



УКРАЇНА

(19) UA (11) 52331 (13) U
(51) МПК (2009)
G01N 21/84
G01N 33/53
G01N 33/574

МІНІСТЕРСТВО ОСВІТИ
І НАУКИ УКРАЇНИ

ДЕРЖАВНИЙ ДЕПАРТАМЕНТ
ІНТЕЛЕКТУАЛЬНОЇ
ВЛАСНОСТІ

ОПИС ДО ПАТЕНТУ НА КОРИСНУ МОДЕЛЬ

видається під
відповідальність
власника
патенту

(54) СПОСІБ ПРОГНОЗУВАННЯ РАКУ ПЕРЕДМІХУРОВОЇ ЗАЛОЗИ

1

2

(21) u201001437

(22) 12.02.2010

(24) 25.08.2010

(46) 25.08.2010, Бюл. № 16, 2010 р.

(72) ГРИГОРЕНКО В'ЯЧЕСЛАВ МИКОЛАЙОВИЧ,
САКАЛО ВАЛЕРІЙ СЕВАСТЯНОВИЧ, ЧЕКАЛОВА
АННА ОЛЕКСІЇВНА, РОМАНЕНКО АЛІНА МИХАЙ-
ЛІВНА, НЕГРЕЙ ЛАРИСА МИКОЛАЇВНА

(73) ДЕРЖАВНА УСТАНОВА "ІНСТИТУТ УРОЛОГІЇ
АКАДЕМІЇ МЕДИЧНИХ НАУК УКРАЇНИ"

(57) Спосіб прогнозування раку передміхурової
залози, який включає характеристику ступеня ди-

ференціації пухлини в балах за Глісоном, який
відрізняється тим, що додатково визначають
ядерну експресію протеїну гена p53, маркера про-
ліферації Ki-67, цитоплазматичну експресію проте-
їну гена Bcl-2, та, якщо при імуногістохімічному
дослідженні маркерів пухлини виявляють гіперекс-
пресію протеїнів p53, Ki-67, Bcl-2 і низьке дифере-
нціювання пухлини - 7-10 балів за Глісоном, це
свідчить про несприятливий перебіг захворюван-
ня.

Спосіб відноситься до медицини, зокрема до
онкоурології, а саме до прогнозування перебігу
раку передміхурової залози з застосуванням мор-
фологічних та імуногістохімічних факторів.

Одним із шляхів удосконалення прогнозування
раку передміхурової залози є комплексне вивчен-
ня на сучасному рівні ряду індивідуальних морфо-
логічних та імуногістохімічних (молекулярних) ха-
рактеристик пухлини, які впливають на її ріст,
диференціацію та метастатичну активність.

Відома характеристика пухлинних маркерів в
передміхуровій залозі (1), яка полягає у визначенні
експресії генів p53, Bcl-2, Ki-67 та p16 в тканині
раку передміхурової залози та передбачає вияв-
лення різної інтенсивності експресії цих генів.

Недоліком способу є те, що ці критерії не за-
стосовують в комплексній оцінці прогнозу захво-
рювання.

Відомий також спосіб визначення градації раку
передміхурової залози за Глісоном (2), що взята
за прототип, яка характеризує ступінь диференці-
ації пухлини в балах, що відповідає ступеню її аг-
ресивності.

Недоліком способу є те, що ці критерії теж не
дають змоги прогнозування перебігу захворюван-
ня.

В основу винаходу поставлене завдання удо-
сконалити спосіб прогнозування раку передміху-
рової залози шляхом співставлення ступеню ди-

ференціації пухлини в балах за Глісоном та ядер-
ною експресією протеїнів p53, Ki-67, цитоплазма-
тичною гіперекспресією Bcl-2, та якщо при імуногі-
стохімічному дослідженні маркерів пухлини
виявляють високу експресію протеїну гена p53,
маркера проліферації Ki-67, цитоплазматичну екс-
пресію протеїну гена Bcl-2 і низьку диференціацію
пухлини, за Глісоном - 7-10 балів, то це свідчить
про несприятливий перебіг захворювання, а саме
швидкий ріст пухлини та появу метастазів, що по-
требує призначення хворому постійної андроген-
ної блокади.

Поставлена задача вирішується тим, що спо-
сіб прогнозування раку передміхурової залози,
який включає характеристику ступеня диференці-
ації пухлини в балах за Глісоном, згідно з винахо-
дом, додатково визначають ядерну експресію
протеїну гена p53, маркера проліферації Ki-67,
цитоплазматичну експресію протеїну гена Bcl-2,
та якщо при імуногістохімічному дослідженні мар-
керів пухлини виявляють гіперекспресію протеїнів
p53, Ki-67, Bcl-2 і низьке диференціювання пухли-
ни - 7-10 балів за Глісоном, це свідчить про не-
сприятливий перебіг захворювання.

