



УКРАЇНА

(19) UA

(11) 111478

(13) U

(51) МПК

A61B 10/02 (2006.01)

G01N 33/48 (2006.01)

G01N 33/53 (2006.01)

ДЕРЖАВНА СЛУЖБА
ІНТЕЛЕКТУАЛЬНОЇ
ВЛАСНОСТІ
УКРАЇНИ**(12) ОПИС ДО ПАТЕНТУ НА КОРИСНУ МОДЕЛЬ**(21) Номер заявки: **u 2016 05077**(22) Дата подання заявки: **10.05.2016**(24) Дата, з якої є чинними
права на корисну
модель: **10.11.2016**(46) Публікація відомостей
про видачу патенту: **10.11.2016, Бюл.№ 21**(72) Винахідник(и):
**Ковтуненко Олександр Васильович (UA),
Шпонька Ігор Станіславович (UA),
Шпортько Богдан Вікторович (UA),
Тимчук Сергій Миколайович (UA),
Пославська Олександра Володимирівна
(UA)**(73) Власник(и):
**ДЕРЖАВНИЙ ЗАКЛАД
"ДНІПРОПЕТРОВСЬКА МЕДИЧНА
АКАДЕМІЯ МОЗ УКРАЇНИ",
вул. Севастопольська, 19, м.
Дніпропетровськ, 49005 (UA),
Ковтуненко Олександр Васильович,
Донецьке шосе, 1, кв. 211, м.
Дніпропетровськ, 49080 (UA),
Шпонька Ігор Станіславович,
вул. Мандриківська, 143, кв. 153, м.
Дніпропетровськ, 49044 (UA),
Шпортько Богдан Вікторович,
вул. Моніторна, 7, кв. 428, м.
Дніпропетровськ, 49018 (UA),
Тимчук Сергій Миколайович,
вул. Кожем'яки, 9, кв. 85, м.
Дніпропетровськ, 49083 (UA),
Пославська Олександра Володимирівна,
Шаховий проїзд, 46, м. Дніпропетровськ,
49008 (UA)****(54) СПОСІБ ПРОГНОЗУВАННЯ МЕТАСТАЗІВ ПЛОСКОКЛІТИННОГО РАКУ ГОРТАНІ****(57) Реферат:**

Спосіб прогнозування метастазів плоскоклітинного раку гортані включає біопсію пухлин, фіксування зразків у нейтральному формаліні, парафіні, виготовлення з них гістологічних препаратів, забарвлення гематоксиліном, еозином, формування зрізів, їх імуногістохімічне дослідження, з використанням моноклонального антитіла Ki-67 як маркера проліферативної активності, мікроскопію та оцінку. Додатково при імуногістохімічному дослідженні використовують маркер росту ендотелію судин VEGF та маркер васкуляризації CD34, а під час імуногістохімічного дослідження спостерігають реакцію 1000 сусідніх пухлинних клітин на використовувані маркери при 200^x мікроскопічному збільшенні мікроскопа, де за реакцією на маркер VEGF, з використанням напівкількісної шкали, при інтенсивності забарвлення клітин з градацією 1+ визначають слабку експресію та при інтенсивності забарвлення клітин з градацією 2+ або 3+ - сильну експресію і прогнозують низький або високий ризик метастазування відповідно, або, за реакцією на маркер CD34, що проявляється специфічним забарвленням клітин ендотелію мікросудин, визначають показник щільності мікросудин і, при значеннях якого менше або більше 54 мм², прогнозують низький або високий ризик метастазування, відповідно.

UA 111478 U

Корисна модель належить до медицини, зокрема до способів діагностики, та може бути використаною в пато-, онко- або отоларингології під час доклінічного дослідження прогностично сприятливих або несприятливих імунотипів плоскоклітинних раків.

Відомий спосіб прогнозування виникнення рецидиву і метастазів у хворих на рак гортані (пат. України, № UA 61639 МПК А61К 38/43, А61К 38/55, G01N 33/49. опубл. 25.07.11), що включає визначення вмісту інгібіторів цистеїнових протеїназ в первинних пухлинах, що додатково визначають активність цистеїнових протеїназ (ЦП), при цьому розраховують коефіцієнт співвідношення (КС) між активністю ЦП та вмістом їх інгібіторів, і при значенні $КС \geq 26$ ум. од. судять про можливість виникнення метастазів у хворих на рак гортані.

Однак попри прийнятній специфічності, об'єктивності відомого способу при його використанні є не досить високою, так як оцінюється лише окремий вид протеаз та їх інгібіторів. Це стримує призначення агресивного хіміопроменевого лікування на основі даного методу. Крім того, плазма крові не містить специфічних клітин пухлини і не може повністю відображати імовірність метастазування.

