



УКРАЇНА

(19) **UA** (11) **68916** (13) **U**
(51) МПК (2012.01)
A61K 38/27 (2006.01)
A61B 17/00

ДЕРЖАВНА СЛУЖБА
ІНТЕЛЕКТУАЛЬНОЇ
ВЛАСНОСТІ
УКРАЇНИ

(12) ОПИС ДО ПАТЕНТУ НА КОРИСНУ МОДЕЛЬ

(21) Номер заявки: u 2011 13825	(72) Винахідник(и): Бучинська Любов Георгіївна (UA), Поліщук Людмила Захарівна (UA), Юрченко Наталія Петрівна (UA), Неспрядько Сергій Валерійович (UA), Романенко Олександр Вікторович (UA)
(22) Дата подання заявки: 24.11.2011	
(24) Дата, з якої є чинними права на корисну модель: 10.04.2012	
(46) Публікація відомостей про видачу патенту: 10.04.2012, Бюл.№ 7	(73) Власник(и): НАЦІОНАЛЬНИЙ МЕДИЧНИЙ УНІВЕРСИТЕТ ІМЕНІ О.О. БОГОМОЛЬЦЯ, бул. Т. Шевченка, 13, м. Київ, 01601 (UA), ІНСТИТУТ ЕКСПЕРИМЕНТАЛЬНОЇ ПАТОЛОГІЇ, ОНКОЛОГІЇ І РАДІОБІОЛОГІЇ ІМ. Р.Є. КАВЕЦЬКОГО НАЦІОНАЛЬНОЇ АКАДЕМІЇ НАУК УКРАЇНИ, вул. Васильківська, 45, м. Київ, 03022 (UA)

(54) СПОСІБ ОЦІНКИ ІНДИВІДУАЛЬНОЇ ГОРМОНОЧУТЛИВОСТІ РАКУ ЕНДОМЕТРІЯ

(57) Реферат:

Спосіб оцінки індивідуальної гормоночутливості раку ендометрія включає хірургічне лікування з наступною гормонотерапією. До хірургічного лікування оцінюють стан секреторної активності залоз ендометрія та активність ядерцеутворюючих районів хромосом (ЯУР) у пухлинних клітинах зскрібків стінок матки, які порівнюють з такими ж показниками у післяопераційному матеріалі хворих на рак ендометрія після гормональної терапії Депо-Провера у дозі 500 мг внутрішньом'язово через день до сумарної дози 3,5 г. За змінами особливостей гормонального патоморфозу та активності ЯУР оцінюють гормоночутливість раку ендометрія індивідуально у кожної хворої.

UA 68916 U

Корисна модель, що заявляється, належить до медицини, зокрема до онкогінекології, та може бути використана при лікуванні раку ендометрія.

З перших повідомлень про зникнення метастазів у легені та кістці у хворих на рак ендометрія (РЕ) під впливом 17-оксипрогестерон капронату почалась ера гормональної терапії в онкогінекології. Лікування раку ендометрія за допомогою прогестинів Я.В. Бохман назвав унікальним явищем у клінічній онкології, оскільки як протипухлинний препарат застосовують фізіологічний регулятор структури і функції ендометрія [1]. В основі протипухлинного ефекту прогестинів лежить здатність пухлин ендометрія відповідати на дію препарату фізіологічною реакцією, що подібна секреторній трансформації епітелію в нормі [1, 2, 3].

Однак, незважаючи на багаторічну історію застосування гормонотерапії в онкогінекології, такі проблеми, як чутливість пухлин до гормонального впливу, розробка і вибір оптимальних схем гормональної терапії хворих, особливості гормонального патоморфозу в залежності від біологічних характеристик раку ендометрія, залишаються до теперішнього часу актуальними [4, 5].

В останні роки в онкоморфологію впроваджуються молекулярні та цитогенетичні методи дослідження, які дозволяють визначати зміни експресії білків, задіяних у кардинальних процесах, що лежать в основі пухлинного росту та його прогресії. Такі впровадження дають можливість не тільки більш об'єктивно оцінити структурні особливості пухлин, але і визначити зміни функції пухлинних клітин під впливом дії гормональних препаратів.

