



ДЕРЖАВНА СЛУЖБА
ІНТЕЛЕКТУАЛЬНОЇ
ВЛАСНОСТІ
УКРАЇНИ

УКРАЇНА

(19) **UA**

(11) **111510**

(13) **U**

(51) МПК

G01N 33/50 (2006.01)

(12) ОПИС ДО ПАТЕНТУ НА КОРИСНУ МОДЕЛЬ

(21) Номер заявки: **u 2016 05437**

(22) Дата подання заявки: **19.05.2016**

(24) Дата, з якої є чинними
права на корисну
модель: **10.11.2016**

(46) Публікація відомостей
про видачу патенту: **10.11.2016, Бюл.№ 21**

(72) Винахідник(и):

**Чехун Василь Федорович (UA),
Лук'янова Наталія Юріївна (UA),
Шепеленко Ірина Віталіївна (UA),
Чехун Святослав Васильович (UA),
Борікун Тетяна Вікторівна (UA),
Клюсов Олександр Миколайович (UA),
Собченко Сергій Олександрович (UA)**

(73) Власник(и):

**ІНСТИТУТ ЕКСПЕРИМЕНТАЛЬНОЇ
ПАТОЛОГІЇ, ОНКОЛОГІЇ І РАДІОБІОЛОГІЇ
ІМ. Р.Є. КАВЕЦЬКОГО НАН УКРАЇНИ,
вул. Васильківська, 45, м. Київ, 03022 (UA)**

(54) СПОСІБ ВИЗНАЧЕННЯ СТУПЕНЯ ЗЛОЯКІСНОСТІ ПУХЛИН У ХВОРИХ НА РАК МОЛОЧНОЇ ЗАЛОЗИ

(57) Реферат:

Спосіб визначення ступеня злоякісності пухлин у хворих на рак молочної залози з верифікованим діагнозом. Перед проведенням комплексного лікування у хворих визначають рівні мікроРНК-21 та мікроРНК-let-7d в пухлинній тканині у порівнянні з нормальною тканиною молочної залози. І у випадку підвищення рівня мікроРНК-21 та зниження рівня мікроРНК-let-7d у пухлинній тканині роблять висновок про високий ступінь злоякісності пухлини.

UA 111510 U

Корисна модель, що заявляється, належить до галузі медицини, зокрема до клінічної онкології.

Рівень техніки. Рак молочної залози (PM3) - це один з найпоширеніших видів злоякісних новоутворень серед жінок як в Україні, так і у світі в цілому. Незважаючи на розробку нових методів діагностики та більш ефективних методів лікування, часто результати лікування PM3 залишаються незадовільними. Причиною цього є генетична та морфологічна гетерогенність пухлин, яку оцінюють за ступенем злоякісності пухлинних клітин, яка є ключовим фактором, що відображає біологічні особливості пухлин. Підвищення ступеня злоякісності корелює з розвитком метастазів, чутливістю до гормонотерапії, впливає на підбір лікування, на розвиток рецидивів, якість та тривалість життя хворих на PM3. Таким чином, залишається актуальним пошук додаткових інформативних критеріїв, які дозволять визначати ступінь злоякісності та прогнозувати перебіг PM3 [1-2].

Останніми роками з'явилися дані про те, що розвиток пухлин різного гістогенезу супроводжується характерними змінами профілю експресії мікроРНК в пухлинній тканині. Мішенями мікроРНК є гени, задіяні у процесах проліферації, метастазування, інвазії; крім цього мікроРНК є важливою ланкою регуляції гормональних сигнальних шляхів. Зміни рівнів ряду мікроРНК пов'язують з ініціацією та прогресією багатьох типів злоякісних новоутворень, в тому числі й PM3 [3-6]. Усе вищезазначене свідчить про перспективність їх застосування в аспекті визначення ступеня злоякісності PM3.

Відомими способами визначення ступеня злоякісності є морфологічне та імуногістохімічне дослідження пухлинної тканини. Основним недоліком використання зазначених методик є їх суб'єктивність [7]. Альтернативним підходом є дослідження мутацій у панелі ключових генів, які відповідають за різні аспекти перебігу захворювання (TP53, BRCA1, BRCA2, MDR1 тощо), але цей аналіз є дорогим і трудомістким [8-9].

Найбільш близьким аналогом способу, що заявляється, вибраним як найближчий аналог, є визначення рецепторного статусу та проліферативної активності за допомогою імуногістохімічного аналізу [10]. Позитивним у найближчому аналозі є те, що проводиться оцінка проліферативної активності та чутливості до гормонотерапії, що дозволяє оцінити ступінь злоякісності PM3. Недоліками найближчого аналога є те, що:

1. метод імуногістохімічного аналізу білків є напівкількісним;
2. для адекватної оцінки ступеня злоякісності пухлини імуногістохімічне дослідження потребує великої кількості матеріалу (обсягом від $1 \times 1 \text{ см}^2$);
3. використання панелі молекулярних маркерів дозволяє охарактеризувати лише певні ланки патогенезу PM3, що не повністю відображає ступінь злоякісності.

