



ДЕРЖАВНА СЛУЖБА
ІНТЕЛЕКТУАЛЬНОЇ
ВЛАСНОСТІ
УКРАЇНИ

УКРАЇНА

(19) **UA**

(11) **96698**

(13) **U**

(51) МПК

G01N 33/50 (2006.01)

(12) ОПИС ДО ПАТЕНТУ НА КОРИСНУ МОДЕЛЬ

(21) Номер заявки: **u 2014 10157**

(22) Дата подання заявки: **15.09.2014**

(24) Дата, з якої є чинними
права на корисну
модель: **10.02.2015**

(46) Публікація відомостей **10.02.2015, Бюл.№ 3**
про видачу патенту:

(72) Винахідник(и):

Сафроненкова Ірина Олексіївна (UA)

(73) Власник(и):

**ДЕРЖАВНА УСТАНОВА "ІНСТИТУТ
ОЧНИХ ХВОРОБ І ТКАНИННОЇ ТЕРАПІЇ ІМ.
В.П. ФІЛАТОВА НАМН УКРАЇНИ",
Французький б-р, 49/51, м. Одеса, 65061
(UA)**

(54) СПОСІБ ПРОГНОЗУВАННЯ РЕЦИДИВУ ЗЛОЯКІСНИХ ЕПІТЕЛІАЛЬНИХ ПУХЛИН ШКІРИ ПОВІК З ВИКОРИСТАННЯМ МОНОКЛОНАЛЬНИХ АНТИТІЛ P53, BCL-2, CD95, IPO38

(57) Реферат:

Спосіб прогнозування рецидиву злоякісних епітеліальних пухлин шкіри повік, за яким проводять імуноцитохімічний аналіз тканини пухлини з використанням моноклональних антитіл P53, BCL-2, CD95, IPO38. Визначають відносні значення їх експресії - * P53, * CD95, * Bcl-2, * IPO38, за розробленою формулою $УО = 7,7 * P53 + 20,3 * CD95 + 64,7 * Bcl-2 + 3,8 * IPO38$. Визначають їх узагальнену скорингову оцінку (УО), і, якщо її значення вище порогового (>76,2 %), прогнозують можливість розвитку рецидиву злоякісних епітеліальних пухлин (ЗЕП) шкіри повік і визначають групу ризику хворих на можливість його розвитку.

UA 96698 U

Корисна модель належить до медицини, конкретно до офтальмоонкології, і може бути використана для підвищення ефективності лікування злоякісних епітеліальних пухлин шкіри повік.

Про ефективність лікування злоякісних епітеліальних пухлин (ЗЕП) шкіри повік зазвичай судять по частоті рецидивів, які можуть бути нерідко більше первинних пухлин і протікають агресивно. Рецидивні пухлини важче піддаються лікуванню, ніж первинні і вимагають більш радикальних підходів до його призначення. Одним із шляхів оптимізації лікування ЗЕП шкіри повік є індивідуальний підхід до вибору тактики впливу на пухлину. Для його здійснення необхідно виявлення факторів прогнозу результату лікування ЗЕП шкіри повік. Суттєву допомогу в цьому може надати вивчення епітеліальних пухлин на імуногістохімічному рівні.

Відомо, що патогенез неоплазій пов'язаний з нездатністю пухлинних клітин піддаватися апоптозу. Одним з механізмів порушення апоптозу є мутації в генах, контролюючих цей процес. Прикладами подібних аномалій є добре вивчені гіперекспресія гена Bcl-2, гальмуючого апоптозу, мутація в гені P53, що перешкоджають функціонуванню кодованого їм білка як індуктора апоптозу і зменшення експресії CD95 [Заридзе Д. Г., Алев Г.И., Альштейн А.Д., Белицкий Г.А., 2004; Колесник А.П., Паламарчук И.Д., Сидоренко А.М., 2006]. В механізмі злоякісної трансформації клітин і в біологічному поведінці вже виниклих пухлин провідним фактором є проліферативна активність. Дослідження особливостей проліферації пухлинних клітин у хворих з різними новоутвореннями використовується для прогнозу перебігу захворювання та корекції схем лікування. Є роботи, результати яких свідчать про наявність кореляції між інтенсивністю проліферативного процесу та перебігом захворювання, а також ефективністю проведеної променевої терапії [Пожариський К.М., Леенман Е.Е., 2000; Barrett T.L., Smith K.J., Hodge J.J. et al., 1997; Rohbach J.M., Stierner R., Mayer A. et al., 2001]. Однак узгодженої думки про прогностичне значення експресії онкобілків P53 і Bcl-2 і антигенів CD95 і IPO38 і поєднанні цих чинників при ЗЕП шкіри повік у доступних інформаційних джерелах авторами не знайдено.