Одним із показників функціонального стану клітин у нормі і патології вважається рівень експресії рибосомних генів, які в інтерфазі формують ядро [6]. Важливим є той факт, що морфологія ядра залежить від ядерцеутворюючих районів хромосом (ЯУР), кількість і розмір яких корелює з рівнем біосинтезу рибосом та відображає активність клітин у цілому [7]. Нашими попередніми дослідженнями встановлено, що активність ЯУР, яка визначається після імпрегнації гістологічних препаратів азотнокислим сріблом, є об'єктивним критерієм проліферативного потенціалу пухлин і залежить від ступеня диференціювання раку ендометрія [8, 9].

Відомі традиційні методи лікування раку ендометрія. Найбільш поширеним є комбіноване лікування: екстирпація матки з придатками та ад'ювантна променева терапія і/або гормонотерапія [10]. Враховуючи, що у 70 % раку ендометрія є гормонозалежним, вказані методи лікування хоч і забезпечують адекватне лікування, проте потребують визначення показань до призначення ад'ювантної гормонотерапії.

Ряд клініцистів при проведенні ад'ювантної гормонотерапії синтетичними прогестинами оцінюють клінічні дані або рівень гормональних порушень гіпоталамо-гіпофізарно-яєчникової системи. Перспективним для цілеспрямованої гормонотерапії є виявлення рецепторів естрогенів та прогестерону в пухлинах.

Найбільш близьким до способу, що заявляється, є спосіб лікування хворих на рак ендометрія [11], який вибраний нами як прототип. Цей спосіб передбачає хірургічне лікування з наступною променевою терапією або використовується лише хірургічне лікування з ад'ювантною гормонотерапією, при цьому враховується рівень експресії рецепторів естрогену та прогестерону у видаленій пухлині.

Однак, цей спосіб має наступні недоліки: відсутність патогенетичного підходу до лікування, невизначеність наявності рецепторів естрогенів та прогестерону у пухлинах.

Задача корисної моделі, що заявляється, полягає у визначенні цитоморфологічних критеріїв індивідуальної гормоночутливості пухлин після неад'ювантної гормонотерапії хворих на рак ендометрія з використанням медичного препарату Депо-Провера, яка проводиться в неoad'ювантному режимі.

Технічний результат, отриманий від рішення задачі, полягатиме у підвищенні ефективності лікування шляхом патогенетичного підходу до лікування, що дозволить корегувати ад'ювантну терапію і таким чином підвищити виживаність хворих.

Поставлена задача досягається тим, що у відомому способі, який включає хірургічне лікування з наступною гормонотерапією, згідно з корисною моделлю, до хірургічного лікування оцінюють стан секреторної активності залоз ендометрія та активність ЯУР у пухлинних клітинах зскрібків стінок матки, які порівнюють з такими ж показниками у післяопераційному матеріалі хворих на рак ендометрія після гормональної терапії Депо-Провера у дозі 500 мг внутрішньом'язово через день до сумарної дози 3,5 г, і за змінами особливостей гормонального патоморфозу та активності ЯУР оцінюють гормоночутливість раку ендометрія індивідуально у кожної хворої.

Відмінною особливістю способу, що заявляється, є підхід до визначення цитоморфологічних критеріїв індивідуальної гормоночутливості пухлин після неoad'ювантної гормонотерапії хворих на рак ендометрія з використанням Депо-Провера.

Робота виконана на матеріалі зскрібків ендометрія до гормонального лікування в неoad'ювантному режимі та операційному матеріалі 27 хворих на рак ендометрія і стадії віком 38-69 років. Депо-Провера призначали до операції у дозі 500 мг внутрішньом'язово, через день до сумарної дози 3,5 г. У подальшому хворим проводили хірургічне лікування в об'ємі екстирпації матки з придатками.

Одержані до лікування зскрібки зі стінок матки і операційний матеріал фіксували у суміші Карнуа, піддавали класичній гістологічній обробці з подальшим виготовленням із кожного парафінового блока декількох ступінчатих гістологічних зрізів товщиною 4-5 мкм. Останні фарбували гематоксиліном та еозином, проводили також гістохімічну реакцію на виявлення ШИК-позитивних структур для уточнення ступеня диференціювання і детальної характеристики секреторної трансформації, про яку судили на підставі наявності секрету у просвітах залоз або у пухлинних клітинах. Паралельно гістологічні зрізи імпрегнували 50 % розчином азотнокислого срібла для виявлення ЯУР.

