



УКРАЇНА

(19) **UA** (11) **89195** (13) **U**
(51) МПК
G01N 33/48 (2006.01)
G01N 33/554 (2006.01)

ДЕРЖАВНА СЛУЖБА
ІНТЕЛЕКТУАЛЬНОЇ
ВЛАСНОСТІ
УКРАЇНИ

(12) ОПИС ДО ПАТЕНТУ НА КОРИСНУ МОДЕЛЬ

(21) Номер заявки: u 2013 13620	(72) Винахідник(и): Поліщук Людмила Захарівна (UA), Рябцева Ольга Дмитрівна (UA), Лук'янова Наталія Юріївна (UA), Антіпова Світлана Володимирівна (UA), Чехун Василь Федорович (UA)
(22) Дата подання заявки: 25.11.2013	
(24) Дата, з якої є чинними права на корисну модель: 10.04.2014	
(46) Публікація відомостей про видачу патенту: 10.04.2014, Бюл.№ 7	(73) Власник(и): ІНСТИТУТ ЕКСПЕРИМЕНТАЛЬНОЇ ПАТОЛОГІЇ, ОНКОЛОГІЇ І РАДІОБІОЛОГІЇ ІМ. Р.Є. КАВЕЦЬКОГО НАН УКРАЇНИ, вул. Васильківська, 45, м. Київ, 03022 (UA)

(54) СПОСІБ ІНДИВІДУАЛІЗАЦІЇ ПРОГНОЗУВАННЯ ВИЖИВАНOSTІ ХВОРИХ НА СЕРОЗНИЙ РАК ЯЄЧНИКА

(57) Реферат:

Спосіб індивідуалізації прогнозування виживаності хворих на серозний рак яєчника, при якому у хворих на серозний рак яєчника без передопераційної поліхіміотерапії в хірургічно видаленій пухлинній тканині шляхом імуногістохімічного дослідження визначають маркери проліферації Ki-67 і клітинної адгезії CD44s та ступінь цитоморфологічної злоякісності, і при значеннях обох маркерів більше 10 % у поєднанні з високим ступенем цитоморфологічної злоякісності прогноз виживаності оцінюють як несприятливий.

UA 89195 U

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

Серозний рак яєчника (РЯ) є найбільш агресивною за клінічним перебігом пухлиною серед інших новоутворень органів жіночої репродуктивної системи. Він характеризується пізньою діагностикою (III-IV стадії виявляються у 65-70 % хворих), непередбаченим клінічним перебігом, пов'язаним з частими рецидивами пухлинного процесу у межах малого тазу і черевної порожнини [1]. Поліморфізм гістологічної будови, структурної та цитологічної атипії пухлин, різний ступінь диференціювання пухлинних клітин утруднюють оцінку прогнозу виживаності хворих. Від цих властивостей залежить темп росту РЯ, порушення адгезії клітин та їх відрив від основного пухлинного осередку з подальшою широкою їх дисемінацією по черевній порожнині.

Ріст і метастазування пухлин залежать також від молекулярно-біологічних особливостей клітин, що має не лише діагностичне, але й прогностичне значення [2]. Серед молекулярно-біологічних маркерів, які пов'язані з ростом, прогресією і метастазуванням пухлинних клітин, кардинальне значення має проліферація, молекулярним маркером якої є ядерний антиген Ki-67, що належить до класу негістонових білків, його експресія відбувається у G₁, S, G₂, M фазах клітинного циклу. За експресією Ki-67 у ядрах пухлинних клітин, яку детектують за допомогою імуногістохімічного дослідження, судять про проліферативний потенціал пухлин [3]. Останній характеризує темп росту і є вирішальним фактором для вірогідної оцінки злості пухлинного процесу, агресивності його клінічного перебігу і несприятливого прогнозу [3]. Оцінка останнього найбільш коректна у випадках дослідження вказаних біологічних характеристик пухлинного процесу до лікування хворих, зокрема до проведення неoad'ювантної поліхіміотерапії або променевої терапії, оскільки таке лікування впливає на зміни проліферативного потенціалу та експресію інших молекулярних маркерів.

При дослідженні росту і метастазування злості пухлин значна увага приділяється також їх адгезійним властивостям, зокрема молекулі CD44s - багатофункціональному трансмембранному протеїну, що виявляється в епітеліальних та інших тканинах організму і вміщує всі ізоформи CD44. CD44s залучається у міжклітинні зв'язки та у взаємодію клітин з позаклітинним матриксом і бере участь у багатьох сигнальних каскадах, пов'язаних з диференціюванням, проліферацією, міграцією пухлинних клітин [5, 6], що, у свою чергу, позначається на прогнозі пухлинної хвороби.

Отже, молекулярні маркери Ki-67 і CD44 є об'єктивними показниками проліферації і прогресії злості пухлин і пов'язані з прогнозом пухлинної хвороби.

