
чином:

Після виконання хірургічного втручання, тка-
нину пухлини для морфологічного дослідження
фіксують у 4%-му розчині нейтрального формаліну
і заливають в парафін за загальноприйнятим ме-
тодом. З парафінових блоків готують препарати,
фарбують їх гематоксилін - еозином і вивчають
морфологічні особливості пухлин в світлооптич-
ному мікроскопі.

Імуногістохімічне дослідження (ІГХД) експресії
білка Р-gp проводиться на парафінових зрізах пу-

(13) **U**
(11) **29861**
(19) **UA**

хлинної тканини. Парафінові зрізи товщиною 4-6 мкм, монтуються на скельця, покриті полі-L-лізіном або на скельця з адгезивними властивостями Super Frost Plus (Німеччина) і залишаються на добу в термостаті при 37°C, або ж на 30 хвилин в термостаті при 56°C у разі застосування скельця (Super Frost Plus). У день проведення імуногістохімічної реакції проводиться депарафінування та обезводнювання зрізів.

Для оптимального імуногістохімічного визначення експресії антигенів проводять демаскування антигенів, шляхом обробки зрізів 0,06%-вим розчином трипсину протягом 10 хвилин при 37°C або здійснюють обробку зрізів в мікрохвильовій печі в розчині цитратного буферу (pH - 6,0). Всі інкубаційні цикли, що передбачені при імуногістохімічному виявленні антигенів, проводять у вологій камері при кімнатній температурі.

Для зменшення неспецифічного забарвлення на зрізи наносять 1% розчин бичачого сироваткового альбуміну (BSA), оскільки білки, що входять до його складу, займають усі високочаряджені неспецифічні ділянки, з якими може відбутися неспецифічне зв'язування моноклональних антитіл (МКАТ). Потім проводять інкубацію препаратів з первинними МКАТ в оптимальному розведенні протягом однієї години. Через годину зрізи відмивають 3 рази у забуференому фізіологічному розчині (ЗФР).

Після цього на скельця зі зрізами наносять кролячу сироватку проти імуноглобулінів миші в надлишковому титрі на годину.

Далі скельця зі зрізами знову відмивають в ЗФР та інкубують з пероксидаза-анти-пероксидаза (ПАП) комплексом протягом 45 хвилин. Після відмивання ПАП комплексу, що не зв'язався з кролячою антимишиною сироваткою проводять реакцію імуногістохімічного визначення активності пероксидази.

Якщо для візуалізації застосовують систему «EnVision», яку наносять після МКАТ, то гістохімічне визначення активності пероксидази проводять безпосередньо через 30 хвилин інкубації з вищевказаною системою. Після виявлення активності пероксидази або лужної фосфатази зрізи тканини пухлин дофарбовують гематоксиліном протягом 2-3 хв. і укладають в бальзам або Faramount Aqueous Mounting Medium (DacoCytomation, Данія).

Оцінку результатів фарбування проводять за допомогою світлового мікроскопу (збільшення x 200, 400).

Пухлину вважають негативною за Р-гр, якщо в тканині пухлини відсутня реакція з антитілами, або кількість пофарбованих клітин менша за 5%, і позитивною за маркером, якщо пофарбовано більш

5% цитоплазми пухлинних клітин з інтенсивністю 2+/3+ (Фіг.1, Фіг.2).

Встановлено, що коли рівень експресії становить більше 5% цитоплазми пухлинних клітин - визначають низькі показники виживаності, а при наявності менш ніж 5% - високі показники виживаності.

Прикладами конкретного виконання заявленого способу можуть бути виписки з історій хвороб двох пацієнтів.

1. Хвора У., 47 років. Історія хвороби №201461. У Київському міському онкологічному диспансері діагностовано фібросаркому молочної залози, яка була хірургічно видалена 12.09.2002р. з встановленням мікроскопічного діагнозу рТ2N0M0 (патогістологічне заключення №24245-54/02). Після хірургічного видалення пухлини за правилами загальноприйнятої технологічної процедури обробки біологічного матеріалу вироблявся парафіновий блок. ІГХД експресії білка Р-гр було проведено на парафінових зрізах пухлинної тканини за вищевказаною методикою.