Найбільш близьким по технічній суті та ефекту, що досягається, є спосіб прогнозування клінічного перебігу раку гортані (Пат. України, № UA 18143 МПК А61В 10/02, G01N 33/531. опубл. 16.10.06.), що включає біопсію пухлин, фіксування зразків у нейтральному формаліні, парафіні, виготовлення з них гістологічних препаратів, забарвлення гематоксиліном, еозином, формування зрізів, їх імуногістохімічне дослідження, з використанням моноклонального антитіла Ki-67, як маркера проліферативної активності, мікроскопію та оцінку, у відповідності з котрим, під час імуногістохімічного дослідження визначають загальну кількість клітин з пофарбованими і непрофарбованими ядрами, рівні експресії онкосупресорних генів p53 як ключових регуляторів апоптозу та контролерів цілісності геному, bcl-2, як регулятора клітинної смерті та блокатора апоптозу, цитокератинів AE1/AE3 і 19 як маркерів епітеліального диференціювання клітин, а під час оцінки результатів, 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 - імуногістохімічний статус, по реакції ядер пухлинних клітин на моноклональне антитіло Ki-67 - проліферативну активність, за підвищенням експресії цитокератинів AE1/AE3 і 19 - форми раку, у залежності від розмірів, інтенсивності збільшення, частоти метастазування, рецидиву пухлин і рівня інвазії - ступені гістологічного диференціювання раку, при виявленні порушень функцій онкосупресорних генів p53 і/або bcl-2 і реакції понад 10 % ядер пухлинних клітин на моноклональні антитіла Ki-67 і/або на цитоплазматичне фарбування онкологічний статус пухлини кваліфікують позитивним, імуногістохімічний статус - 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 СК19 в клітині та пригнічення простих епітеліїв, усвідомлюють ступені гістологічного диференціювання раку, за рівнями і спектром експресії фракцій цитокератинів AE1/AE3 і 19 у клітині та прогнозують несприятливий перебіг процесу, щонайменше за погіршенням будь-яких 2 параметрів, у комбінації проліферативної активності онкологічного або імуногістохімічного статусів, і морфологічний варіант раку, з урахуванням форм і ступенів його гістологічного диференціювання.

У відомому способі допускається перевернення об'єктивності шляхом збільшення інтенсивності демаскування ракових клітин на ділянці спостереження, розширенню числа інформативних маркерів і посиленню інтерпретаційних можливостей. Натомість, його інформативні властивості позбавлені аналізу неоангіогенезу та васкуляризації, що є важливими факторами в прогнозуванні метастазів плоскоклітинного раку.

До основи корисної моделі поставлена задача вдосконалити спосіб прогнозування метастазів плоскоклітинного раку гортані за рахунок дослідження молекулярних властивостей пухлин та аналізу імуногістохімічних реакцій, що забезпечило би підвищення об'єктивності кінцевого результату та розширення меж переважного використання.

Поставлена задача вирішується тим, що у способі прогнозування метастазів плоскоклітинного раку гортані, що включає біопсію пухлин, фіксування зразків у нейтральному формаліні, парафіні, виготовлення з них гістологічних препаратів, забарвлення гематоксиліном, еозином, формування зрізів, їх імуногістохімічне дослідження, з використанням моноклонального антитіла Ki-67 як маркера проліферативної активності, мікроскопію та оцінку, відповідно до корисної моделі, додатково при імуногістохімічному дослідженні використовують

маркер росту ендотелію судин VEGF та маркер васкуляризації CD34, а під час імуногістохімічного дослідження спостерігають реакцію 1000 сусідніх пухлинних клітин на використовувані маркери при 200^x мікроскопічному збільшенні мікроскопа, де за реакцією на маркер VEGF, з використанням напівкількісної шкали, при інтенсивності забарвлення клітин з градацією 1+ визначають слабку експресію та при інтенсивності забарвлення клітин з градацією 2+ або 3+ - сильну експресію і прогнозують низький або високий ризик метастазування відповідно, або, за реакцією на маркер CD34, що проявляється специфічним забарвленням клітин ендотелію мікросудин, визначають показник щільності мікросудин і, при значеннях якого менше або більше 54/мм², прогнозують низький або високий ризик метастазування, відповідно

За реакцією на маркер VEGF, з використанням напівкількісної шкали, оцінюють неоваскулярицію, де визначають статус досліджуваних клітин та здатність останніх до прояву раннього регіонарного метастазування, і прогнозують низьку або високу метастатичну активність пухлини. Реакцію на маркер VEGF оцінюють за напівкількісним методом і при незначному забарвленні випаданні хромогену окремими депозитами, тобто низькій інтенсивності забарвлення, виставляють градацію "1+" і експресію визначають слабою. При помірній та високій інтенсивності забарвлення VEGF (градації 2+, 3+) визначають високу експресію.