Для аналізу мікроскопічних змін у зскрібках і видалених пухлинах використовували мікроскоп NU2E при збільшенні 200x, 400x, 1250x (масляна імерсія). Характер патологічного процесу в ендометрії і ступінь диференціювання пухлин оцінювали за Міжнародною гістологічною класифікацією пухлин.

Для оцінки стану ЯУР у кожному препараті аналізували по 100 пухлинних клітин, в яких рахували кількість ЯУР, імпрегнованих сріблом (AgЯУР), тобто враховували вміст великих (3 мкм), середніх (1-3 мкм) та дисперсних (до 1 мкм) ЯУР. Цифрові дані піддавали статистичній обробці з розрахунком t-критерію Ст'юдента. Вірогідними вважали зміни при $p < 0,05$.

Результати морфологічного дослідження зскрібків зі стінок матки показали, що у всіх обстежених хворих була аденокарцинома ендометрія різного ступеня диференціювання - G1 (5) і G2 (22 хворих), відповідно високий і помірний ступінь.

Аденокарцинома високого ступеня диференціювання (G1) складалась із тісно розташованих залозистих структур, часом тубулярної будови, вистелених пухлинними клітинами у 1-3 ряди або однорядним атипичним епітелієм з округлими і витягнутими ядрами. У більшості пухлинних клітин апікальний край цитоплазми був чіткий, лише в окремих залозах спостерігалась нечіткість цього краю цитоплазми. В поодиноких залозах виявлялась секреторна активність епітелію, що проявлялось у вигляді «кайми» блакитного кольору по поверхні клітин або у просвітах залоз, іноді у залозах спостерігався ШИК-позитивний секрет.

У помірно диференційованих аденокарциномах (G2), крім вищеописаних морфологічних змін, виявлялись папілярні структури різної величини у просвіті залоз, а також осередки солідного росту пухлин. Пухлинні клітини характеризувались більшою варіабельністю за формою і розмірами, у залозах вони розташовувались у декілька рядів, іноді повністю вкривали просвіти залоз. Ядра клітин також були більш поліморфними, частіше - гіпохромними із збільшеними ядερцями. Ознаки секреторної трансформації клітин визначались в окремих залозах. Як у високо, так і помірнодиференційованих аденокарциномах виявлялись мітози у різній кількості.

Оцінку гормонального патоморфозу проводили при порівняльному морфологічному дослідженні зскрібків зі стінок матки і операційного матеріалу у однієї і тієї ж хворої. Після гормональної терапії із застосуванням Депо-Провера звертали на себе увагу зміни морфології у бік підвищення структурної диференціації РЕ і збільшення секреторної активності пухлинних клітин, що є показником їх диференціації.

Детальний аналіз морфологічних змін, пов'язаних з гормональним патоморфозом РЕ, подано у таблиці, з якої видно, що після лікування Депо-Провера спостерігається підвищення структурної диференціації раку і зміни секреторної активності епітелію. У високодиференційованих аденокарциномах збільшувалась кількість залоз з однорядним розташуванням клітин, з'являлись осередки атипової гіперплазії залоз. У помірнодиференційованих аденокарциномах виявляли збільшення об'єму залозистого компоненту раку, зменшення кількості папілярних структур поряд зі зниженням в них кількості клітин, виявляли також появу залозистоподібних або криброзних структур у ділянках солідного росту РЕ.

Характерними ознаками лікувального патоморфозу були цитологічні ознаки, які вказували на диференціацію пухлинних клітин: зменшувалась атипія і поліморфізм клітин із зменшенням розмірів ядер, більшість з яких набували овальної форми. Характерною ознакою підвищеної секреторної активності пухлинних клітин була поява суб'ядерних вакуолей у цитоплазмі,

зростання нечіткості апікального краю цитоплазми. Секрет у клітинах та у просвітах залоз мав ШИК-позитивний характер, що є морфологічною ознакою підвищеної секреторної активності клітин. Такі цитологічні ознаки виявляли в аденокарциномах різного ступеня диференціації. Разом з тим слід відзначити, що після гормонального лікування у гістологічних препаратах операційного матеріалу мітози не виявлялись, що свідчить про зниження проліферації пухлинних клітин.

