



УКРАЇНА

(19) UA

(11) 110099

(13) U

(51) МПК

A61B 10/02 (2006.01)

G01N 33/531 (2006.01)

ДЕРЖАВНА СЛУЖБА  
ІНТЕЛЕКТУАЛЬНОЇ  
ВЛАСНОСТІ  
УКРАЇНИ**(12) ОПИС ДО ПАТЕНТУ НА КОРИСНУ МОДЕЛЬ**

<b>(21)</b> Номер заявки: <b>u 2016 02967</b>	<b>(72)</b> Винахідник(и): <b>Ковтуненко Олександр Васильович (UA),</b> <b>Шпонька Ігор Станіславович (UA),</b> <b>Бакаєв Анатолій Анатолійович (UA),</b> <b>Тимчук Сергій Миколайович (UA)</b>
<b>(22)</b> Дата подання заявки: <b>23.03.2016</b>	
<b>(24)</b> Дата, з якої є чинними права на корисну модель: <b>26.09.2016</b>	
<b>(46)</b> Публікація відомостей про видачу патенту: <b>26.09.2016, Бюл.№ 18</b>	<b>(73)</b> Власник(и): <b>Ковтуненко Олександр Васильович,</b> Донецьке шосе, 1, кв. 211, м. Дніпропетровськ, 49080 (UA), <b>Шпонька Ігор Станіславович,</b> вул. Мандриківська, 143, кв. 153, м. Дніпропетровськ, 49044 (UA), <b>Бакаєв Анатолій Анатолійович,</b> вул. Фрунзе, 12, кв. 83, смт Ювілейне, 52005 (UA), <b>Тимчук Сергій Миколайович,</b> вул. Кожем'яки, 9, кв. 85, м. Дніпропетровськ, 49083 (UA)
	<b>(74)</b> Представник: <b>Білозуб Володимир Володимирович,</b> реєстр. №280

**(54) СПОСІБ ПРОГНОЗУВАННЯ КЛІНІЧНОГО ПЕРЕБІГУ ПЛОСКОКЛІТИННОГО РАКУ ВЕРХНЬОЩЕЛЕПНОЇ ПАЗУХИ****(57) Реферат:**

Спосіб прогнозування клінічного перебігу плоскоклітинного раку верхньощелепної пазухи що включає біопсію тканин пухлини, фіксування зразків у нейтральному формаліні, парафіні, виготовлення з них гістологічних препаратів, забарвлення гематоксиліном, еозином, формування зрізів, імуногістохімічне дослідження, з використанням моноклонального антитіла Ki-67, як маркера проліферативної активності, мікроскопію та оцінку, причому додатково залучають поліклональне антитіло ММП-9 як показник інвазії тканин, інгібітор тканинної інвазії TIMP-1, при мікроскопії спостерігають реакцію маркерів на 1000 сусідніх пухлинних клітин при 200<sup>x</sup> збільшенні мікроскопа, під час оцінки визначають низьку проліферативну активність досліджуваних клітин, якщо реакція на Ki-67 менше у 330-340 досліджуваних клітин, або високу проліферативну активність досліджуваних клітин, якщо реакція на Ki-67 більше у 330-340 досліджуваних клітин, якщо виявляють високу проліферативну активність, то прогнозують ріст пухлинного ґенезу тканинного інгібітора TIMP-1, якщо виявляють підвищення експресії плоских цитокератинів, прогнозують розвиток Н М W-форми раку, проводять напівкількісний аналіз цифрових мікрофотографій, оцінюють інтенсивність забарвлення досліджуваних клітин, як цитоплазматичну реакцію поліклонального антитіла ММП-9, за допомогою балів оцінної шкали, та прогнозують негативне, слабе, помірне або високе метастазування пухлин, якщо оцінка дорівнює 0-20, 21-50, 51-100 або ≥101 бала відповідно.

