



УКРАЇНА

(19) UA (11) 41048 (13) U
(51) МПК (2009)
G01N 33/48
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 ІНВАЗИВНОГО ТА МЕТАСТАТИЧНОГО ПОТЕНЦІАЛУ РАКУ МОЛОЧНОЇ ЗАЛОЗИ

1

(21) u200901030

(22) 09.02.2009

(24) 27.04.2009

(46) 27.04.2009, Бюл.№ 8, 2009 р.

(72) МИКИТЕНКО ДМИТРО ОЛЕКСАНДРОВИЧ,
UA

(73) МИКИТЕНКО ДМИТРО ОЛЕКСАНДРОВИЧ,
UA

(57) Спосіб прогнозування інвазивної та метастатичної активності раку молочної залози, що включає забір досліджуваного матеріалу, виявлення експресії ключового молекулярного маркера - білка Е-кадгерину, та оцінювання інвазивного та метастатичного потенціалу пухлини, який **відрізняється** тим, що як досліджуваний матеріал використовують плазму крові, в якій визначають рівень гомоцистеїну, після чого встановлюють діапазон рівня експресії Е-кадгеринів за формулами:

для однієї межі діапазону:

$$E\text{-кадг} = k_1 + k_2V + k_3H + k_4V^2 + k_5V \times H + k_6H^2,$$

де Е-кадг - рівень експресії Е-кадгеринів (відсоток клітин з позитивною експресією досліджуваного білка);

к - коефіцієнт пропорційності, %;

V - вік хворої, роки;

2

H - рівень гомоцистеїну в плазмі крові, мкМ, причому для I стадії захворювання $k_1=19,726\%$; $k_2=-1,910\%$; $k_3=5,946\%$; $k_4=0,050\%$; $k_5=-0,340\%$; $k_6=0,812\%$;

для IIa стадії захворювання $k_1=-29,630\%$; $k_2=3,450\%$; $k_3=-6,930\%$; $k_4=-0,051\%$; $k_5=0,149\%$; $k_6=0,141\%$;

для IIb стадії захворювання $k_1=-77,810\%$; $k_2=0,530\%$; $k_3=6,698\%$; $k_4=0$; $k_5=0$; $k_6=0$;

для III стадії захворювання $k_1=25,17\%$; $k_2=-1,450\%$; $k_3=7,160\%$; $k_4=0$; $k_5=0$; $k_6=0$;

для другої межі діапазону:

$$E\text{-кадг} = k_7 \left(\frac{0,4V}{110,46} + \frac{1,0H}{19,5} + \frac{0,6C_m}{200} \right),$$

де C_m - стандартизований показник стадії захворювання, що дорівнює 100 для I стадії захворювання, 200 - для IIa стадії, 250 - для IIb стадії, 300 - для III стадії; k_7 - коефіцієнт пропорційності, рівний 1,8% при рівні гомоцистеїну нижче 9,75 та рівний 30,0% в усіх інших випадках, причому, якщо діапазон рівня експресії Е-кадгеринів є меншим за 5%, вважають, що пухлина має високий метастатичний та інвазивний потенціал.

Корисна модель відноситься до галузі медицини, зокрема до онкології, і може бути використана для точного прогнозу особливостей перебігу захворювання на рак молочної залози, зокрема інвазивного та метастатичного потенціалу пухлини.

Основними характеристиками пухлинного процесу та причинами смертності пацієнтів, хворих на рак молочної залози, є інвазивний потенціал пухлини та наступний розвиток метастазів. При чому, останні являються найбільш важливим прогностичним фактором, так як усі пацієнти з наявністю дистантних метастазів характеризуються неблагоприятним перебігом захворювання.

Одним з ключових характеристик інвазивного та метастатичного потенціалу пухлини є експресія молекул адгезії Е-кадгеринів. Е-кадгерин являє собою трансмембранний глікопротеїн, що забезпечує кальцій-опосередковану міжклітинну взаємодію, специфічно залучений до міжклітинної адгезії епітеліальних клітин та є важливим регулятором морфогенезу та пухлинним супресором. Аберантна експресія цього білку асоціюється з набуттям інвазивності та більш високою стадією захворювання для злоякісних пухлин багатьох локалізацій, зокрема і молочної залози. Нормальний протоковий епітелій молочної залози інтенсивно експресує білки Е-кадгерини на цитоплазматичних мембранах. Зміни гена Е-

U
(13)

41048
(11)

UA
(19)

кадгерина (мутації, делеції, метилування), що можуть супроводжувати процес канцерогенезу, викликають втрату експресії цього білка чи зміну його локалізації в клітині, що має 2 важливих наслідки: порушуються міжклітинні контакти та морфогенетичні реакції клітини; відбувається накопичення β -катеніну в ядрі та підвищення його транскрипційної активності. В результаті стимулюється розмноження клітин та збільшується їх здатність до інвазії. Оскільки адгезивність та інвазія є важливою ланкою реалізації метастатичного потенціалу злоякісної клітини та характеристикою прогресії пухлинного росту, відсутність чи суттєве зниження експресії Е-кадгерину в тканині пухлини є несприятливою прогностичною ознакою протікання захворювання у хворих на рак молочної залози.