Авторами у доступних джерелах інформації не знайдено опису способу, схожого до запропонованого.

В основу корисної моделі поставлена задача розробки способу прогнозування рецидиву злоякісних епітеліальних пухлин шкіри повік шляхом використання моноклональних антитіл (МкАТ) P53, BCL-2, CD95, IPO38, за рахунок чого стає можливим визначення відносних значень експресії P53, CD95, Bcl-2, IPO38, що дозволить отримати значення скорингової оцінки, та прогнозувати рецидив злоякісних епітеліальних пухлин шкіри повік.

Поставлена задача вирішується тим, що у способі прогнозування рецидиву злоякісних епітеліальних пухлин шкіри повік з використанням МкАТ P53, BCL-2, CD95, IPO38 стосовно корисної моделі проводять імуногістохімічне дослідження тканини пухлин з використанням МкАТ P53, BCL-2, CD95, IPO38, визначають відносні значення їх експресії, за розробленою формулою: $УО = 7,7 * P53 + 20,3 * CD95 + 64,7 * Bcl-2 + 3,8 * IPO38$ визначають їх узагальнену скорингову оцінку (УО), і якщо її значення вище порогового (>76,2 %), прогнозують можливість розвитку рецидиву ЗЕП шкіри повік і визначають групу ризику хворих на можливість його розвитку.

Приймально-наслідкові зв'язки:

Причина	Наслідок
Визначення відносних значень експресії P53, Bcl-2, CD95 і IPO38 у тканинах пухлини у хворих ЗЕП шкіри повік	дозволяє при значеннях сумарної скорингової оцінки відносних значень експресії P53, Bcl-2, CD95 і IPO38 у тканинах пухлини у хворих ЗЕП шкіри повік вище порогової (>76,2 %), можливо прогнозувати розвиток рецидиву ЗЕП шкіри повік і виділити цих хворих у групу ризику можливого розвитку рецидиву пухлини

Пропонований спосіб полягає в тому, що знайдені порогові відносні значення експресії молекулярних маркерів в тканині пухлини, при яких підвищується ймовірність рецидивного перебігу ЗЕО шкіри повік. На основі знайдених порогових значень чотирьох маркерів P53, BCL-2, CD95, IPO38 розроблена ймовірнісна модель прогнозу рецидивів ЗЕП шкіри повік, чутливість якої становить 97,1 %, специфічність - 85,0 %.

Технічний результат, який може бути отриманий при реалізації корисної моделі, складається з того, як що сумарна скорингова оцінка відносних значень експресії P53, Bcl-2, CD95 і IPO38 в тканинах пухлини вище порогової (>76,2 %), то можливо прогнозувати розвиток рецидиву ЗЕП

шкіри повік. Відмінності середніх значень скорингової оцінки у хворих без рецидиву і з рецидивом пухлини - статистично значущі ($p=0,000$).

Практична реалізація цього способу можлива в умовах як стаціонару, так і амбулаторно.

Переваги розробленого способу прогнозування можливості розвитку рецидиву ЗЕП шкіри повік складаються з того, що досягається можливість на ранньому етапі лікування виділити хворих у групу ризику можливого розвитку рецидиву пухлини і вибрати адекватну тактику лікування, що дозволяє зменшити кількість рецидивів пухлини, тим самим підвищити ефективність лікування хворих на ЗЕП шкіри повік і вплинути на кінцевий результат пухлинного процесу.

