



УКРАЇНА

(19) **UA** (11) **99229** (13) **C2**

(51) МПК

**A61B 10/02** (2006.01)

**G01N 33/52** (2006.01)

ДЕРЖАВНА СЛУЖБА  
ІНТЕЛЕКТУАЛЬНОЇ  
ВЛАСНОСТІ  
УКРАЇНИ

**(12) ОПИС ДО ПАТЕНТУ НА ВІНАХІД**

<b>(21)</b> Номер заявки: <b>а 2011 08472</b>	<b>(72)</b> Винахідник(и): <b>Бурлака Анатолій Павлович (UA), Лукін Сергій Миколайович (UA), Сидорик Євген Петрович (UA)</b>
<b>(22)</b> Дата подання заявки: <b>06.07.2011</b>	
<b>(24)</b> Дата, з якої є чинними права на винахід: <b>25.07.2012</b>	
<b>(41)</b> Публікація відомостей про заявку: <b>10.04.2012, Бюл.№ 7</b>	<b>(73)</b> Власник(и): <b>ІНСТИТУТ ЕКСПЕРИМЕНТАЛЬНОЇ ПАТОЛОГІЇ, ОНКОЛОГІЇ І РАДІОБІОЛОГІЇ ІМ. Р.Є. КАВЕЦЬКОГО НАН УКРАЇНИ, вул. Васильківська, 45, м. Київ, 03022 (UA)</b>
<b>(46)</b> Публікація відомостей про видачу патенту: <b>25.07.2012, Бюл.№ 14</b>	<b>(56)</b> Перелік документів, взятих до уваги експертизою: UA 53338 A 15.01.2003 UA 67635 A 15.06.2004 Мірошніченко М. Радикали кисню та оксиду азоту при канцерогенезі. - Вісн.НАН України, 2006, №10. - С. 63-65.

**(54) СПОСІБ ПРОГНОЗУВАННЯ ПЕРЕБІГУ ЗАХВОРЮВАННЯ У ХВОРИХ НА РАК МОЛОЧНОЇ ЗАЛОЗИ**

**(57) Реферат:**

Винахід належить до медицини, зокрема клінічної онкології, та стосується способу прогнозування перебігу захворювання у хворих на рак молочної залози за рахунок визначення швидкості генерування супероксидних радикалів та рівня маркеру окисного пошкодження ДНК - 8-оксогуаніну (8-охоG).

UA 99229 C2



Винахід належить до галузі медицини, зокрема до клінічної онкології.

Проблема прогнозування перебігу зл�якісних пухлин, зокрема раку молочних залоз (РМЗ), є актуальною, тому що оцінка подальшого перебігу захворювання та своєчасне корегування лікувального процесу продовжує життя хворих.

Сьогодні в клінічній практиці використовується низка прогностичних показників, але досі не розроблено адекватний маркер, який би характеризував стан пухлини та організму в процесі перебігу пухлинного процесу. Всі існуючі прогностичні показники та маркери, що використовуються в онкологічній клініці, характеризують лише наявність чи відсутність пухлинних клітин.

Відомі способи діагностики захворювання у хворих на РМЗ базуються на ультразвуковій діагностиці, рентгенодіагностиці (мамографії), цитологічних дослідженнях, магнітно-резонансній томографії (МРТ) та, як на додатковому діагностичному тесті, пухлинних маркерів [Молочная железа. Рак и предраковые заболевания /Под ред. В. И. Тарутинова - Киев: Полиграфист, 2006. С. 142-178]. Для прогнозування перебігу захворювання у хворих на РМЗ відомі способи діагностики потрібно використовувати неодноразово на протязі певного часу.

Спільними недоліками відомих способів прогнозу захворювання у хворих на РМЗ є:

1. Фіксується процес після формування пухлин;
2. Мікропухлини та передракові стани не виявляються;
3. Недостатня достовірність діагнозу та прогнозу перебігу захворювання;
4. Недостатня дослідженість пухлинних маркерів, їх відсутність у клінічній діагностиці, складність інтерпретації даних одночасного аналізу багатьох прогностичних факторів;
5. Висока вартість обладнання та обстеження.

Найбільш близьким аналогом способу, що заявляється, вибраним як прототип, є спосіб прогнозування перебігу захворювання у хворих на РМЗ шляхом визначення в біопсійному або післяопераційному матеріалі онкогена HER-2/neu [Huang H. J. Association between tumor characteristics and HER-2/neu by immunohistochemistry in 1362 women with primary operable breast cancer // Clin. Pathol. - 2005. - Vol. 58, № 6. - P 611-616]. Використання імуно-гістохімічного (ІГХ) забарвлення пухлинних тканин на білок HER-2/neu з наступною оцінкою ампліфікації гена *c-erbB-2* методом флуоресцентної гібридизації *in situ* є наразі найбільш адекватним методом оцінки чутливості пухлин молочної залози.