Відомий спосіб прогнозування виживаності хворих на РЯ, що базується на визначенні рівня експресії CD105 та Ki-67, недоліком якого є те, що не враховуються інші біологічні показники злості росту [7]. Також відомий спосіб, в якому прогноз базується на визначенні експресії CD44 з урахуванням ступеня диференціювання пухлини, але без урахування ступеня злості та без урахування рівня експресії інших молекулярних маркерів, що характеризують біологічну агресивність пухлини [8].

Найбільш близьким аналогом, до способу, що заявляється, є спосіб прогнозування виживаності хворих на серозний рак яєчника за допомогою маркера проліферації Ki-67 [4]. Позитивним у найближчого аналога є те, що для оцінки прогнозу виживаності хворих на серозний РЯ досліджується один з важливих показників біологічної активності неопластичного процесу - проліферація пухлинних клітин, яку автори визначають за імуногістохімічною експресією ядерного антигену Ki-67 і за кількістю клітин, експресуючих даний маркер, оцінюють прогноз хвороби. Недоліком прототипу є дослідження лише одного молекулярного маркера без урахування інших критеріїв біологічної активності злості пухлин, у тому числі без урахування цитоморфологічної злості РЯ.

В основу корисної моделі, що заявляється, поставлено задачу розробити спосіб індивідуалізації прогнозування виживаності хворих на серозний РЯ, яким до операції не проводилась поліхіміотерапія, шляхом дослідження у хірургічно видалених пухлинах яєчника біомолекулярних маркерів проліферативної активності Ki-67 та міжклітинної адгезії CD44s з урахуванням ступеня цитоморфологічної злості пухлини.

Поставлена задача вирішується тим, що індивідуальний прогноз виживаності хворих на серозний РЯ без передопераційної поліхіміотерапії будується на підставі імуногістохімічного дослідження у хірургічно видалених пухлинних тканинах комплексу біомолекулярних показників (маркерів проліферації Ki-67 та клітинної адгезії CD44s) залежно від різного ступеня злості пухлин і при кількості клітин, експресуючих Ki-67, більше 10 %, експресії CD44s більше 10 % у кластерах пухлинних клітин по краю інвазивного росту та високому ступені злості визначають незадовільний прогноз.

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

Оцінка наведеним способом індивідуального прогнозу перебігу серозного РЯ дає можливість прогнозувати виживаність хворих з урахуванням комплексу показників біологічної активності пухлин. Показники проліферативної активності та міжклітинної адгезії знаходяться у прямій пропорційній залежності до ступеня злоякісності пухлин та зворотній пропорційній залежності від показників виживаності хворих на РЯ. Висока проліферативна активність та експресія молекул міжклітинної адгезії вище порогового значення (10 %) у пухлинах яєчника високої злоякісності свідчить про несприятливий перебіг пухлинного процесу. Спосіб, що заявляється, забезпечує більш точний статистично вірогідний прогноз виживаності хворих на серозний РЯ, яким не проводилась передопераційна хіміотерапія, що сприятиме корекції лікування хворих у післяопераційному періоді.

Схема застосування способу, що заявляється

Імуногістохімічне визначення експресії біомаркерів та визначення злоякісності РЯ проводять на депарафінованих зрізах пухлинної тканини товщиною 5 мікрон, отриманих після операції у хворих, яким не призначалась передопераційна поліхіміотерапія.

При імуногістохімічному дослідженні як первинні антитіла використовують моноклональні антитіла, специфічні до маркера проліферації Ki-67 (клон MIB, Dako Cytomation, Denmark) і до CD44s (клон DF 1485, Dako Cytomation, Denmark). Для візуалізації результатів імуногістохімічної реакції використовують набір реактивів Envision+ та 3,3-діамінобензидин (Dako Cytomation, Denmark) відповідно до рекомендацій виробника, після чого зрізи дофарбовують гематоксиліном Майєра. Для оцінки імуногістохімічної експресії маркерів застосовують напівкількісний метод. Кількість Ki-67-імунопозитивних клітин аналізують у 1000 пухлинних клітин і виражають у відсотках. Якщо кількість таких клітин перевищує 10 %, РЯ відносять до пухлин з високою проліферативною активністю. Експресію CD44s визначають у кластерах пухлинних клітин по краю інвазивного росту, кількість імунопозитивних CD44s клітин більше 10 % свідчать про підвищені адгезійні властивості пухлинних клітин. Аналіз імуногістохімічних реакцій проводять при збільшеннях світлового мікроскопу 200x, 400x. Для перевірки специфічності взаємодії антитіл з антигенами ставлять контрольні реакції без нанесення антитіл на гістологічні зрізи пухлин.

Для визначення ступеня морфологічної злоякісності депарафінові гістологічні зрізи фарбують гематоксиліном та еозином, після перегляду їх за допомогою світлового мікроскопу при збільшеннях 100-400x вивчають структурну та цитологічну атипію, наявність некрозів, кластерів клітин, розташованих окремо від основного пухлинного осередку по краю інвазії пухлини, і на підставі цього визначають високий ступінь злоякісності пухлин.