Опис способу.

Дослідження проведені з МКАТ Cytokeratin (clon MNF116), Bcl-2 (clon 124), p53 (clon DO-7), CD95/Fas (clon XD2) фірми Dako Cytomation, Данія і IPO-38 (ДУ Інститут патології, онкології і радіобіології ім. Р.Є. Кавецького НАМІ України).

Для імуногістологічного дослідження використовувалися парафінові зрізи біопатів ЗЕП шкіри повік. Матеріал фіксували 10 % формаліном. Парафінові зрізи товщиною 4-6 мкм монтувалися на скла, покриті полі-L-лізин або на скла Super Frost Plus (Німеччина) і поміщалися в термостат при температурі 30 °C на добу або при 60 °C - на 30 хвилин (у разі використання скла з адгезивними властивостями). Потім зрізи депарафінізувалися і зневоднювалися. Для оптимального імунопероксидазного фарбування проводилося демаскування антигенів шляхом обробки зрізів 0,06 % розчином трипсину протягом 10 хвилин при температурі 37 °C або розчином цитратного буфера ($pH=6,0$) в мікрохвильовій печі. Всі інкубаційні цикли проводилися у вологій камері при кімнатній температурі. Для зменшення неспецифічного фарбування на зрізи наносився 1 % розчин BSA і проводилася інкубація в оптимальному розведенні з моноклональними антитілами протягом години. Потім зрізи промивалися 3 рази забуференим фізіологічним розчином (PBS) і наносилася кроляча сироватка проти імуноглобулінів миші в надмірному титрі на 1 годину. Після цього, скла зі зрізами знову відмивалися в PBS і інкубувалися з РАР-комплексом впродовж 45 хвилин. Після відмивання РАР-комплексу проводилося визначення активності пероксидази. Для візуалізації комплексу антиген-антитіло використовувався непрямий імунопероксидазний метод, де активність пероксидази визначалася за допомогою 3,3-діамінобензидін тетрахлориду (ДАБ) (Фірма DАСО, Данія). Зрізи тканини пухлини дофарбовували гематоксиліном (2-3 хвилини), поміщали в бальзам і досліджували під світловим мікроскопом. Як негативний контроль використовувався фізіологічний розчин, в якості позитивного - Cytokeratin.

Позитивним результатом вважалося наявність специфічного коричневого фарбування цитоплазми при виявленні експресії Cytokeratin і Bcl-2, ядра - при експресії p53 і IPO38, поверхневої мембрани і цитоплазми - при CD95/Fas. Ступінь експресії МКАТ оцінювали напівкількісним способом, враховуючи частку забарвлених клітин і інтенсивність фарбування. Результати інтерпретували за наступними критеріями: (-) - реакція відсутня ($<10\%$, а для p53 - $<20\%$), (+) - помірна забарвлення незначної частки клітин (11-30 %), (++) - помірне або сильне фарбування 31-50 % клітин, (+++) - сильне фарбування більшості пухлинних клітин ($>51\%$). Кількісну оцінку (%) експресії маркерів по зрізу визначали як відношення імунопозитивних клітин до загальної їх кількості в поле зору мікроскопа $\times 100$. Для кількісної оцінки факторів ризику (відносні значення експресії P53, CD95, Bcl-2, IPO38) пов'язаних з результатом лікування ЗЕП шкіри повік виражених у вигляді бінарного відгуку (рецидиву немає - "0", рецидив є - "1") розраховували відносини шансів (ВШ) по таблиці 2×2 і 95 % довірчий інтервал. Для кількісної оцінки ймовірності розвитку рецидивів була розроблена скорингова шкала, яка являє собою суму значень ВШ всіх наявних у хворих факторів ризику (узагальнена оцінка - УО), де кожен фактор вносить свій зважений вклад у можливість розвитку рецидиву у кожного конкретного хворого:

$$УО = 7,7 * P53 + 20,3 * CD95 + 64,7 * Bcl-2 + 3,8 * IPO38$$
 (* відносні значення експресії P53, CD95, Bcl-2, IPO38, цифрові значення - ВШ, отримані при статистичному дослідженні).