Недоліками прототипу є:

1. Фіксується лише наявний стан пухлинного процесу;
2. Маркер HER-2/neu є редоксзалежним і відображає окисне пошкодження лише одного сигнального шляху при розвитку пухлин молочної залози.

В основу винаходу поставлено задачу удосконалення способу прогнозування перебігу захворювання у хворих на РМЗ шляхом визначення швидкості генерування супероксидних радикалів клітинами пухлини в біопсійному або післяопераційному матеріалі та рівнів окисного пошкодження ДНК у добовій сечі, за якими оцінюють фундаментальні зрушення в організмі хворих та формують прогноз перебігу захворювання.

Поставлена задача вирішується тим, що спосіб прогнозування перебігу захворювання у хворих на рак молочної залози базується на вивченні біопсійного та післяопераційного матеріалу, який перетворюють на гомогенат і в ньому визначають швидкість генерування супероксидних радикалів, а в добовій сечі визначають рівень маркеру окисного пошкодження ДНК - у нмолях 8-оксогуаніну (8-охоG), і при значеннях швидкості генерування супероксидних радикалів клітинами пухлини  $< 3,0$  нМоль/хв. • г сирої тканини і рівня утворення 8-охоG в організмі хворого  $< 5,0$  нМ/доба • кг маси тіла прогноз перебігу захворювання оцінюють як позитивний, а при значеннях  $\geq 3,0$  для пухлини і  $\geq 5,0$  для сечі - як негативний.

Оцінка наведеним способом прогнозу перебігу захворювання у хворих на РМЗ дає можливість відслідковувати в кількісному вимірі в динаміці лікування стан систем генерування супероксидних радикалів та їх вплив на перебіг захворювання. Оцінка швидкості окисного пошкодження ДНК та активності систем генерування супероксидних радикалів у тканині пухлини в онкологічних хворих є сучасним інтегральним показником, який дає можливість визначити основну характерну ознаку зл�якісної пухлини, а саме пухлинну прогресію, зокрема метастазування, та резистентність до цитостатичних агентів, що є основною перевагою запропонованого методу. Показники рівня швидкості генерування супероксидних радикалів клітинами пухлини та окисного пошкодження ДНК в організмі хворого знаходяться у прямо пропорційній залежності між метастатичним потенціалом пухлини, її зл�якісністю та визначають напрямок прогресування і цим визначають прогноз перебігу захворювання. Високі рівні супероксидних радикалів в організмі та, зокрема, у зл�якісній пухлині відображають рівень клітинної гіпоксії та рівень деградації міжклітинного матриксу в тканинах організму, ступінь

злоякісності пухлин та її метастатичний потенціал, напрямок прогресування та резистентність до хіміотерапії.

Спосіб, що заявляється, забезпечує точний прогноз перебігу захворювання у хворих на РМЗ, що дасть можливість покращити лікування цього надзвичайно складного контингенту хворих.

Спосіб здійснюється наступним чином.

Під час операції 250 мг пухлинної тканини (або біопсійний матеріал) швидко (15 с) гомогенізують на льоду в скляному гомогенізаторі з додаванням 2,0 мл фосфатного буфера з  $\text{pH} = 7,4$ . Отриманий гомогенат пухлини фільтрують через два шари марлі, додають 20  $\mu\text{Моль}$  спінового уловлювача 5,5-диметил-1-пірролін N-оксид (DMPO) (виробництва фірми Sigma) і реєструють швидкість генерування супероксидних радикалів на радіоспектрометрі електронного парамагнітного резонансу (ЕПР) при кімнатній температурі.

Одночасно у хворого досліджують рівень окисного пошкодження ДНК, визначаючи маркер 8-охоG в добовій сечі. Для цього 20 мл добової сечі фільтрують через фільтрувальний папір та пропускають через колонку для твердофазної екстракції 8-охоG. Визначення кількісного рівня окисного пошкодження ДНК в організмі хворого проводиться методом оптичної спектрофотометрії на спектрофотометрі (наприклад, марки СФ-46) з реєстрацією поглинання при 250, 260, 280 і 293 нм. Рівень утворення 8-охоG в клітинах організму визначається за формулою:

$$R_{\text{ex}} = \frac{V \cdot \sum (C_1 \cdot V_1)}{V_{\text{appl}} \cdot W} \text{ (нМ / доба} \cdot \text{кг маси тіла)} \quad (1)$$

де  $V$  - загальний об'єм сечі, мл;  $V_1$  - об'єм сечі, з якого виділяли оксидномодифікований гуанін, мл;  $V_{\text{appl}}$  - об'єм сечі, який аналізується на колонці, мл;  $W$  - маса тіла, г;  $C_1$  - концентрація 8-охоG.

