



УКРАЇНА

(19) UA

(11) 115605

(13) U

(51) МПК

G01N 33/50 (2006.01)

G01N 33/53 (2006.01)

ДЕРЖАВНА СЛУЖБА
ІНТЕЛЕКТУАЛЬНОЇ
ВЛАСНОСТІ
УКРАЇНИ

(12) ОПИС ДО ПАТЕНТУ НА КОРИСНУ МОДЕЛЬ

(21) Номер заявки: **u 2016 10230**

(22) Дата подання заявки: **07.10.2016**

(24) Дата, з якої є чинними
права на корисну
модель: **25.04.2017**

(46) Публікація відомостей
про видачу патенту: **25.04.2017, Бюл.№ 8**

(72) Винахідник(и):
Гуда Богдан Богданович (UA),
Пушкар'ов Володимир Михайлович
(UA),
Коваленко Андрій Євгенович (UA),
Журавель Олена Валентинівна (UA),
Пушкар'ов Віктор Володимирович (UA),
Тарашенко Юрій Миколайович (UA),
Ковзун Олена Ігорівна (UA),
Тронько Микола Дмитрович (UA)

(73) Власник(и):
ДЕРЖАВНА УСТАНОВА "ІНСТИТУТ
ЕНДОКРИНОЛОГІЇ ТА ОБМІНУ РЕЧОВИН
ІМ. В.П. КОМІСАРЕНКА НАЦІОНАЛЬНОЇ
АКАДЕМІЇ МЕДИЧНИХ НАУК УКРАЇНИ",
вул. Вишгородська, 69, м. Київ, 04114 (UA)

(74) Представник:
Брагарник Олександр Миколайович,
реєстр. №326

(54) СПОСІБ ВИЗНАЧЕННЯ ЗЛОЯКІСНОСТІ ТА АГРЕСИВНОСТІ ПУХЛИН ЩИТОПОДІБНОЇ ЗАЛОЗИ ЛЮДИНИ

(57) Реферат:

Спосіб визначення злоякісності та агресивності пухлин щитоподібної залози людини полягає у тому, що проводять визначення кількості ядерного антигену проліферуючих клітин (PCNA) у біопсійному матеріалі щитоподібної залози та розраховують співвідношення кількості антигену у нормальній та пухлинній тканинах.

UA 115605 U

Корисна модель належить до галузі медицини, зокрема до способів діагностування злоякісності та агресивності пухлин щитоподібної залози людини.

Проліферативний потенціал ракових клітин - один з найважливіших факторів розвитку пухлини. Для діагностики раку щитоподібної залози (ЩЗ) необхідно розробляти нові підходи, щоб отримати характерні для залози показники проліферації на основі вивчення експресії генів, продукти яких беруть участь у підготовці і здійсненні поділу клітин.

Ядерний антиген проліферуючих клітин (PCNA) є висококонсервативним білком, необхідним для правильної організації компонентів, що беруть участь у процесах реплікації та репарації ДНК. Білки поєднуються в межах міжмономерної сполучної петлі PCNA, і значна частина регуляторних впливів є результатом конкурування за цей стикувальний сайт. Якщо цей сайт PCNA модифікується, наприклад, в ракових клітинах, реплікація ДНК і процес репарації можуть змінюватись. В такому випадку з'являється можливість для таргетної терапії деяких типів раку [1].

Прогноз щодо раку щитовидної залози значно різниться між випадками з наявністю та відсутністю метастазів. Для визначення біомаркерів, корисних для діагностики раку щитовидної залози, та встановлення панелі маркерів для раннього виявлення метастатичних карцином ЩЗ, було проведено ряд досліджень, які, зокрема, показали, що у метастазуючих пухлинах рівень PCNA вище майже в 2 рази, ніж у неметастазуючих [2].

Відомий спосіб діагностування і лікування гіперпроліферативних розладів, який полягає у визначенні рівня експресії та/або локалізації білка, який містить фрагмент, який взаємодіє з PCNA і діагностичним критерієм є аберантний рівень та/або локалізація білка вказує на даний розлад або стан [5]. Недоліком даного винаходу є те, що будь-яке аберантне значення та/або локалізація вважаються діагностичними критеріями.

Отже, вивчення експресії PCNA та розробка методів його блокування є надзвичайно актуальною задачею.

В основу корисної моделі ставилося порівняння експресії PCNA в нормальних тканинах, доброякісних та злоякісних (метастазуючих та неметастазуючих) пухлинах ЩЗ людини.