Ознаки гормонального патоморфозу виявлені у 4 аденокарциномах високого ступеня диференціації. В аденокарциномах з помірною диференціацією зміни залозистого компоненту із підвищенням структурної диференціації також спостерігались у більшості випадків, при цьому ознаки гормонального патоморфозу виявлялись й у солідних осередках росту, але не у всіх новоутвореннях - лише у 50 % досліджених пухлин.

Таблиця

Критерії гормонального патоморфозу раку ендометрія

Підвищення структурної диференціації пухлин:	
-	поява осередків атипової гіперплазії залоз;
-	зменшення кількості папілярних структур;
-	зменшення числа клітин в папілярних структурах;
-	поява залозистоподібних або криброзних структур у ділянках солідного росту.
Підвищення диференціювання пухлинних клітин:	
-	зменшення атипії та поліморфізму клітин;
-	зменшення розмірів ядер та зростання їх мономорфності;
-	збільшення кількості овальних ядер;
-	однорядне розташування клітин у залозах;
-	більш чіткі межі клітин;
-	нечіткість апікального краю клітин;
-	поява суб'ядерних вакуолей в цитоплазмі;
-	поява секрету ШИК-позитивного характеру в суб'ядерних вакуолях у цитоплазмі клітин або у просвітах більшості залоз;
-	відсутність мітозів.

Отже, результати морфологічного і гістохімічного дослідження дозволили встановити критерії гормонального патоморфозу аденокарцином ендометрія після лікування хворих Депо-Провера, що вказують на гормоночутливість раку ендометрія.

Дослідження рівня експресії AgЯУР у зскрібках ендометрія показало, що до лікування хворих на рак ендометрія середня кількість AgЯУР на одне ядро була вірогідно більшою у G2-аденокарциномах, дорівнюючи $4,51 \pm 0,32$ проти $3,02 \pm 0,23$ у G1 - аденокарциномах ($p < 0,05$).

Оцінюючи рівень експресії AgЯУР у хворих на G1-аденокарциному, слід відзначити, що загальна кількість AgЯУР у пухлинних клітинах після лікування не відрізнялась від такої до гормонотерапії ($p > 0,05$). Але при цьому спостерігався деякий перерозподіл аргентофільних гранул у пухлинних клітинах у бік вірогідного зменшення кількості великих AgЯУР ($p < 0,05$).

В клітинах хворих на G2-аденокарциному до лікування виявлено більш значні міжіндивідуальні коливання загальної кількості AgЯУР ($1,90-6,87$) порівняно з такими у G1-аденокарциномі ($2,12-4,89$). Після Депо-Провера популяція пухлинних клітин у G2-аденокарциномі стає менш гетерогенною за вмістом AgЯУР і спостерігається вірогідне зменшення ($p < 0,05$) як загального числа AgЯУР, так і кількості їх дисперсних форм. Останнє становить значний інтерес, оскільки нами було показано раніше, що вміст дисперсних AgЯУР відображає ступінь диференціювання РЕ і корелює з ним. Це свідчить про позитивну відповідь як високодиференційованої, так й помірнодиференційованої аденокарциноми ендометрія на гормональну дію Депо-Провера.

Ще одним доказом такого положення є зміна популяції пухлинних клітин G2-аденокарциноми за вмістом AgЯУР у сторону збільшення (майже втричі) кількості клітин з одним ЯУР порівняно з таким до лікування. Слід відзначити, що кількість таких клітин у цих пухлинах дорівнювала їх числу при залозевій гіперплазії ендометрія, що було показано нами раніше. Після лікування хворих на G2-аденокарциноми спостерігалось вірогідне зменшення з 42,0 до 22,7 % клітин з 5 та більшим числом ЯУР. Оскільки число таких клітин, за даними літератури, корелює з кількістю клітин у S-фазі клітинного циклу, то ці результати відображають зменшення проліферативного потенціалу після застосування Депо-Провера.