В основу способу, що заявляється, поставлено задачу розробити кількісний спосіб визначення ступеня злоякісності пухлин молочної залози з використанням малої кількості матеріалу, що забезпечить можливість підвищити ефективність діагностики та покращити комплексне лікування хворих на PM3.

Поставлена задача вирішується тим, що спосіб визначення ступеня злоякісності PM3 базується на визначенні рівнів мікроРНК-21 та мікроРНК-let-7d в пухлинній тканині. Зокрема високі рівні мікроРНК-21 і низькі рівні мікроРНК-let-7d, порівняно з нормальною тканиною молочної залози, вказують на більш пізню стадію захворювання, відсутність рецепторів стероїдних гормонів, високу проліферативну активність та наявність регіональних та/або віддалених метастазів.

Причинно-наслідковий зв'язок між сукупністю ознак, що заявляється, та технічним результатом корисної моделі наступний.

Аналіз рівнів мікроРНК-21 та мікроРНК-let-7d дозволяє оцінити ступінь злоякісності PM3 в тканині видаленої пухлини хворих на PM3. Підвищення рівнів мікроРНК-21 (у 3 і більше рази), та зниження мікроРНК-let-7d (у 3-4 рази) у пухлинній тканині порівняно з нормальною тканиною молочної залози корелює з відсутністю у пухлинних клітинах рецепторів естрогену (ER), прогестерону (PR) та епідермального фактора росту людини (Her-2/neu), активною проліферацією та, отже, з вищим ступенем злоякісності.

Схема застосування способу, що заявляється.

У хворих на PM3 за патогістологічно верифікованого діагнозу до початку комплексного лікування проводять визначення рівня мікроРНК-21 та мікроРНК-let-7d у пухлинній тканині за допомогою зворотно-транскрипційної полімеразної ланцюгової реакції (ПЛР) в реальному часі. Тривалість виконання способу, що заявляється, - 2 доби, необхідна кількість пухлинного матеріалу - 500 мг. Якщо у пацієнта виявлено високі рівні мікроРНК-21 та мікроРНК-let-7d, то це свідчить про відсутність ER, PR та Her-2/neu, високу проліферативну активність, наявність метастазів та пізню клінічну стадію.

Приклади практичного застосування способу

Приклад 1. Хвора А., 61 рік (історія хвороби № 4362/13; ПГЗ № 14867-84 від 02.04.2013 р. - інвазивна протокова карцинома лівої молочної залози, T1N0M0, стадія I). За даними імуногістохімічного дослідження визначено наступну експресію гормональних рецепторів: ER(-), PR(-), Her-2/neu (-), Ki-67-50 %, що вказує на високий ступінь злоякисності. Це підтверджується результатами визначення рівнів мікроРНК в пухлинній тканині, а саме: рівень мікроРНК-21 - у 5,3 рази вище, мікроРНК-let-7d - у 4,6 рази нижче порівняно з нормальною тканиною молочної залози.

Технічний результат корисної моделі досягнуто.

Приклад 2. Хвора Х., 76 років (історія хвороби № 4797/13; ПГЗ № 21874-86/13 від 17.05.2013 р. - низькодиференційована карцинома лівої молочної залози, T1N0M0, стадія I). За даними імуногістохімічного дослідження, визначено таку експресію гормональних рецепторів: ER(-), PR (-), Her-2/neu (-), Ki-67-60 %, що вказує на високий ступінь злоякисності. Це підтверджується результатами визначення рівнів мікроРНК в пухлинній тканині, а саме: рівень мікроРНК-21 - у 4,1 рази вище, мікроРНК-let-7d - у 6,2 рази нижче порівняно з нормальною тканиною молочної залози.

Технічний результат корисної моделі досягнуто.

Приклад 3. Хвора А., 63 роки (історія хвороби № 11997/12, ПГЗ № 28298-00 від 18.06.2013 р. - інвазивна долькова карцинома лівої молочної залози, T2N0M0, стадія IIa). За даними імуногістохімічного дослідження, визначено таку експресію гормональних рецепторів: ER 95 %(+++), PR 95 %(+++), Her-2/neu (-), Ki-67-14 %, що вказує на низький ступінь злоякисності. Це підтверджується результатами визначення рівнів мікроРНК в пухлинній тканині, а саме: рівень мікроРНК-21 - у 2,1 рази вище, мікроРНК-let-7d - у 1,9 рази нижче порівняно з нормальною тканиною молочної залози.