UA 110099 U



Корисна модель належить до діагностики, зокрема до вимірів з прогностичною ціллю, та може бути використаною в медицині, наприклад в пато-, онко-, отоларингології в доклінічних дослідженнях прогностично сприятливих чи несприятливих імунотипів плоскоклітинних раків, при агресії метастазів у регіональних лімфатичних вузлах, їх підвищеній чутливості до променевої та хімічної терапії, шляхом проведення реакцій пухлинних тканин із застосовуваними маркерами.

Відомий спосіб прогнозування виникнення рецидиву і метастазів у хворих на рак гортані, що включає забір проби крові перед початком лікування, виділення плазми, її дослідження, визначення загальної протеолітичної та еластолітичної активності, концентрації  $\alpha 2$ -макроглобуліну, як інгібітора протеїнази і фібриногену, оцінку та прогнозування можливості рецидивування або метастазування злоякісних новоутворень гортані у післяопераційному періоді, за перевищенням показниками протеолізу та фібриногену нормативних значень, або зниженням рівня  $\alpha 2$ -макроглобуліну [1]. Недоліками аналога є недостатня інформативність та об'єктивність прогнозу, з-поміж невідповідності плазми крові та замаскованих ракових клітин стану досліджуваних органів і систем, що стримує ефективність хіміопроменевої терапії на ранніх етапах лікування, особливо при неоперабельних формах раку.

Більш наближеним до дійсної корисної моделі є спосіб прогнозування клінічного перебігу раку гортані, що включає біопсію тканин пухлини, фіксування зразків у нейтральному формаліні, парафіні, виготовлення з них гістологічних препаратів, забарвлення гематоксиліном, еозином, формування зрізів, імуногістохімічне дослідження, з використанням моноклонального антитіла Ki-67, як маркера проліферативної активності, мікроскопію та оцінку, згідно з яким, під час імуногістохімічного дослідження визначають загальну кількість клітин з профарбованими і непрофарбованими ядрами, рівні експресії онкосупресорних генів p53, як ключових регуляторів апоптозу та контролерів цілісності геном, bcl-2, як регулятора клітинної смерті та блокатора апоптозу, цитокератинів AE1/AE3, 19, як маркерів епітеліального диференціювання клітин, а під час оцінки, по реакції онкосупресорних генів p53 і/або bcl-2 на активацію моноклональними антитілами Ki-67 і/або на цитоплазматичне фарбування, визначають онкологічний статус пухлини, по експресії онкосупресорних генів p53 і bcl-2 встановлюють імуногістохімічний статус, по реакції ядер пухлинних клітин на Ki-67 виявляють проліферативну активність, за підвищенням експресії цитокератинів AE1/AE3, 19, знаходять форми раку, у залежності від розмірів, інтенсивності збільшення, частоти метастазування, рецидиву пухлин і рівня інвазії, виявляють ступені гістологічного диференціювання раку, при виявленні порушень функцій онкосупресорних генів p53 і/або 2-bcl2 і реакції понад 10 % ядер пухлинних клітин на моноклональні антитіла Ki-67 і/або на цитоплазматичне фарбування, кваліфікують онкологічний статус пухлини позитивним, імуногістохімічний - негативним, якщо експресія онкосупресорних генів p53 і /або bcl-2 перевищує норму, а проліферативну активність - високою, якщо понад 30 % ядер пухлинних клітин реагує на їх активацію моноклональним антитілом Ki-67, встановлюють високодиференційовану форму раку, якщо спостерігають підвищення експресії цитокератинів AE1/AE3 в клітині та пригнічення стану проміжних мікротрубочок і філаментів, встановлюють низькодиференційовану форму раку, якщо спостерігають підвищення експресії цитокератину CK19 в клітині та пригнічення простих епітеліїв, виявляють ступені гістологічного диференціювання раку, за рівнями і спектром експресії фракцій цитокератинів AE1/AE3 і 19 у клітині, та прогнозують несприятливий перебіг процесу, за погіршенням будь-яких 2 параметрів, щонайменше у комбінації з показниками проліферативної активності онкологічного або імуногістохімічного статусів, а з урахуванням форм і ступенів гістологічного диференціювання визначають морфологічний варіант раку [2]. При використанні прототип покращує об'єктивність прогнозу завдяки відбору й дослідженню тканин, відібраних з пухлинної ділянки, розширює інформативність прогностичних параметрів за рахунок збільшення інтенсивності демаскування ракових клітин та їх інтерпретацію. Натомість об'єктивність прогностичного результату залишається недостатньою. Це пояснюється тим, що властивості оцінних критеріїв розраховані на оцінку та прогнозування раку гортані, позбавлені оцінки стану ендотелію судин, параметрів тканинної інвазії, міжклітинної адгезії, інфекції, викликаной ВПЛ, і відомостей відносно впливу її на експресію онкогенів супресорів.