В результаті проведення ІГХД встановлено експресію Р-гр на рівні 70%, що розглядається як присутність високого ступеню експресії та оцінюється як прогноз несприятливий. Незважаючи на радикальне лікування СМЗ, через 15 місяців від дати встановлення діагнозу розвинулись множинні метастази, а через 24 місяці хвора померла.

2. Хвора Л., 49 років. Історія хвороби №9205818. У Київському міському онкологічному диспансері діагностовано фібросаркому молочної залози, яка була хірургічно видалена 19.06.1996р. з встановленням мікроскопічного діагнозу рТ2N0M0 (патогістологічне заключення №40558/05). Після хірургічного видалення пухлини за правилами загальноприйнятої технологічної процедури обробки біологічного матеріалу вироблявся парафіновий блок. ІГХД експресії Р-гр було проведено на парафінових зрізах пухлинної тканини по загальновизначеній методиці.

В результаті проведення ІГХД встановлено експресію на рівні 0%, що розглядається як відсутність експресії та оцінюється як сприятливий прогноз. В результаті проведеного радикального лікування СМЗ протягом 10 років метастази не розвинулись і хвора жива.

Таким чином, за заявленим способом показник рівня експресії Р-гр принципово корелює з розвитком метастазів, строками летальності та виживаності хворих на СМЗ, що свідчить про його об'єктивність.

Спосіб виконано у 54 хворих на СМЗ і узагальнені результати представлені в таблиці.

Таблиця

Прогностична оцінка перебігу СМЗ

Рівень експресії Р-gp	Статус пацієнта	Ризик метастазування	Прогноз хвороби	Виникнення метастазів в абс.ч. (%)	Досліджений термін виживаності
Негативний 29 осіб	Живих 25 осіб Померлих 4 особи	Низький	Сприятливий	6 (21%)	До 5 років
Позитивний 25 осіб	Живих 9 осіб Померлих 16 осіб	Високий	Несприятливий	9 (36%)	Від 5 до 10 років

Джерела інформації:

1. Nash A.D. Soft tissue sarcomas: histological diagnosis. - New-York: Raven Press, 1989. - P. 63-76.

2. Breast sarcomas / H. Ohta, T. Komibuchi, N. Nishio et al. // Annals Nuclear Medicine. - 1997. - Vol. 11, №37. - P. 1239-1247.

3. Brennan M.F., Casper E.S., Harrison L.B. Soft

tissue sarcoma // Cancer Principles & Practice Oncology. - 2001. - Vol. 6, №2. - P. 1731-1852.

4. Пат. №2282852, RU, МПК G01N33/48. Метод прогнозирования течения множественной миеломы / Бакиров А., Калимулина Д., Бакиров Б., Викторова Т. (RU). - 3. №2005106447/15; Заявл.09.03.2005; Опубл.27.08.2006 (прототип).