Дослідження проводилися на біопсійному та післяопераційному матеріалі хворих, одержаному у хірургічному відділенні інституту. Всі пацієнти перед оперативним втручанням підписали інформовану згоду на подальші сучасні методи діагностики та дослідження. Одразу ж після видалення, тканину ЩЗ поміщали на лід і швидко заморожували при -80°C . Тканину гомогенізували в гомогенізаторі TissueLyser II фірми Retsch (Німеччина) у спеціальному буфері з набору для імуноферментного аналізу QIA59, що містив суміш інгібіторів протеаз та фосфатаз, для збереження інтактності та активності білків. Гомогенат зберігали до подальшого використання при -80°C .

Для визначення кількості PCNA використовували набори для імуноферментного аналізу QIA59 фірми Calbiochem (США). Дослідження проводили в триплетах. Концентрацію білка в лізаті визначали за допомогою наборів на основі бісінхонімової кислоти (BCA protein assay kit) фірми Novagen (США). Планшети з PCNA читували на рідері фірми Bio-tek Instruments (США).

Одержані дані опрацьовані статистично з використанням t-критерію Стюдента і представлені у вигляді $M \pm SD$. Вірогідними вважали відміни при $P < 0,05$.

Рівень PCNA у пухлинній тканині папілярних карцином був вищим, ніж у нормальній тканині (див. таблицю). Слід зазначити що в інкапсульованих пухлинах це перевищення становить тільки 85 %, тоді як у неінкапсульованих, метастазуючих пухлинах кількість PCNA вище від норми в середньому більш ніж у 3 рази, а у окремих пухлинах з метастазами у легені - навіть у 4 рази (6,215 Од/мг білка у пухлинах проти 1,539 Од/мг білка в умовно-нормальній тканині).

В тканині багатовузлового зобу рівень експресії PCNA був низьким і ніякої різниці між пухлинною та умовно-нормальною тканинами виявлено не було (див. таблицю).

Інші дослідники відмічали надекспресію PCNA у карциномах ЩЗ порівняно з аденомами [3]. Найвищий рівень експресії PCNA спостерігався в найбільш агресивних типах раку ЩЗ - анапластичній та медулярній карциномах [4]. У диференційованих пухлинах кількість антигена була дещо меншою, але помітно зростала в інвазивних варіантах цих пухлин.

Таким чином, кількість PCNA та співвідношення його кількості у нормальних та у пухлинних тканинах ЩЗ може слугувати діагностичним та прогностичним маркером для оцінки злоякісності та агресивності пухлин ЩЗ.

Спосіб полягає у визначенні кількості PCNA у біопсійному матеріалі ЩЗ та розрахунку співвідношення кількості антигену у нормальній та пухлинній тканинах. Високі значення першого показника (більш, ніж 2 Од/мг білка) свідчать про можливість утворення злоякісних пухлин, високі значення другого (>3) - про агресивність пухлини.

Приклади.

Приклад 1.

Пацієнтка М., 31 рік, історія хвороби № 1365, госпіталізована у хірургічну клініку Інституту ендокринології: 31.03.2014. Діагноз при направленні: лівобічний вузловий зоб, еутиреоїдна форма.

5 Тонкоголова аспіраційна пункційна біопсія проводилась під контролем ехографії голкою 21G: новоутворення, локалізованого у нижній третині лівої частки ЩЗ діаметром 31 мм. Кількість пункцій: 3. Висновок обстеження: вузол лівої частки розміром 31 мм - пухлина переважно мікрофолікулярного будови з певним поліморфізмом і атипією фолікулярного будови.

10 Визначення PCNA методом імуноферментного аналізу: нормальна тканина - 1,443 од/мг білка; пухлина - 3,551 од/мг білка. Висновок: Інкапсульована папілярна карцинома щитоподібної залози рT2NxMx.

Приклад 2.

15 Пацієнтка Л., Вік: 41, історія хвороби № 2931. Госпіталізована у клініку 15.07.2014. Доопераційний діагноз: Папілярна карцинома щитовидної залози з метастазами в лімфатичні вузли шиї.

Під контролем ехографії голкою 21G проведена тонкоголова аспіраційна пункційна біопсія: утворення, локалізованого в середній третині правої частки ЩЗ діаметром 29 мм. Кількість пункцій: 3; лімфовузол локалізований у верхньо-яремній ділянці справа діаметром 7 мм. 20 Кількість пункцій: 1. Висновок обстеження: Папілярна карцинома щитовидної залози з метастазом в л/в.