Спосіб прогнозування раку передміхурової за-
лози виконують таким чином: у хворого здійсню-
ють забір біопсійного матеріалу передміхурової
залози, який негайно фіксують у забуференому
формаліні (фосфатний буфер - pH 7,4) з подаль-

(19) UA (11) 52331 (13) U

шим виготовленням парафінових блоків. Крім звичайного гістологічного дослідження використовують методи імуногістохімічного аналізу для виявлення рецепторів андрогенів та естрогенів, протеїнів генів, які регулюють клітинний цикл, та супресорів пухлинного росту p53, інгібітору апоптозу Bcl-2, а також маркера проліферації Ki-67 у парафінових зрізах товщиною 4 мікрони. Імуногістохімічне фарбування проводять стандартним методом з використанням авідин-біотинового пероксидазного комплексу (ABC), мишачих моноклональних антитіл проти рецепторів естрогенів (1D5), андрогенів (AR441), p53 (DO-7 імуноглобулін IgG2b, DAKO, Glostrup, Denmark) у розведенні 1:100; Bcl-2 (DAKO Cytomation) у розведенні 1:50; проти Ki-67 (DAKO) у розведенні 1:500. Гістологічну верифікацію пухлини проводять згідно з останньою Міжнародною класифікацією BOO3 (2004) з визначенням сумарної градації раку, розробленої Глісоном.

Для підрахунку рівня імунореактивності тканини використовують метод визначення процентного вмісту забарвлених клітин при підрахунку на 1000 клітин у одному препараті. При цьому "0" відповідає відсутності забарвлених клітин; "1"-<10%; "2"->10<50%; "3"->50% забарвлених клітин.

Спосіб прогнозування раку передміхурової залози був використаний у відділі онкоурології та лабораторії патоморфології ДУ "Інституту урології АМН України" при дослідженні гістологічного матеріалу 27 хворих на рак передміхурової залози із III стадією захворювання. Всі спостереження, відповідно до градації раку за Глісоном, були розподілені на три групи: група I об'єднувала 13 пухлин зі стадією за Глісоном <5; група II складалася із 8 спостережень зі стадією за Глісоном >5 і <8; група 3 (6 спостережень) характеризувалася найбільш високою стадією за Глісоном >8.

Дані гістологічного дослідження пояснюють ілюстративними матеріалами, де на Фіг.1 представлені зони передраку в передміхуровій залозі

А - простатична інтраепітеліальна неоплазія (PIN), фарбування гематоксилінеозіном $\times 200$

Б - проліферуюча запальна атрофія (PIA), фарбування гематоксилін-еозіном $\times 200$

В - експресія Bcl-2 в зоні PIA $\times 200$

Г - експресія Bcl-2 в зоні PIN $\times 200$

на Фіг.2 представлені зони раку передміхурової залози, де

А - експресія Ki-67, аденокарцинома, стадія за Gleason 3+4=7 $\times 400$.

Б - експресія p53, аденокарцинома, стадія за Gleason 4+5=9 $\times 400$.

В - експресія Ki-67, аденокарцинома, стадія за Gleason 7 $\times 400$.

Г - експресія Bcl-2, аденокарцинома, стадія за Gleason 2+2=4 $\times 400$.

При гістологічному дослідженні біоптатів передміхурової залози із групи I у 6 із 13 (46% спостережень) переважно дрібноацинарний рак розвивався на фоні хронічного простатиту з вогнищами PIA (proliferative inflammatory atrophy - проліферуюча запальна атрофія), часто у сполученні із зонами простатичної інтраепітеліальної неоплазії (PIN), які прийнято розцінювати як пере-

дракові стани передміхурової залози (Фіг.1А, Б, Г). При цьому у вогнищах PIA у невеликих (менше ніж 10% клітин) та більш виражених (>10 але <50%) у групах забарвлених клітин виявляють експресію протеїнів p53, Ki-67 та особливо високу (>50% забарвлених клітин) експресію Bcl-2 (Фіг.1В). Вогнища передраку у вигляді простатичної інтраепітеліальної неоплазії (PIN) та проліферуючої запальної атрофії (PIA) у біоптатах групи II були виявлені у 2 із 8 (25%) спостережень крупно- або дрібноацинарної аденокарциноми з формуванням кріброзних, рідше солідних структур. У новоутвореннях цієї групи рівень експресії протеїнів p53, Bcl-2 та особливо Ki-67 достовірно збільшувався ($p<0,05$), порівняно з пухлинами групи I (Фіг.2 А, Б). Рак передміхурової залози з перевагою солідних структур або шкіру, у біоптатах групи III із стадією за Глісоном вище 8, характеризувався найвищою експресією p53, Bcl-2 та Ki-67 ($p<0,05$), що свідчить про високу проліферативну активність ракових клітин внаслідок альтерації регулюючих апоптоз генів Bcl-2 та p53 (Фіг.2 В, Г).