В основу корисної моделі поставлена задача створити спосіб прогнозування клінічного перебігу плоскоклітинного раку верхньощелепної пазухи, застосування котрого сприяло б збільшенню об'єктивності шляхом імуногістохімічного дослідження молекулярних властивостей пухлин верхньощелепної пазухи та інвазії кісткових тканин.

Поставлена задача вирішується тим, що при використанні у відомому способі прогнозування клінічного перебігу плоскоклітинного раку верхньощелепної пазухи, що включає біопсію тканин пухлини, фіксування зразків у нейтральному формаліні, парафіні, виготовлення з них

гістологічних препаратів, забарвлення гематоксиліном, еозином, формування зрізів, імуногістохімічне дослідження, з використанням моноклонального антитіла Ki-67, як маркера проліферативної активності, мікроскопію та оцінку, відповідно до корисної моделі, додатково залучають поліклональне антитіло ММП-9 як показник інвазії тканин, інгібітор тканинної інвазії TIMP-1, при мікроскопії спостерігають реакцію маркерів на 1000 сусідніх пухлинних клітин при 200<sup>x</sup> збільшенні мікроскопа, під час оцінки визначають низьку проліферативну активність досліджуваних клітин, якщо реакція на Ki-67 менше у 330-340 досліджуваних клітин, або високу проліферативну активність досліджуваних клітин, якщо реакція на Ki-67 більше у 330-340 досліджуваних клітин, якщо виявляють високу проліферативну активність, то прогнозують ріст пухлинного ґенезу тканинного інгібітора TIMP-1, якщо виявляють підвищення експресії плоских цитокератинів, прогнозують розвиток NMW-форми раку, проводять напівкількісний аналіз цифрових мікрофотографій, оцінюють інтенсивність забарвлення досліджуваних клітин, як цитоплазматичну реакцію поліклонального антитіла ММП-9, за допомогою балів оцінної шкали, та прогнозують негативне, слабке, помірне або високе метастазування пухлин, якщо оцінка дорівнює 0-20, 21-50, 51-100 або  $\geq 101$  бала, відповідно.

Причинно-наслідковий зв'язок між сукупністю ознак, з корисною моделлю, та технічним результатом полягає в наступному.

Поліклональне антитіло ММП-9, як показник інвазії тканин, дозволяє оцінити імуногістохімічним шляхом ймовірність метастазування онкоклітин в регіональні лімфатичні вузли та ефективність хіміотерапії. Дослідження матричних металопротеїназ виявляє рівень протеолітичної активності пухлини, ступінь деградації позаклітинного матриксу з протеогліканів, глікопротеїнів та філаментів. Оцінка ґрунтується на тому, що підвищення протеолітичної активності при активації ММП-9 (колагенази IV типу) надає малігнізованим клітинам інвазивні властивості, де позитивні пухлини визначають показання до терапевтичного використання інгібітора матричних металопротеїназ, наприклад маристомату.