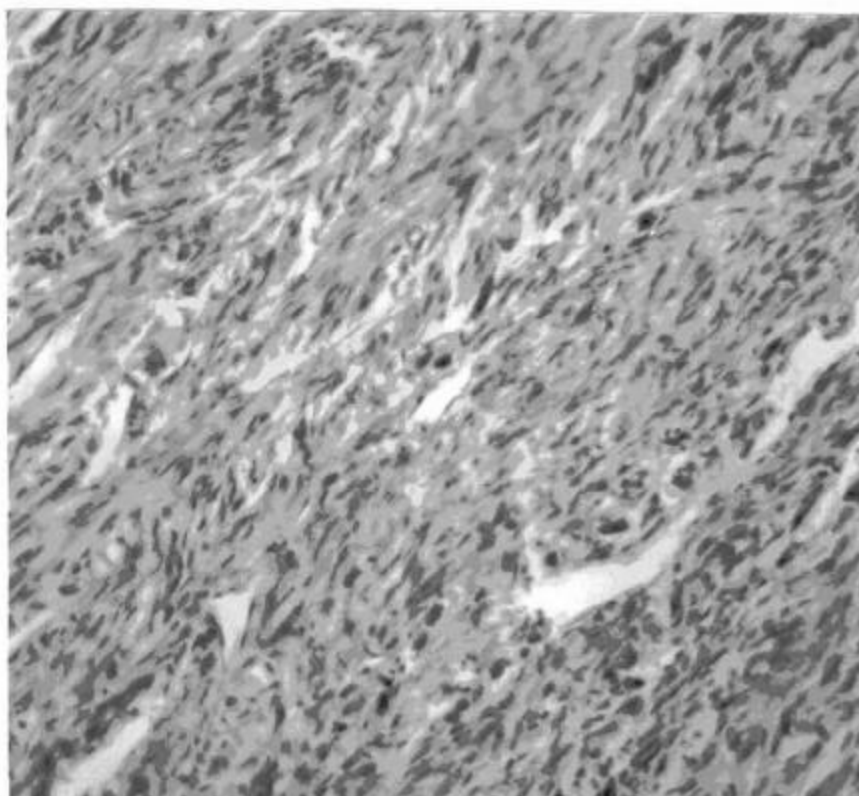


Fig. 1

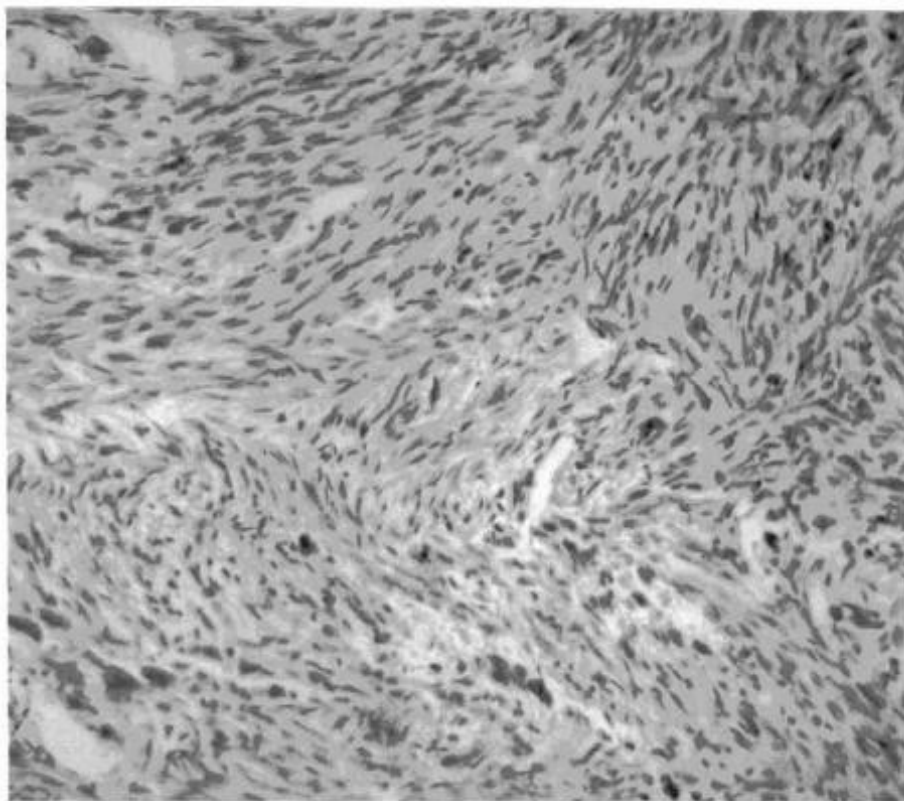


Fig. 2