



ДЕРЖАВНА СЛУЖБА
ІНТЕЛЕКТУАЛЬНОЇ
ВЛАСНОСТІ
УКРАЇНИ

УКРАЇНА

(19) **UA**

(11) **107273**

(13) **U**

(51) МПК

G01N 33/48 (2006.01)

(12) ОПИС ДО ПАТЕНТУ НА КОРИСНУ МОДЕЛЬ

(21) Номер заявки: **u 2015 12539**

(22) Дата подання заявки: **18.12.2015**

(24) Дата, з якої є чинними
права на корисну
модель: **25.05.2016**

(46) Публікація відомостей
про видачу патенту: **25.05.2016, Бюл.№ 10**

(72) Винахідник(и):

**Дубініна Владлена Геннадіївна (UA),
Рибін Андрій Ігорович (UA)**

(73) Власник(и):

**ОДЕСЬКИЙ НАЦІОНАЛЬНИЙ МЕДИЧНИЙ
УНІВЕРСИТЕТ,
пров. Валіховський, 2, м. Одеса, 65082 (UA)**

(54) СПОСІБ ПРОГНОЗУВАННЯ ПЛАТИНОРЕЗИСТЕНТНОСТІ У ХВОРИХ НА РАК ЯЄЧНИКА

(57) Реферат:

Спосіб прогнозування платинорезистентності у хворих на рак яєчника з використанням біохімічних та імуногістохімічних досліджень крові і тканини пухлини яєчника. Проводять оцінку стану системи оксиду азоту шляхом визначення рівнів нітратів та нітритів у сироватці крові і активності синтази оксиду азоту в тканині пухлини яєчника і при зниженні показників активності оксиду азоту як у крові, так і в тканині пухлини яєчника судять про наявність резистентності до лікування препаратами платини.

UA 107273 U

Корисна модель належить до області медицини, а саме онкогінекології, і може бути використана для прогнозування платинорезистентності у хворих на рак яєчника.

Проблема діагностики та лікування злоякісних новоутворень яєчників є одним з найважчих розділів онкогінекології. У більшості хворих на рак яєчників (РЯ) захворювання виявляється на пізніх стадіях, а результати їх лікування залишаються невтішними. Незважаючи на високу чутливість багатьох сучасних методів діагностики, їх специфічність недостатня для диференціації доброякісного і злоякісного процесів в яєчниках [1, 2]. На сьогоднішній день "золотим стандартом" лікування РЯ стадій ІВ-ШС є оперативне втручання з наступним курсом післяопераційної хіміотерапії. При цьому, препаратом вибору в даний час (а на думку більшості вчених, - і в найближчі 30-40 років) є препарати платини. Відомо, що платина має потужний цитостатичний ефект, діє системно і викликає ряд так званих побічних ефектів (side-effects). При цьому цитостатичний ефект платини реалізується за допомогою такого варіанта загибелі клітин як некроз, приводячи до системної інтоксикації, а також до:

- відмови від подальшого лікування з боку пацієнтки;
- відмови від подальшого лікування пацієнтки з боку лікаря;
- неможливість продовження терапії з огляду декомпенсації однієї із систем організму пацієнтки.

Дані обставини призводять до порушення необхідних лікувальних доз застосовуваного препарату, і є однією з причин неефективності проведеного лікування і високої летальності хворих з РЯ [3].

Крім цього, за даними ряду дослідників, приблизно в 20-30 % випадків у хворих на РЯ відзначається первинна резистентність до препаратів платини, а в 38-50 % випадків реєструється вторинна резистентність [4].

Незважаючи на те, що РЯ належить до числа найбільш чутливих до хіміотерапії пухлин, приблизно 40 % пацієнток з даним захворюванням є первинно-резистентними до платинової хіміотерапії. Навіть при виконанні оптимальної циторедуктивної операції і подальшому призначенні хіміотерапії препаратами платини (хіміотерапія першої лінії) з досягненням ефекту повної регресії і нормалізації рівнів пухлинних маркерів, 5-річна виживаність хворих на РЯ ІІІ стадії становить 20-25 %, а ІV стадії - не перевищує 10 %. Це означає, що, незважаючи на відсутність клінічних ознак захворювання, у переважної більшості хворих у перші 2-3 роки після закінчення хіміотерапії першої лінії слід очікувати прогресування захворювання. Частота об'єктивного ефекту коливається в межах 10-25 %, а медіана тривалості життя становить 7-18 місяців [5].

У залежності від термінів прогресування хвороби прийнято виділяти такі типи пухлин: платинорефрактерний (пухлини, прогресуючі під час хіміотерапії першої лінії з включенням препарату платини), платинорезистентний (пухлини, прогресуючі протягом 6 місяців після закінчення хіміотерапії першої лінії з включенням препарату платини) і платиночутливий (пухлини, прогресуючі більш ніж через 6 місяців після закінчення хіміотерапії першої лінії).

Враховуючи сказане вище, прогнозування чутливості пухлини яєчника до препаратів платини є однією з актуальних проблем сучасної онкогінекології.