Оцінка рівня експресії Е-кадгерину в тканині пухлини на сьогодні проводиться на клінічних зразках (отриманих інвазивним шляхом) трьома основними методами: імуногістохімічним, імуноблотингом та шляхом оцінки за експресією м-РНК. Останній метод [G.Berx, F.V.Roy. The E-cadherin/catenin complex: an important gatekeeper in breast cancer tumorigenesis and malignant progression // *Breast Cancer Res.*, 2001; Vol. 3 (5): P.289-293] є наймолодшим, надзвичайно точним, проте володіє деякими недоліками, пов'язаними з хибно-позитивними результатами (через неспецифічність використовуваних праймерів чи контамінацію (забруднення) проб), нестабільністю власне молекул РНК та вартістю діагностичного обладнання.

Досвід використання імуноблотингу [L.Mauro, S.Gatalano, G.Bossi et al. evidences that leptin up-regulates E-cadherin expression in breast cancer: effects on tumor growth and progression // *Cancer Res.*, 2007; Vol. 67: P.3412-3421] в діагностичних лабораторіях теж свідчить про вірогідність хибно-позитивних результатів, які зумовлені більшим чином складнощами інтерпретації результатів. Зокрема, результат може бути розцінений як негативний навіть у разі наявності на стріпі імуноблоту однієї чи навіть кількох смуг.

Найбільш широковживаним на сьогодні залишається метод імуногістохімічного аналізу [B.E.Gould Rothberg, M.B.Bracken. E-cadherin immunohistochemical expression as a prognostic factor in infiltrating ductal carcinoma of the breast: a systematic review and meta-analysis // *Breast Cancer Res. and Treatment*, 2006; Vol. 100, N 2: P.139-148], який і вибрано за прототип. Цей метод дозволяє отримати якісні та кількісні характеристики експресії досліджуваних білків (відсутність/наявність експресії, частка клітин з позитивною експресією досліджуваного білку), включає проведення імуногістохімічного дослідження пухлини і виявлення в ній експресії Е-кадгерину, при рівня експресії котрого нижче 5% вважають, що пухлина має високий інвазивний та метастатичний потенціал, що обумовлює неблагоприємний перебіг захворювання. Проте, як і випадках інших методів оцінки експресії Е-кадгерину, в якості матеріалу для аналізу використовується тканина пухлини, що

отримується шляхом інвазивної діагностики (напр.: трепан-біопсії), і може негативно позначитися на подальшому перебігу захворювання, або під час операції.

В основу корисної моделі, що заявляється, покладено завдання створити такий спосіб достовірного прогнозування інвазивного та метастатичного потенціалу пухлини на основі оцінки рівня експресії Е-кадгерину на доопераційному етапі без застосування інвазивних діагностичних методик (інвазивного втручання).

Для вирішення такого завдання запропонований спосіб прогнозування інвазивного та метастатичного потенціалу раку молочної залози, який включає забір матеріалу, що досліджують, виявлення рівня експресії ключового молекулярного маркеру - білку Е-кадгерину та оцінювання інвазивного та метастатичного потенціалу пухлини, за яким, згідно з корисною моделлю, як матеріал, що досліджують використовують плазму крові, в якій визначають рівень гомоцистеїну, після чого встановлюють діапазон рівня експресії Е-кадгерину за формулами: для однієї межі діапазону:

$$E-кадг = k_1 + k_2B + k_3H + k_4B^2 + k_5BH + k_6H^2,$$

де Е-кадг - рівень експресії Е-кадгеринів (відсоток клітин з позитивною експресією досліджуваного білку);

к - коефіцієнт пропорційності, %;

В - вік хворої, роки;

Н - рівень гомоцистеїну в плазмі крові, мкМ;

причому для I стадії захворювання $k_1=19,726\%$; $k_2=-1,910\%$; $k_3=5,946\%$; $k_4=0,050\%$; $k_5=-0,340\%$; $k_6=0,812\%$;

для IIa стадії захворювання $k_1=-29,630\%$; $k_2=3,450\%$; $k_3=-6,930\%$; $k_4=-0,051\%$; $k_5=0,149\%$; $k_6=0,141\%$;