Мікроскопічне дослідження реакції маркерів на 1000 сусідніх пухлинних клітин, при 200<sup>x</sup> збільшенні мікроскопа, допускає візуалізацію процесу метастазування, з можливістю аналізу інтенсивності забарвлення досліджуваних клітин. Оцінка інтенсивності забарвлення шляхом напівкількісного аналізу, де в одному і тому же зрізі відбиваються рівні забарвлення нормальних епітеліальних і малігнізованих клітин, як і різниці між ними, збільшує об'єктивність відбиття інтенсивності імуногістохімічної реакції за рахунок виключення впливу лабораторного процесу на результат дослідження. Поряд із цим, застосування балів оцінної шкали для аналізу інтенсивності забарвлення та числа пухлинних клітин, які зреагували на маркери, сприяє визначенню різних етапів канцерогенезу та клінічного перебігу більш детально, тобто збільшує інформативність, інтерпретацію більшої кількості вихідних параметрів, а відтак перевершує об'єктивність прогнозу, з можливістю кваліфікації як проліферативної активності, так і тканинної інвазії.

Інтенсивність цитоплазматичної реакції на поліклональне антитіло ММП-9 відбиває здатність до тканинної інвазії, що встановлюється напівкількісним аналізом цифрових мікрофотографій за допомогою шкали, визначає негативне, слабке, помірне або високе метастазування пухлин, якщо оцінка становить 0-20, 21-50, 51-100 або  $\geq 101$  бала, відповідно.

Визначення проліферативної активності досліджуваних клітин розширює уявлення щодо пухлинного ґенезу тканинного інгібітора TIMP-1 сприяє визначенню розвитку NMW-форми раку, за підвищенням експресії плоских цитокератинів, що збільшує об'єктивність прогнозу також. Основні ділянки експресії TIMP-1, як тканевого інгібітора металопротеїназ, зосереджені в кістковій тканині, де він секретується культивованими лініями пухлинних кліток і пухлинами *in vivo*, що дозволяє використати його як індикатор високометастазуючих і швидко прогресуючих пухлин. Механізм даного інгібітора полягає у зв'язуванні з каталітичним сайтом активного ферменту матричних металопротеїназ і карбоксильним кінцем його проферменту, з перешкодою активностям, і в демонстрації балансу позаклітинного волокнисто-молекулярного матриксу тканин.

Проліферативну активність досліджуваних клітин кваліфікують низькою або високою за реакцією на моноклональні антитіла Ki-67 менш чи більше 330-340 клітин, відповідно.

Тож, імуногістохімічне дослідження молекулярних властивостей пухлин верхньощелепної пазухи та інвазії кісткових тканин, що ґрунтується на застосування сукупності ознак запропонованого рішення задачі, спрямоване на збільшення об'єктивності прогнозу (на 65-70 %) та розширює уявлення щодо молекулярних властивостей плоскоклітинних раків, щонайменше верхньощелепної та придаткових пазух.

Додаткові переваги запропонованої корисної моделі над прототипом полягають в можливості визначення прогностично сприятливих і несприятливих імунофенотипів, переважно

плоскоклітинних раків верхньощелепної пазухи. Так, при збільшенні експресії ММП-9 констатується висока вірогідність метастазування, що визначає наявність високоагресивного перебігу раку, інформує про резистентність організму до медикаментозного та променевого лікування, за виключенням таргетної терапії, заснованої, здебільшого, на впливі герцептину.

5 Таким чином, сукупність ознак заявленої корисної моделі є "суттєвою", бо знаходиться у причинно-наслідковому зв'язку з досягненням вищезазначеного технічного результату, і "новою", оскільки за досліджуванним рівнем техніки характеризує обсяг запропонованого технічного рішення невідомим, поширюючись на усі випадки його багаторазового використання.

Відомості, які підтверджують можливість відтворення способу прогнозування клінічного перебігу плоскоклітинного раку верхньощелепної пазухи, з можливістю перевернення вищезазначеного технічного результату, полягають в наступному.