Завдяки специфічній мембранній імуногістохімічній реакції ендотелію судин з маркером CD34 кількісно оцінюють показник щільності мікросудин та використовують для оцінки ризику метастазування в регіональні лімфатичні вузли. Враховуючи значення показника, результати розбиті на дві групи: при менше 54 мм² щільність мікросудин визначають низькою, а при більше 54 мм² високою та визначають низький або високий ризик метастазування, відповідно.

На відміну від прототипу, інтенсивність забарвлення оцінюють шляхом напівкількісного аналізу, де у одному і тому ж зрізі виявляють рівні інтенсивності забарвлення нормальних епітеліальних і малігнізованих клітин, різниці між ними і оцінюють дійсний рівень інтенсивності імуногістохімічної реакції, чим виключають вплив лабораторного процесу на результати дослідження. Поряд із цим, вираження оцінних критеріїв у балах інтенсивності забарвлення і числа пухлинних клітин, що зреагували на маркери більш детально відбиває різні етапи канцерогенезу та клінічний перебіг, що збільшує інформативність, інтерпретацію більшої кількості вихідних параметрів, а відтак і об'єктивність прогнозування, з можливістю оцінки проліферативної активності, неоваскуляризації та щільності мікросудин.

Наведені відомості підтверджують, що застосовані приймання розширюють уявлення про молекулярні властивості плоскоклітинних раків гортані. Шляхом дослідження молекулярних властивостей пухлин та інтерпретації імуногістохімічних реакцій досягається покращення об'єктивності і розширення меж переважного використання способу.

Таким чином, сукупність ознак запропонованого рішення задачі за даними експресії залучених маркерів дозволяє з'ясувати молекулярні властивості плоскоклітинного раку гортані, знайти ступені його гістологічного диференціювання та визначити ризик метастазування.

Спосіб прогнозування метастазів плоскоклітинного раку гортані здійснюють у наступній послідовності. Під час ларингоскопії виконують біопсію тканини. Узяті ділянки пухлин фіксують у нейтральному забуференому 10 % формаліні та заливають парафіном. Після підготовки, виготовлення та рутинного забарвлення гістологічного препарату за допомогою гематоксилін-еозину, зрізи піддають послідовному імуногістохімічному дослідженню, з використанням моноклонального антитіла Ki-67 і додатково з моноклональними антитілами VEGF (клон VG1) та CD34 (клон QBEnd 10).

Під час імуногістохімічного дослідження спостерігають реакцію 1000 сусідніх пухлинних клітин на використовувані маркери при 200^x мікроскопічному збільшенні мікроскопа. За реакцією на Ki-67 менше чи більше 30 % досліджуваних клітин визначають низьку або високу проліферативну активність досліджуваних клітин, відповідно. При високій проліферативній активності прогнозують ріст пухлинного генезису. За реакцією на маркер VEGF, з використанням напівкількісної шкали, при інтенсивності забарвлення клітин з градацією 1+ визначають слабку експресію та при інтенсивності забарвлення клітин з градацією 2+ або 3+ - сильну експресію і прогнозують низький або високий ризик метастазування, відповідно. За реакцією на маркер CD34, що проявляється специфічним забарвленням клітин ендотелію мікросудин, визначають показник щільності мікросудин і, при значеннях якого менше або більше 54 мм², прогнозують низький або високий ризик метастазування, відповідно.

Для здійснення способу прогнозування метастазів раку гортані залучають ротаційний мікротом "Microm" фірми "Microm International GmbH" (Німеччина), мікроскоп DLME фірми "Leica" (США), моноклональне антитіло Ki-67, VEGF, CD34, виробництва "TermoScientific" (США).

Заявлений спосіб був апробований в умовах ОКЛ ім. І.І. Мечникова. Його використання у більшості випадків призводило до корекції тактики лікування. Переведення хворих на індивідуалізовану форму терапії покращувало ефективність лікування, індивідуалізувало вибір оперативного втручання на лімфатичних вузлах шиї.