Таким чином, хронічний простатит, який часто поєднують з розвитком ділянок проліферуючої запальної атрофії (PIA) та простатичної інтраепітеліальної неоплазії (PIN), є, вірогідно, сприятливим фоном для розвитку раку передміхурової залози, при цьому у вогнищах PIA та меншою мірою PIN у першу чергу виявляють експресію протеїну Bcl-2, що свідчить про альтерацію гену Bcl-2, який пригнічує апоптоз. Це можна розглядати як один із ранніх проявів молекулярних пошкоджень у патогенезі раку передміхурової залози.

Наводимо приклад практичного застосування запропонованого способу.

Приклад, хворий К.М.С., І. х. №4236/05, 1936 р.н. звернувся із скаргами на ніктурію 2-3р. та на потоншення струменю сечі і необхідність напруження. Рівень ПСА складав 40,4нг/мл. При УЗД виявлено асиметрію, нерівність контуру та гіпоехогенні ділянки. Об'єм залишкової сечі складав до 60мл. При додатковому урофлоуметричному дослідженні (УФМ) визначено значне зменшення Qmax до 6,1мл/с, TQ складало - 43,1 (с), TQmax - 11,2 (с) та Qave 7,2 (мл/с). При пальцевому ректальному дослідженні виявлено ущільнення та неоднорідність структури передміхурової залози на підставі чого було запідозрено пухлинний процес. Була виконана трансректальна пункційна біопсія, яка дала змогу верифікувати діагноз: рак передміхурової залози. Виявлено низько диференційовану аденокарциному, підрахунок за Глісоном - 3+4=7 балів. Проведено за запропонованим способом імуногістохімічні реакції на визначення протеїнів генів, які регулюють клітинний цикл, та супресорів пухлинного росту p53, інгібітору апоптозу Bcl-2, а також маркера проліферації Ki-67. Рак передміхурової залози з перевагою солідних структур або шкіру у біоптатах характеризується найвищою експресією p53, Bcl-2 та Ki-67 (процентний вміст забарвлених клітин при підрахунку на 1000 клітин у одному препараті становить >50%), що свідчить про високу проліферативну активність ракових клітин внаслідок альтерації регулюючих апоптоз генів Bcl-2 та p53. Хворому встановлено клінічний

діагноз: Рак передміхурової залози III ст., кл. гр. 2, (T3 N0M0). Призначено лікування аналогом лютеїзуючого гормон-релізінг гормону, одномісячний шприц-депо по 3,75мг на 3 місяці. Через 3 місяці при аналізі суб'єктивних скарг було відмічено покращення загального стану та акту сечовипускання, зменшення больових відчуттів та частоти ніктурії в два рази. Рівень простатспецифічного антигену знизився до 6,8нг/мл. При пальцевому ректальному дослідженні помітно зменшились розміри передміхурової залози. Середні розміри її за даними УЗД після лікування дещо зменшились в сагітальній проекції, залишались без змін у фронтальній. Суттєво зменшився її об'єм: з 67см³ до 52см³. За даними УФМ через 3 місяці Qmax та Qave збільшились до 10,5мл/с і 9,8мл/с відповідно. Показники TQ та TQmax зменшились майже у двічі. Концентрація тестостерону на протязі першого тижня зросла до 5,4нмоль/л, а в подальшому, через 10 днів знизилась і утримувалась на кастраційному рівні - 1,9нмоль/л. При проведенні порівняльної оцінки якості життя до і після лікування за шкалою Карновського встановлено, що лікування лютеїзуючим гормон-релізінг гормоном не впливало на щоденну фізичну і розумову активність і була досить високою. За час спостереження хворий пот-