Приклади практичного застосування способу

Приклад 1

Хвора К.В.В., 59 років. Клінічний діагноз - рак яєчника II стадії, встановлений 01.02.2006 р. Передопераційна поліхіміотерапія не проводилась. Гістологічне дослідження операційного матеріалу № 2929-33 - серозна папілярна аденокарцинома яєчника. Після хірургічного лікування (циторедуктивна операція) проведена ад'ювантна поліхіміотерапія (6 курсів). Морфологічне та молекулярно-біологічне дослідження операційного матеріалу: серозна папілярна аденокарцинома яєчника високої злоякісності, експресія Ki-67 спостерігається у 40 % клітин, експресія CD44s - у 33 % клітин по краю інвазії пухлини, що вказує на несприятливий прогноз. Хвора померла 08.06.2008 р. Тривалість виживаності становить 28 місяців.

Приклад 2

Хвора Г.О.І., 54 роки. Клінічний діагноз - рак яєчника II стадії, встановлений 01.09.2005 р. Передопераційна поліхіміотерапія не проводилась. Гістологічне дослідження операційного матеріалу № 20260-71 - серозна папілярна аденокарцинома яєчника. Після хірургічного лікування (циторедуктивна операція) проведена ад'ювантна поліхіміотерапія (6 курсів). Морфологічне та молекулярно-біологічне дослідження операційного матеріалу: серозна папілярна аденокарцинома яєчника низької злоякісності, експресія Ki-67 спостерігається у 20 % клітин, експресія CD44s - у 8 % клітин по краю інвазії пухлини, що вказує на сприятливий прогноз. Хвора була жива у 2009 р. Тривалість виживаності становить 45 місяців.

Клінічну апробацію способу, що заявляється, проведено на базі відділення онкогінекології Луганського обласного онкологічного диспансеру та кафедри онкології, радіології та трансфузіології Луганського державного медичного університету. Дослідження проведені у 116 хворих на РЯ I-III стадії.

Перевагою способу, що заявляється, є комплексна оцінка експресії двох молекулярних маркерів, які відображають проліферацію та адгезійні властивості пухлинних клітин - Ki-67 і CD44 залежно від ступеня злоякісності РЯ, що визначається за структурною та цитологічною атипією пухлини. Продemonстровано, що запропонований спосіб характеризується високою

точністю та інформативністю, не потребує великих витрат часу для його виконання, що свідчить про можливість широкого використання його в клінічній практиці.

Джерела інформації:

1. Воробйова Л.І., Турчак О.В., Свінціцький В.С. та ін. Проблема рецидивів гінекологічного раку // Здоровье женщины. - 2009. - № 7 (43), 4.2. - С. 72-75.

2. Лукьянова Н.Ю., Юрченко О.В., Свінціцький В.С., Чехун В.Ф. Прогностичні молекулярні маркери у хворих на рак яєчника // Онкологія. - 2006. - Т. 8, № 3. - С. 241-244.

3. Шацева Т.А., Мухина М.С. Антиген Ki-67 в оценке опухолевой пролиферации. Его структура и функция // Вопр. Онкол. - 2004. - Т.50, № 2. - С. 257-164.

4. Патент № 48766 України на корисну модель. Бучинська Л.Г., Юрченко Н.П., Грінкевич В.М., Глущенко Н.М., Романенко О.В. "Спосіб прогнозування виживаності хворих на серозний рак яєчника за допомогою маркера проліферації Ki-67". Заявл. 24.12.2009, № 200913464, опубл. 25.03.2010, бюл. № 6.

5. Chen H., Hao J., Wang L., Li Y. Coexpression of invasive markers (uPA, CD44) and multiple drug-resistance proteins (MDR1, MRP2) is correlated with epithelial ovarian cancer progression // Brit. J. Cancer.-2009.-101, P. 432-440.

6. Ricardo S., Vieira A.F., Gerhard R., et al. Breast cancer stem cell markers CD44, CD24 and ALDH1: expression distribution within intrinsic molecular subtype // J. Clin. Pathol.-2011. - V.64. - P. 937-946.

7. Liu P., Sun Y.L., Du J., et al. CD105/Ki67 coexpression correlates with tumor progression and poor prognosis in epithelial ovarian cancer // Int J Gynecol Cancer.-2012. - Vol. 22, № 4. - P. 586-592.

8. Sillanpaa S., Anttila M.A., Voutilainen K., Tammi R.H., Tammi M.I., Saarikoski S.V., Kosma V.M. CD44 expression indicates favorable prognosis in epithelial ovarian cancer // Clin. Cancer. Res.-2003. - V.9. - P. 5318-5324.

ФОРМУЛА КОРИСНОЇ МОДЕЛІ

Спосіб індивідуалізації прогнозування виживаності хворих на серозний рак яєчника, при якому у хворих на серозний рак яєчника без передопераційної поліхіміотерапії в хірургічно видаленій пухлинній тканині шляхом імуногістохімічного дослідження визначають маркери проліферації Ki-67 і клітинної адгезії CD44s та ступінь цитоморфологічної злоякісності, і при значеннях обох маркерів більше 10 % у поєднанні з високим ступенем цитоморфологічної злоякісності прогноз виживаності оцінюють як несприятливий.

Комп'ютерна верстка М. Ломалова

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

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