для IIb стадії захворювання $k_1=-77,810\%$; $k_2=0,530\%$; $k_3=6,698\%$; $k_4=0$; $k_5=0$; $k_6=0$;

для III стадії захворювання $k_1=25,17\%$; $k_2=-1,450\%$; $k_3=7,160\%$; $k_4=0$; $k_5=0$; $k_6=0$;

для другої межі діапазону:

$$E-кадг = k_7 \left(\frac{0,4B}{110,46} + \frac{10H}{19,5} + \frac{0,6Cm}{200} \right),$$

де Cm - стандартизований показник стадії захворювання, що дорівнює 100 для I стадії захворювання, 200 - для IIa стадії, 250 - для IIb стадії, 300 - для III стадії;

k_7 - коефіцієнт пропорційності, рівний 1,8% при рівні гомоцистеїну нижче 9,75 та рівний 30,0% в усіх інших випадках;

причому, вважають, що пухлина має високий метастатичний та інвазивний потенціал, якщо діапазон рівня експресії Е-кадгеринів є меншим за 5%.

Запропонований спосіб заснований на аналізі клініко-морфологічних, лабораторних параметрів пацієнтів та молекулярно-біологічних характеристик пухлин 117 хворих на рак молочної залози I-III стадій (навчальна вибірка), які перебували на лікуванні у відділенні пухлин молочної залози Інституту онкології АМН України та Київської міської онкологічної лікарні протягом 2005-2007рр.

Рівень гомоцистеїну визначався за допомогою комерційного набору "FHCY100 Axis® Homocysteine EIA kit" виробництва "Axis-Shield" (Великобританія). Експресія молекулярних маркерів оцінювалася шляхом традиційного імуногістохімічного аналізу з використанням

моноклональних антитіл виробництва „DakoCytomation" (Данія).

Кількість хворих, що увійшли в дослідження, з рівнем експресії Е-кадгерина в тканині пухлини 5% та більше наведено в таблиці 1, що є характеристикою достовірності отриманих результатів

Таблиця 1

Встановлення вірогідності розрахунків експресії
Е-кадгерину у хворих на рак молочної залози в залежності від стадії захворювання та віку

Стадія захворювання		Вік хворих			Сума за стадією
		до 45 років	45-55 років	понад 55 років	
I	Доля хворих (%)	42,9	50	55,6	52,8
IIa		80	66,7	72,7	70,6
IIб		50	100	20	44,4
III		-	0	66,7	50
Разом		61,5	59,6	59,6	59,8

Для підтвердження ефективності запропонованого способу діагностики молекулярно-біологічних характеристик пухлин була здійснена перевірка на контрольній групі хворих на рак молочної залози, котрі перебували на лікуванні в Тернопільському обласному комунальному клінічному диспансері протягом 2007-2008 рр.

Конкретні приклади виконання способу:

Приклад 1.

Хвора Л., 70 років. Госпіталізована у плановому порядку з приводу підозри на рак молочної залози. Після обстеження встановлено

діагноз: рак молочної залози IIIст. Прогноз перебігу захворювання невідомий, так як невідомий інвазивний та метастатичний потенціал пухлини. Рекомендовано оперативне лікування.

З метою визначення прогнозу та метастатичного потенціалу пухлини на доопераційному етапі у хворої був узятий аналіз венозної крові і визначений рівень гомоцистеїну в плазмі крові, що склав 13,2мкМ.

За відповідними формулами був визначений діапазон рівня експресії Е-кадгеринів. Проведені наступні розрахунки: для однієї межі діапазону:

$$E\text{-кадг}=25,17\%-1,450\%*70+7,160\%*13,2+0*70^2+0*70*13,2+0*13,2^2=18,18\%$$

для другої межі діапазону:

$$E\text{-кадг}=30,0\%*(0,4*70/110,46+1,0*13,2/19,5+0,6*300/200)=54,91\%$$

Отже, діапазон рівня експресії Е-кадгеринів за проведеними розрахунками прогнозується 18,8-54,91%.

Таким чином, оскільки всі отримані розрахунки перевищують значення 5 %, то був зроблений висновок, що перебіг захворювання сприятливий, оскільки низька вірогідність метастазування пухлини, низький інвазивний потенціал.

Після проведення оперативного втручання та імуногістохімічного дослідження тканини пухлини встановлено, що рівень експресії Е-кадгеринів в тканині пухлини був приблизно 20 %. Таким чином, відзначений збіг прогнозних розрахунків та фактичних даних.