Технічний результат корисної моделі досягнуто.

Приклад 4. Хвора С., 60 років (історія хвороби № 4974/13, ПГЗ № 17416-28 від 15.04.2013 р. - інвазивна протокова карцинома лівої молочної залози, T2N0M0, стадія IIa). За даними імуногістохімічного дослідження, визначено таку експресію гормональних рецепторів: ER 90 %(+++), PR 90 %(+++), Her-2/neu (-), Ki-67-10 %, що вказує на низький ступінь злоякисності. Це підтверджується результатами визначення рівнів мікроРНК в пухлинній тканині, а саме: рівень мікроРНК-21 - у 1,3 рази вище, мікроРНК-let-7d - у 2,4 рази нижче порівняно з нормальною тканиною молочної залози.

Технічний результат корисної моделі досягнуто.

Клінічну апробацію способу, що заявляється, проведено у 126 хворих на РМЗ (стадії II-III) на базі Київського міського клінічного онкологічного центру. Запропонований спосіб є точним, високоінформативним, достатньо швидким, потребує малої кількості матеріалу, пов'язаний з невеликими матеріальними витратами для його виконання, що свідчить про можливість широкого використання його в клінічній практиці.

Джерела інформації:

1. Foulkes W.D., Smith I.E., Reis-Filho J.S. Triple-negative breast cancer //N Engl. J. Med. - 2010. - Vol. 363, № 20. - P. 1938-1948.
2. D'Ippolito E., Iorio M. MicroRNAs and triple negative breast cancer //Int. J. Moï. Sci. - 2013. - Vol. 14, № 11. - P. 22202-22220.
3. Lowery A.J., Miller N., McNeil A. et al. MicroRNA signatures predict oestrogen receptor, progesterone receptor and HER2/neu receptor status in breast cancer //Breast Cancer Res. - 2009. - Vol. 11, № 3. - P. 27-45.
4. Wang F., Zheng Z., Guo J. et al. Correlation and quantitation of microRNA aberrant expression in tissues and sera from patients with breast tumor //Gynecol. Oncol. - 2010. - Vol. 119, № 3. - P. 586-593.
5. Volinia S., Galasso M., Sana M.E. et al. Breast cancer signatures for invasiveness and prognosis defined by deep sequencing of microRNA //Proc. Natl Acad. Sci. USA. - 2012. - Vol. 109, № 8. - P. 3024-3029.
6. Lehmann B.D. Bauer J.A., Chen X. et al. Identification of human triple-negative breast cancer subtypes and preclinical models for selection of targeted therapies //J. Clin. Invest. - 2011. - Vol. 121, № 7. - P. 2750-2767.
7. Asaga S., Kuo C, Nguyen T. et al. Direct serum assay for microRNA-21 concentrations in early and advanced breast cancer //Clin. Chem. - 2011. -Vol. 57, №1.- P. 84-91.
8. Kim T., Han W., Kim M. et al. Predictive significance of p53, Ki-67, and Bcl-2 expression for pathologic complete response after neoadjuvant chemotherapy for triple-negative breast cancer //J. Breast Cancer. - 2015. - Vol. 18, № 1. - P. 16-21.

9. Kaboli P J., Rahmat A., Ismail P. MicroRNA-based therapy and breast cancer: a comprehensive review of novel therapeutic strategies from diagnosis to treatment //Pharmacol. Res. - 2015. - Vol. 97. - P. 104-121.
10. Wachter D.L., Fasching P.A., Haerberle L. et al. Prognostic molecular markers and neoadjuvant therapy response in anthracycline-treated breast cancer patients //Arch. Gynecol. Obstet. - 2013. - Vol. 287, № 2. - P. 337-344.

ФОРМУЛА КОРИСНОЇ МОДЕЛІ

- 10 Спосіб визначення ступеня злоякісності пухлин у хворих на рак молочної залози з верифікованим діагнозом, який **відрізняється** тим, що перед проведенням комплексного лікування у хворих визначають рівні мікроРНК-21 та мікроРНК-let-7d в пухлинній тканині у порівнянні з нормальною тканиною молочної залози, і у випадку підвищення рівня мікроРНК-21 та зниження рівня мікроРНК-let-7d у пухлинній тканині роблять висновок про високий ступінь злоякісності пухлини.

Комп'ютерна верстка А. Крижанівський

Державна служба інтелектуальної власності України, вул. Василя Липківського, 45, м. Київ, МСП, 03680, Україна

ДП "Український інститут інтелектуальної власності", вул. Глазунова, 1, м. Київ – 42, 01601