10 Для здійснення способу прогнозування клінічного перебігу плоскоклітинного раку верхньощелепної пазухи залучають ротаційний мікроскоп "Microm" фірми "Microm International GmbH" (Німеччина), мікроскоп DLME фірми "Leica" (Німеччина), моноклональне антитіло Ki-67 (клон SP6), поліклональне антитіло MMP-9 (92 kDa Collagenase IV) виробництва "Lab Vision Corporation" (Великобританія) та інгібітор тканинної інвазії TIMP-1.

Суть. Для прогнозування клінічного перебігу плоскоклітинного раку за умов запропонованого способу під час риноскопії висікають тканини пухлини. Відібрані зразки фіксують у нейтральному забуференому 10 % формаліні й заливають парафіном. Надалі виготовляють гістологічні препарати, які забарвлюють гематоксиліном, еозином і формують зрізи. Для імуногістохімічного дослідження залучають моноклональні антитіла Ki-67, поліклональні MMP-9 та інгібітор тканинної інвазії TIMP-1. При імуногістохімічному дослідженні відтворюють реакцію зразків на Ki-67, MMP-9 та TIMP-1. При мікроскопії спостерігають реакцію маркерів на 1000 сусідніх пухлинних клітин при 200<sup>x</sup> збільшенні мікроскопа. Оцінюючи результат, визначають низьку проліферативну активність досліджуваних клітин, якщо реакція на Ki-67 менше у 330-340 досліджуваних клітин, або високу проліферативну активність досліджуваних клітин, якщо реакція на Ki-67 більше у 330-340 досліджуваних клітин. Якщо виявляють високу проліферативну активність, то прогнозують ріст пухлинного ґенезу тканинного інгібітора TIMP-1, а за підвищенням експресії плоских цитокератинів - розвиток HMW-форми раку. Проводять напівкількісний аналіз цифрових мікрофотографій, оцінюють інтенсивність забарвлення досліджуваних клітин за допомогою балів оцінної шкали та прогнозують негативне, слабе, помірне або високе метастазування пухлин, якщо оцінка відповідає 0-20, 21-50, 51-100 або ≥101 бала, відповідно.

30 Таким чином, сукупність ознак запропонованої корисної моделі за даними експресії залучених маркерів дозволяє з'ясувати молекулярні властивості плоскоклітинного раку верхньощелепної пазухи, знайти ступені його гістологічного диференціювання та рівні тканинної інвазії у кістку, з збільш високою об'єктивністю (на 65-70 %).

Заявлений спосіб апробувався в умовах ОКЛ ім. І.І. Мечникова м. Дніпропетровська. У більшості з випадків його використання дозволяло коригувати надавану терапію, радикально змінювати терапевтичні схеми. У 36 хворих на рак верхньощелепної пазухи виконано переведення хворих на індивідуалізовану форму терапії покращувало ефективність лікування, знижувало токсичність хіміотерапії, скорочувало як терміни лікування, так і чисельність побічних ускладнень.

45 Приклад 1. Хворий А.Н. Золотаревич, 60 років, перебував у ЛОР-онкологічному відділенні ОКЛ ім. І.І. Мечникова м. Дніпропетровська з приводу лікування: раку верхньощелепної пазухи IV ст., 11 кл. гр. (T4N0M0), іст. хв. № ЕА 4820 від 18.11.2015.

17.11.2015 у хворого брали пробу тканин верхньощелепної пазухи шляхом ендоскопічної риноскопії. Відібрані зразки фіксували у нейтральному забуференому 10 % формаліні й заливали парафіном, виготовляли гістологічні препарати, які забарвлювали гематоксиліном, еозином і формували зрізи. При імуногістохімічному дослідженні використали моноклональні антитіла Ki-67, поліклональні MMP-9 та інгібітор тканинної інвазії TIMP-1. При мікроскопії спостерігали реакцію маркерів на 1000 сусідніх пухлинних клітин при 200<sup>x</sup> збільшенні мікроскопа. Оцінюючи результат, визначили високу проліферативну активність за реакцією 410 досліджуваних клітин на Ki-67. Прогнозували ріст пухлинного ґенезу тканинного інгібітора TIMP-1 (пухлина швидко росла, проліферативна активність 65 %, висока чутливість до хіміопроменевої терапії), та можливість розвитку HMW-форми раку, за підвищеною експресією плоских цитокератинів. Здійснювали напівкількісний аналіз цифрових мікрофотографій. Інтенсивність забарвлення досліджуваних клітин за оцінною шкалою становила 86 балів, що відповідало високій здатності пухлин до метастазування (деградації строми, інвазії та експресії).