Отже, отримані дані свідчать, що показник активності рибосомних генів об'єктивно відображає і підтверджує морфологічні дані про ефективність гормонотерапії за допомогою Депо-Провера у хворих на помірно-диференційовану аденокарциному ендометрія. Звертає на себе увагу неоднозначність змін активності ЯУР, що пов'язано зі ступенем диференціювання раку ендометрія.

Запропонований комплексний підхід до визначення гормонального патоморфозу у хворих на рак ендометрія може бути використаний у практичній роботі онкогінекологів для індивідуальної оцінки гормоночутливості раку ендометрія (G1, G2) та ефективності подальшої гормонотерапії як ад'ювантного лікування хворих, а також при визначенні індивідуальної чутливості раку до Депо-Провера.

Література:

1. Бохман Я.В., Бонт Я., Вишневский А.С. Гормонотерапия рака эндометрия. - СПб.: Гиппократ, 1992. - 156 с.

2. Бохман Я.В., Лившиц М.А., Винокуров В.Л. и др. Новые подходы к лечению гинекологического рака. - СПб.: Гиппократ, 1993. - 225 с.

3. Hormonal therapy for the management of grade 1 endometrial adenocarcinoma: a literature review / Ramirez P.T., Frumovitz M, Bodurka D.C. et al. // Gynecol. Oncol. - 2004. - V. 95. - P. 133-138.

4. Нарушения в экспрессии генов цитокинов при гиперплазии эндометрия и эффект гормональной терапии / Сухих Г.Т., Жданов А.В., Давыдова М.П. и др. // Бюл. экспер. биол. и мед. - 2005. - Т. 139. № 2. - С. 204-207.

5. Вишневская Е.Е. Особенности клинического течения рака эндометрия у больных репродуктивного возраста с распространенными стадиями заболевания // Рос. онкол. ж. - 2005. - № 3. - С. 19-22.

6. Standardized morphometric silver stained nucleolus organizer associated protein (AgNORs) analysis - basis concepts / Oefner D., Rueschoff J., Trere D. et al. // Path. Res. Pract. - 1995. - V. 191. - P. 236. Zaitoun A.M., Ebbs S.R. Quantitative cytological assessment of Ki-67 and AgNORs using computer-digitized image analysis of four clinicopathological breast lesions // Cytopathology. - 2000. - V. 11. № 4. - P. 243-54.

7. Бучинская Л.Г., Полищук Л.З. Районы ядрышкового организатора в клетках эндометрия при железистой гиперплазии и раке // Экспериментальная онкология. - 2001. - Т. 23, № 3. - с. 157-60.

8. Исследование пролиферативного потенциала рака эндометрия разной степени дифференцировки / Бучинская Л.Г., Полищук Л.З., Герасимова Т.Б. и др. // Вісн. пробл. біол. і мед. - 2003. - Вып. 4 - С. 118-20.

10. Бохман Я.В. Руководство по онкогинекологии. - 2002. - 423 с.

11. Бохман Я.В., Прянишников В.А., Чепик О.Ф. Комплексное лечение при гиперпластических процессах и раке эндометрия: - М.: - Медицина. - 1979. 271 с.

ФОРМУЛА КОРИСНОЇ МОДЕЛІ

Спосіб оцінки індивідуальної гормоночутливості раку ендометрія, що включає хірургічне лікування з наступною гормонотерапією, який **відрізняється** тим, що до хірургічного лікування оцінюють стан секреторної активності залоз ендометрія та активність ядерцеутворюючих районів хромосом (ЯУР) у пухлинних клітинах зскрібків стінок матки, які порівнюють з такими ж показниками у післяопераційному матеріалі хворих на рак ендометрія після гормональної терапії Депо-Провера у дозі 500 мг внутрішньом'язово через день до сумарної дози 3,5 г, і за змінами особливостей гормонального патоморфозу та активності ЯУР оцінюють гормоночутливість раку ендометрія індивідуально у кожної хворої.

Комп'ютерна верстка І. Скворцова

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