5 Приклад 1. Хворий, 61 рік, перебував у ЛОР-онкологічному відділенні обласної клінічної лікарні ім. І.І. Мечникова, м. Дніпропетровська з приводу лікування: раку гортані IV ст, II кл.гр., (T4N2M0). 19.10.12 р. у хворого брали пробу тканин гортані, яку досліджували за стандартним морфологічним методом забарвлення, з використанням гематоксиліну, еозину та імуногістохімічним шляхом, з використанням моноклональних антитіл до Ki-67 (клон SP6), VEGF 10 (клон VG1), CD34 (клон QBEnd 10), виробництва (TermoScientific, США). Оцінюючи експресії маркерів визначали проліферативну активність, неоваскуляризацію, та щільність мікросудин. Імуногістохімічний статус: Ki-67 70 %, пухлина швидко росте; VEGF 2+, помірна васкуляризація, високий ризик метастазування; CD34 68 /мм², висока щільність мікросудин, високий ризик метастазування. Висновок №67099-107 от 22.10.12: плоскоклітинний помірно-15 диференційований рак. Оцінюючи отримані дані, визначали високий ризик метастазування пухлини. Пацієнту проведене комплексне лікування: ларингектомія та радикальна лімфодисекція (19.10.12); два курси поліхіміотерапії (11.12 та 12.12); курс променевої терапії 01.13. В липні 2013 р у пацієнта відмічається рецидив захворювання у регіонарних лімфатичних вузлах.

20 Приклад 2. Хворий, 40 років, перебував у ЛОР-онкологічному відділенні обласної клінічної лікарні ім. І.І. Мечникова, м. Дніпропетровська з приводу лікування: C-г laryngis III ст, T3N0M0 II кл.гр. 06.09.12 у хворого брали пробу тканин гортані, яку досліджували за стандартним морфологічним методом забарвлення, з використанням гематоксиліну, еозину та імуногістохімічним шляхом, з використанням моноклональних антитіл до Ki-67 (клон SP6), VEGF 25 (клон VG1), CD34 (клон QBEnd 10), виробництва (TermoScientific, США). Оцінюючи експресії маркерів визначали проліферативну активність, неоваскуляризацію та щільність мікросудин. Імуногістохімічний статус: Ki-67 30 %, пухлина повільно росте; VEGF 1+, низька васкуляризація, низький ризик метастазування; CD34 47 /мм, низька щільність мікросудин, низький ризик метастазування, Висновок 57279-84 от 07.09.12: плоскоклітинний помірно диференційований 30 рак. Оцінюючи отримані дані, визначали низький ризик метастазування пухлини. Пацієнту проведене комбіноване лікування: ларингектомія (06.09.12); курс променевої терапії 11.12. За період спостереження даних за метастазування пухлини не виявлено.

Таким чином, пропонований спосіб прогнозування метастазів плоскоклітинного раку гортані сприяє покращенню об'єктивності кінцевого результату та розширенню меж переважного 35 використання. За рахунок дослідження прогностично значущих клініко-морфологічних критеріїв, імуногістохімічних маркерів, як ознак пухлинного процесу, їх систематизації та отримання уявлень щодо біологічних, клінічних і морфологічних властивостей ракових клітин спосіб розв'язує проблеми прогнозування регіонарних метастазів, з можливістю використання отриманих результатів в ефективному лікуванні метастазів раку гортані.

40 ФОРМУЛА КОРИСНОЇ МОДЕЛІ

Спосіб прогнозування метастазів плоскоклітинного раку гортані, що включає біопсію пухлин, фіксування зразків у нейтральному формаліні, парафіні, виготовлення з них гістологічних 45 препаратів, забарвлення гематоксиліном, еозином, формування зрізів, їх імуногістохімічне дослідження з використанням моноклонального антитіла Ki-67 як маркера проліферативної активності, мікроскопію та оцінку, який **відрізняється** тим, що додатково при імуногістохімічному дослідженні використовують маркер росту ендотелію судин VEGF та маркер васкуляризації CD34, а під час імуногістохімічного дослідження спостерігають реакцію 1000 50 сусідніх пухлинних клітин на використовувані маркери при 200^x мікроскопічному збільшенні мікроскопа, де за реакцією на маркер VEGF, з використанням напівкількісної шкали, при інтенсивності забарвлення клітин з градацією 1+ визначають слабку експресію та при інтенсивності забарвлення клітин з градацією 2+ або 3+ - сильну експресію і прогнозують низький або високий ризик метастазування відповідно, або за реакцією на маркер CD34, що 55 проявляється специфічним забарвленням клітин ендотелію мікросудин, визначають показник щільності мікросудин і, при значеннях якого менше або більше 54 мм², прогнозують низький або високий ризик метастазування, відповідно.

Комп'ютерна верстка Л. Бурлак

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