Межа розподілу між умовно "сприятливим" та "несприятливим" рівнями швидкості генерування супероксидних радикалів в пухлині складає 3,0 нМоль/хв. • г сирової тканини (діапазон можливих значень 1,2-8,0) та 8-охоG в сечі 5,0 нМ/доба • кг маси тіла (діапазон можливих значень 3,8-16,0) для всіх обстежених хворих, що відповідає медіані для кожного вищевказаного співвідношення. Встановлено, що для групи хворих із значеннями рівнів генерування супероксидних радикалів в пухлині  $< 3,0$  і 8-охоG  $< 5,0$  в сечі прогноз перебігу захворювання є позитивний, а із значеннями  $\geq 3,0$  для пухлини і  $\geq 5,0$  для сечі - негативний.

Приклади практичного застосування.

1. Хвора Т. (історія хвороби № 2384, АК № 4849/04п, ПГЗ № 8968 - аденокарцинома молочної залози,  $T_2N_0M_0$  G2, стадія II), якій виконана операція з видалення пухлини. Рівень швидкості генерування супероксидних радикалів клітинами пухлини склав 1,25 нМоль/хв. • г сирової тканини. Рівень утворення 8-оксогуаніну в клітинах пухлини, що визначали по формулі (1), дорівнював 1,95 нМ/доба • г сирової тканини. За таких умов тривалість життя хворої склала 248 тижнів.

2. Хвора З. (історія хвороби № 8073, АК № 584604, ПГЗ № 17062 - аденокарцинома молочної залози,  $T_3N_2M_0$ , G2, стадія IIIB), якій виконана операція з видалення пухлини. Рівень швидкості генерування супероксидних радикалів клітинами пухлини склав 5,4 нМоль/хв. • г сирової тканини. Рівень швидкості утворення маркера окисного пошкодження ДНК у цієї хворої склав 13,6 нМ/доба • кг маси тіла. За таких умов тривалість життя хворої склала 48 тижнів.

3. Хвора М. (історія хвороби № 3129, АК № 344613, ПГЗ № 6786 - аденокарцинома молочної залози,  $T_2N_0M_0$ , G2, стадія II), якій виконана операція з видалення пухлини. Рівень швидкості генерування супероксидних радикалів клітинами пухлини склав 2,8 нМоль/хв. • г сирової тканини. Рівень швидкості утворення маркера окисного пошкодження ДНК у цієї хворої склав 4,6 нМ/доба • кг маси тіла. За таких умов тривалість життя хворої склала 139 тижнів.

Клінічну апробацію способу проведено на базі кафедри онкології Національної медичної академії післядипломної освіти ім. П. Л. Шупика. Дослідження проведені у 18 хворих на РМЗ. Продemonстровано, що спосіб точний, високоінформативний, пов'язаний з невеликими матеріальними витратами для його виконання, що свідчить про можливість широкого використання його в клінічній практиці.

#### ФОРМУЛА ВИНАХОДУ

Спосіб прогнозування перебігу захворювання у хворих на рак молочної залози, який відрізняється тим, що біопсійний або післяопераційний матеріал перетворюють на гомогенат,

- 5 в ньому визначають швидкість генерування супероксидних радикалів, а в добовій сечі визначають рівень окисного пошкодження ДНК (8-охоG), і при значеннях швидкості генерування супероксидних радикалів клітинами пухлини  $< 3,0 \text{ нМоль/хв} \cdot \text{г сирої тканини}$  і рівня утворення 8-охоG в організмі хворого  $< 5,0 \text{ нМ/доба} \cdot \text{кг маси тіла}$  прогноз перебігу захворювання оцінюють як сприятливий, а при значеннях  $\geq 3,0 \text{ нМоль/хв} \cdot \text{г сирої тканини}$  для пухлини і  $\geq 5,0 \text{ нМ/доба} \cdot \text{кг маси тіла}$  для сечі - як несприятливий.

---

Комп'ютерна верстка Д. Шеверун

---

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