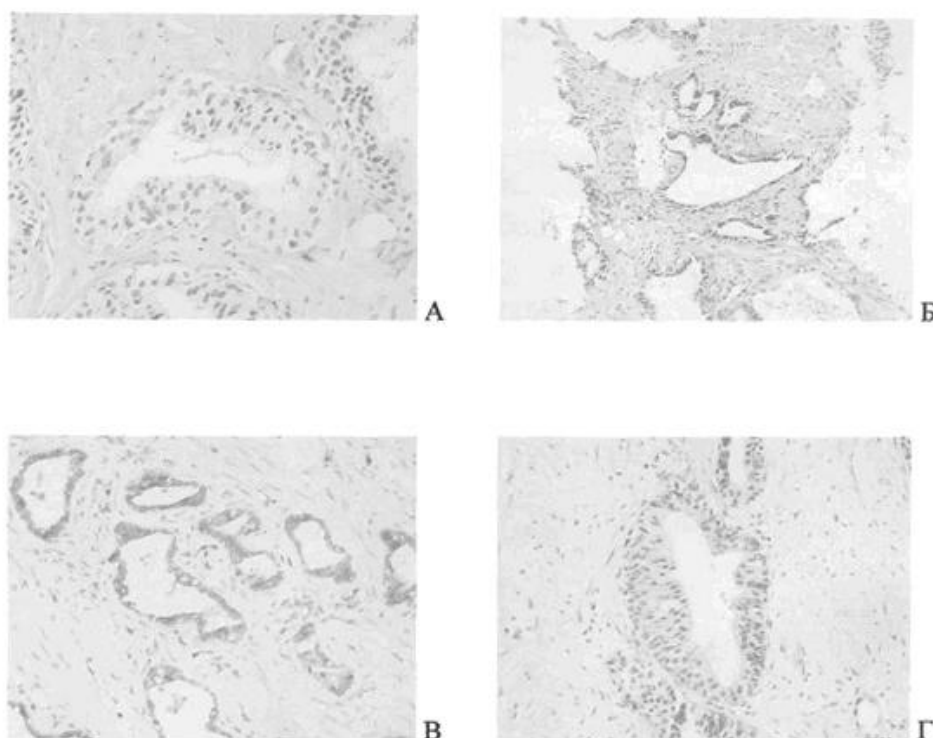
ребував відновлення курсу гормональної терапії 3 рази з інтервалом 1-2 міс. Через 8 місяців після одномісячної перерви в лікуванні у хворого виявлено метастатичні зміни в кістках. Хворому було призначено неперервну андрогенну блокаду та дифосфонати. Через 28 місяців від початку лікування хворий помер від прогресування захворювання.

Таким чином, спосіб прогнозування раку передміхурової залози при виявленні низького ступеня диференціації пухлини та високого рівня експресії протеїнів p53, Ki-67, Bcl-2 дає змогу оцінити характер перебігу захворювання та призначити адекватне лікування. Ефективність способу становить 97,3%.

Джерела інформації:

1. Epstein J.I., Algaba F., Allsbrook W.C. et al. Tumours of the Prostate //Pathology and Genetics of Tumours of Urinary System and male genital Organs /Ed. by J.N. Eble. - IARCPress Lyon, 2004. - P.155-354.

2. Epstein J.I., Allsbrook W.C. Jr., Amin M.B., Egevad L.L. Modified Gleason grading system /Am. J. Surg. Pathol. - 2005. - Sep; 29. - P.1228-1242 (прототип).



Фіг. 1

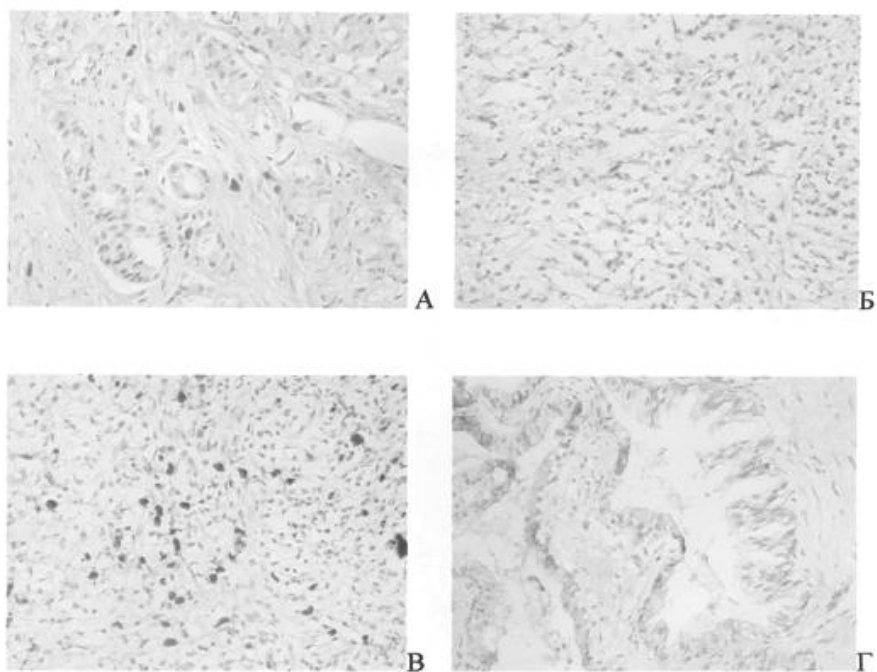


Fig. 2