Діагностували плоскоклітинний помірно-диференційований рак з вираженим інфільтративним ростом.

Наданий приклад використання способу прогнозування клінічного перебігу плоскоклітинного раку верхньощелепної пазухи демонструє, що дослідження молекулярних властивостей пухлин верхньощелепної пазухи та інвазії кісткових тканин надає можливість збільшити об'єктивність прогнозу на 65-70 %, що відповідає умові "промислова придатність". Спосіб розв'язує проблеми прогнозування рецидивів пухлин і регіонарних метастазів, з можливістю використання отриманих результатів в ефективній профілактиці локально розповсюджених форм раку верхньощелепної пазухи, у т.ч. і серед прогностично несприятливих хворих, на ранніх етапах терапії, що підвищує їх виживання.

Джерела інформації:

1. Пат. 61639 України, МПК А61К 38/43, А61К 38/55, G01N 33/49. Спосіб прогнозування виникнення рецидиву і метастазів у хворих на рак гортані /Кизим О.Й., Голобородько О.П., Клись Ю.Г., Зайцева Н.В., Верьовка С.В. (Україна); Інститут отоларингології ім. О.С. Коломійченка (Україна). - № 201015865; зая-вл. 29.12.10; опубл. 25.07.11.

2. Пат. 18143 України, МПК А61В 10/02, G01N 33/531. Спосіб прогнозування клінічного перебігу раку гортані /Ковтуненко О.В., Шпонька І.С., Тимчук С.М., Березнюк В.В., Гриценко П.О., Бондарева В.О. (Україна). - № 200606965; зая-вл. 22.06.06; опубл. 16.10.06.

## ФОРМУЛА КОРИСНОЇ МОДЕЛІ

Спосіб прогнозування клінічного перебігу плоскоклітинного раку верхньощелепної пазухи, що включає біопсію тканин пухлини, фіксування зразків у нейтральному формаліні, парафіні, виготовлення з них гістологічних препаратів, забарвлення гематоксиліном, еозином, формування зрізів, імуногістохімічне дослідження, з використанням моноклонального антитіла Ki-67, як маркера проліферативної активності, мікроскопію та оцінку, який **відрізняється** тим, що додатково залучають поліклональне антитіло ММП-9 як показник інвазії тканин, інгібітор тканинної інвазії TIMP-1, при мікроскопії спостерігають реакцію маркерів на 1000 сусідніх пухлинних клітин при 200<sup>x</sup> збільшенні мікроскопа, під час оцінки визначають низьку проліферативну активність досліджуваних клітин, якщо реакція на Ki-67 менше у 330-340 досліджуваних клітин, або високу проліферативну активність досліджуваних клітин, якщо реакція на Ki-67 більше у 330-340 досліджуваних клітин, якщо виявляють високу проліферативну активність, то прогнозують ріст пухлинного генезу тканинного інгібітора TIMP-1, якщо виявляють підвищення експресії плоских цитокератинів, прогнозують розвиток Н М W-форми раку, проводять напівкількісний аналіз цифрових мікрофотографій, оцінюють інтенсивність забарвлення досліджуваних клітин, як цитоплазматичну реакцію поліклонального антитіла ММП-9, за допомогою балів оцінної шкали, та прогнозують негативне, слабе, помірне або високе метастазування пухлин, якщо оцінка дорівнює 0-20, 21-50, 51-100 або  $\geq 101$  бала, відповідно.

---

Комп'ютерна верстка А. Крулевський

---

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