За цією шкалою значення сумарної оцінки коливаються від "0" (відсутність всіх 4 факторів ризику) до "96,5" одиниць (присутні всі 4 фактора ризику). Таким чином, в залежності від поєднання 4-х факторів ризику, скорингова оцінка приймає відповідні значення.

Для розробки тесту прогнозу рецидивів ЗЕП шкіри повік на основі значень скорингової шкали оцінки молекулярних маркерів проведено ROC аналіз з побудовою ROC - кривою. Площа під ROC - кривою склала 0,95 ($p=0,0001$). Максимальне значення чутливості (97,1 %) і специфічності (85 %) тесту відповідає оптимальній точці поділу $>76,2\%$. Таким чином, якщо скорингова оцінка вище порогової ($>76,2\%$), то мається підставу прогнозувати можливість розвитку рецидиву ЗЕП шкіри повік

Таким чином, як видно із проведеного аналізу, кінцева задача корисної моделі забезпечується сукупністю істотних відмінних ознак.

Клінічні випробування проводилися у відділенні мікрохірургічного лікування хворих на новоутворення органа зору ДУ "Інститут очних хвороб і тканинної терапії ім. В.П. Філатова АМН України". Усього під спостереженням перебувало 185 пацієнтів зі ЗЕП шкіри повік.

Клінічні приклади, що відображають класифікаційні принципи скорингової моделі факторів ризику (відносних значень експресії P53, CD95, Bcl-2, IPO38) розвитку рецидивів ЗЕП шкіри повік наведено в наступній таблиці

Хворі	Фактори ризику				Скорингова оцінка	Сроки спостереження (місяці)	Наявність рецидиву
	P53	Bcl-2	CD95	IPO38			
К-ко	+	-	+	+	31,8	4025	ні
Т-ва	-	-		+	68,5	1254	ні
В-к	+	+	-	-	72,4	1176	ні
Л-ой	+	+	-	+	76,2	1370	ні
П-п	-	+	+	+	88,8	1605	є
П-ов		+	+	-	92,7	4488	є
О-ко	+	+	+	-	92,7	1511	є
С-ва	+	+	+	+	96,5	3356	є

Примітка: (+) - наявність фактора ризику; (-) - Відсутність фактора ризику

З даних, представлених в таблиці, видно, що у перших 4-х хворих, у яких скорингова оцінка нижче порогової (<76,2 %), на момент спостереження рецидиву ЗЕП шкіри повік не спостерігалось. У інших чотирьох пацієнтів зі скорингової оцінкою вище порогової (>76,2 %) виявлено рецидиви пухлини. Терміни спостереження за представленими пацієнтами склали від 3,5 до 12 років (M=6,4).

Таким чином, проведене дослідження дозволило поліпшити ефективність лікування хворих на ЗЕП шкіри повік.

ФОРМУЛА КОРИСНОЇ МОДЕЛІ

Спосіб прогнозування рецидиву злоякісних епітеліальних пухлин шкіри повік, за яким проводять імуноцитохімічний аналіз тканини пухлини з використанням моноклональних антитіл P53, BCL-2, CD95, IPO38, визначають відносні значення їх експресії - * P53, * CD95, * Bcl-2, * IPO38, за розробленою формулою $УО = 7,7 * P53 + 20,3 * CD95 + 64,7 * Bcl-2 + 3,8 * IPO38$, визначають їх узагальнену скорингову оцінку (УО), і, якщо її значення вище порогового (>76,2 %), прогнозують можливість розвитку рецидиву злоякісних епітеліальних пухлин (ЗЕП) шкіри повік і визначають групу ризику хворих на можливість його розвитку.

Комп'ютерна верстка І. Мироненко

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