Приклад 2.

$$E\text{-кадг}=25,17\%-1,450\%*69+7,160\%*8,03+0*69^2+0*69*8,03+0*8,03^2=-17,38\%,$$

але оскільки експресія не може бути негативною, то результат вважаємо 0;

для другої межі діапазону:

$$E\text{-кадг}=1,8\%*(0,4*69/110,46+1,0*8,03/19,5+0,6*300/200)=2,81\%$$

Отже, діапазон рівня експресії Е-кадгеринів за проведеними розрахунками прогнозується 0-2,81%.

Таким чином, оскільки отримані розрахунки не перевищують значення 5%, то був зроблений висновок, що перебіг захворювання

Хвора К., 69 років. Госпіталізована у плановому порядку з приводу підозри на рак молочної залози. Після обстеження встановлено діагноз: рак молочної залози IIIст. Прогноз перебігу захворювання невідомий, так як невідомий інвазивний та метастатичний потенціал пухлини. Рекомендовано оперативне лікування.

З метою визначення прогнозу та метастатичного потенціалу пухлини на доопераційному етапі у хворої був узятий аналіз венозної крові і визначений рівень гомоцистеїну в плазмі крові, що склав 8,03мкМ.

За відповідними формулами був визначений діапазон рівня експресії Е-кадгеринів. Проведені наступні розрахунки: для однієї межі діапазону:

несприятливий, оскільки пухлина характеризується підвищеним інвазивним потенціалом та метастатичною активністю.

Після проведення оперативного втручання та імуногістохімічного дослідження тканини пухлини встановлено, що експресія Е-кадгеринів в тканині

пухлини була майже відсутня (одиначні клітини; <1%). Таким чином, відзначений збіг прогнозних розрахунків та фактичних даних.

Приклад 3.

Хвора А., 47 років, госпіталізована у плановому порядку з приводу підозри на рак молочної залози. Після обстеження встановлено діагноз: рак молочної залози ІІб ст. Прогноз перебігу захворювання невідомий, так як

невідомий інвазивний та метастатичний потенціал пухлини. Рекомендовано оперативне лікування.

З метою визначення прогнозу та метастатичного потенціалу пухлини на доопераційному етапі у хворої був узятий аналіз венозної крові і визначений рівень гомоцистеїну в плазмі крові, що склав 15,9мкМ.

За відповідними формулами був визначений діапазон рівня експресії Е-кадгеринів. Проведені наступні розрахунки: для однієї межі діапазону:

$$E\text{-кадг} = -77,810\% + 0,530\% \cdot 47 + 6,698\% \cdot 15,9 + 0 \cdot 47^2 + 0 \cdot 47 \cdot 15,9 + 0 \cdot 15,9^2 = 53,6\%$$

для другої межі діапазону:

$$E\text{-кадг} = 30,0\% \cdot (0,4 \cdot 47 / 110,46 + 1,0 \cdot 15,9 / 19,5 + 0,6 \cdot 250 / 200) = 52,07\%$$

Отже, діапазон рівня експресії Е-кадгеринів за проведеними розрахунками прогнозується 52.07-53.6%.

Таким чином, оскільки всі отримані розрахунки перевищують значення 5%, то був зроблений висновок, що перебіг захворювання сприятливий, оскільки низька вірогідність метастазування пухлини та низький її інвазивний потенціал.

Після проведення оперативного втручання та імуногістохімічного дослідження тканини пухлини встановлено, що рівень експресії Е-кадгеринів в тканині пухлини був приблизно 50%. Таким чином, відзначений збіг прогнозних розрахунків та фактичних даних.

Перевірка пропонованого способу прогнозування ефективності протипухлинної терапії проведена на 12 хворих. Збіг розрахункових величин експресії молекулярних маркерів пухлинних клітин і фактичних даних за результатами імуногістохімічного дослідження, проведеного після оперативного втручання,

встановлено у 11 з 12 пацієнтів. За наведеними прикладами вірогідність розрахунків (відповідно до наведеної табл. 1) склала: приклад 1 та 2-66,7%; приклад 3-100% відповідно.

У порівнянні з найближчим аналогом, запропонований спосіб дозволяє на доопераційному етапі за рівнем гомоцистеїну в плазмі крові визначати діапазон рівня експресії молекул адгезії Е-кадгеринів, за ним зробити висновки про інвазивний та метастатичний потенціал пухлин молочної залози на цьому етапі. Це в ряді випадків значно підвищує точність прогнозу та дозволяє оптимально скоригувати тактику лікування хворих на рак молочної залози І-ІІІ стадій в цілому та надає можливість для розробки доступного для використання у клінічних умовах цільового програмного забезпечення з метою вирішення методологічних, методичних і прикладних проблем лікування хворих на рак молочної залози.