Визначення PCNA: нормальна тканина - 1,539 од/мг білка; пухлина - 6,215 од/мг білка.

Висновок: Неінкапсульована оксифільноклітинна папілярна карцинома щитовидної залози рT3mN1abMx.

25 Приклад 3.

Пацієнтка Б., 21 рік, історія хвороби № 3825. Госпіталізована в клініку Інституту ендокринології 20.10.2014 року з попереднім діагнозом: Правобічний вузловий зоб. Еутиреоїдна форма.

30 Тонкоголова аспіраційна пункційна біопсія проведена під контролем ехографії голкою 21G утворення, локалізованого в нижній третині правої частки ЩЗ діаметром 40 мм. Кількість пункцій: 4. Висновок обстеження: Вузол правої частки розміром 40 мм - цитологічні ознаки кістозно-дегенеруючого аденоматозного вузла.

Визначення PCNA: нормальна тканина - 1,377 од/мг білка; пухлина - 1,430 од/мг білка.

Висновок: Правобічний вузловий зоб. Еутиреоїдна форма.

35 Як видно з представлених прикладів в нормальній тканині та тканині зобу кількість PCNA приблизно однакова і складає - 1,4 од/мг білка. У інкапсульованій пухлині кількість PCNA більш ніж у 2 рази вище - 3,551 од/мг білка. У агресивних, неінкапсульованих пухлинах з метастазами в лімфовузлах або легені - кількість PCNA вище майже у 4 рази - 6,215 од/мг білка.

Таблиця

Тип пухлини	Пухлина		Нормальна тканина	
	M	SD	M	SD
IPTC (n = 6)	2,67	1,07*	1,44	0,02
NPTC (n = 6)	4,99	1,14*+	1,54	0,63
MNG (n = 3)	1,14	0,20	1,43	0,19

40

В таблиці наведено кількість PCNA в різних типах пухлин щитовидної залози, де позначено: IPTC - папілярна карцинома (інкапсульовані пухлини), NPTC - папілярна карцинома (неінкапсульовані пухлини), MNG - багатовузловий зоб.

M±SD, n=3-6;

45 * - відмінності між умовнонормальною і пухлинною тканинами вірогідні, P<0,05;

+ - відмінності між інкапсульованими та неінкапсульованими пухлинами вірогідні, P<0,05.

Джерела інформації:

1. Smith S. J., Gu L., Phipps E. A. et al. A Peptide mimicking a region in proliferating cell nuclear antigen specific to key protein interactions is cytotoxic to breast cancer // Mol. Pharmacol. - 2015. - 87. 50 - P. 263-276.

2. Liang H.S., Zhong Y.-H., Luo Z.-J. et al. Diagnostic value of 16 cellular tumor markers for metastatic thyroid cancer: an immunohistochemical study // Anticancer Res. - 2011. - 31. - P. 3433-3440.

3. Liang H.S., Zhong Y.-H., Luo Z.-J. et al. Comparative analysis of protein expression in differentiated thyroid tumours: a multicentre study // J. Int. Med. Res. - 2009. - 37. - P. 927-938.
4. Lincoln D. T., Al-Yatama F., Mohammed F. M. A. et.al. Thioredoxin and thioredoxin reductase expression in thyroid cancer depends on tumour aggressiveness // Anticancer Res. - 2010. - 30. - P. 767-776.
5. WO 2009/104001, опубл. 27.08.2009.

ФОРМУЛА КОРИСНОЇ МОДЕЛІ

- 10 1. Спосіб визначення злоякісності та агресивності пухлин щитоподібної залози людини, який **відрізняється** тим, що проводять визначення кількості ядерного антигену проліферуючих клітин (PCNA) у біопсійному матеріалі щитоподібної залози та розраховують співвідношення кількості антигену у нормальній та пухлинній тканинах.
- 15 2. Спосіб за п. 1, який **відрізняється** тим, що при кількості PCNA більше 2 Од/мг білка діагностують можливість утворення злоякісних пухлин.
3. Спосіб за п. 1, який **відрізняється** тим, що при співвідношенні кількості антигену у нормальній та пухлинній тканинах >3 визначають агресивність пухлини.

Комп'ютерна верстка О. Рябко

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