Найбільш близьким до заявленого технічного рішення є розробка, в якій як маркер платинорезистентності при лікуванні хворих на злоякісні пухлини яєчника пропонується визначення мутації в генах BRCA1 і BRCA2 (6). Однак цей метод є дороговартісним і недоступним більшості жінок, що утруднює масове впровадження його в клінічну практику.

В основу корисної моделі поставлено задачу вдосконалення способу прогнозування платинорезистентності в хворих на рак яєчника шляхом визначення активності оксиду азоту як маркера чутливості рака яєчника до платинової хіміотерапії.

Поставлена задача вирішується тим, що, згідно з корисною моделлю, проводять оцінку стану системи оксиду азоту шляхом визначення рівнів нітратів та нітритів у сироватці крові і активності синтази оксиду азоту в тканині пухлини яєчника і при зниженні показників активності оксиду азоту як у крові, так і в тканині пухлини яєчника від норми судять про наявність резистентності до лікування препаратами платини.

Спосіб виконується наступним чином.

З 2007 року на базі відділення онкогінекології Одеського обласного онкологічного диспансеру був проведений порівняльний аналіз 210 клінічних випадків раку яєчників стадії ІС-ІІІС, яким була виконана оптимальна або субоптимальна циторедуктивна операція в обсязі пангістеректомії І типу, оментектомії з подальшою ад'ювантною хіміотерапією препаратами платини. У всіх випадках гістологічним варіантом РЯ була аденокарцинома. Відбір хворих для дослідження здійснювався за принципом "випадок-контроль". До початку спеціального лікування всім пацієнткам було проведено анкетування з метою визначення клініко-амнестичних

характеристик захворювання, а також оцінка стану системи оксиду азоту. Критерієм поділу пацієнток на групи була вибрана чутливість РЯ до препаратів платини.

Першу групу склали 130 пацієнток з рецидивом РЯ, які виникли на фоні проведення курсів лікувальної ПХТ.

Другу групу склали 70 пацієнток з відсутністю рецидиву захворювання протягом п'яти років спостереження. Дослідження проводилося за схемою "випадок-контроль". Критерієм резистентності до препаратів платини слугувала реєстрація рецидиву РЯ шляхом виконання комп'ютерної томографії органів малого тазу і визначення рівнів СА-125 і HE4 в крові протягом 5 років спостереження.

Стан системи оксиду азоту оцінювали за величинами його основного метаболіту - NO₂ - у плазмі крові та сечі. Визначення проводили за методикою, в основу якої поставлено спосіб визначення кінцевого стабільного продукту неферментативного окислення NO, нітрит-аніону [NO₂-], який утворюється в результаті взаємодії NO з водою, що дає можливість судити про якість утвореного оксиду азоту. Для виявлення [NO₂-] використовували реактив Грісса (розчину сульфаніламідів і N-нафтил етилендіамін дигідрохлориду 30 % крижаної оцтової кислоти) як кольоростворюючого реагенту (дає малинове забарвлення при наявності NO₂ в рідинах). Отримані результати співвідносили зі стандартною калібрувальною кривою, отриманою на основі серійних розведень розчинів нітриту натрію в діапазоні концентрацій від 10 до 1000 мкмоль. Вміст NO₂- в біологічних рідинах розраховували за формулою:

NO₂ (кмоль/л) = Едосл. × К (NaNO₂) кмоль/л: Ест. NaNO₂, де:

Едосл. і Ест. - поглинання досліджуваної проби і стандартного зразка - відповідно;

К - концентрація NaNO₂, розрахована за калібрувальною кривою.

Як об'єкт гістохімічних досліджень використовувалися стовпчики яєчникової тканини, отримані за допомогою біопсії яєчникової тканини. Отриманий матеріал фіксувався 4 % розчином параформальдегіду протягом 24 годин. З фіксованого матеріалу виготовлялися кріостатні зрізи товщиною 11 мкм; на отриманих зрізах за Д.Е. Коржівським визначалася активність маркера NO-синтази. Отримані препарати вивчалися за допомогою світлового мікроскопу. Оцінка результатів гістохімічних реакцій здійснювалася за кількістю, розмірами і кольоровістю гранул фармазанів наступним чином:

- сіре, сірувато-жовте забарвлення дрібних гранул фармазанів свідчить про слідову активність NO-синтази в тканині яєчників;

- сіро-жовте забарвлення дрібних і середніх гранул фармазанів говорить про слабку активність NO-синтази в тканині яєчників;

- жовте, жовто-коричнювате фарбування дрібних і середніх фармазанів означає, що тканинна активність NO-синтази помірна;

- жовто-коричнєве, коричнєве забарвлення середніх гранул фармазанів є показником високої активності NO-синтази в тканині яєчників.

За характером локалізації гранул виділяли наступні фактори:

- наявність досліджуваних гранул по внутрішньому контуру судин є показником активності ендотеліальної NO-синтази в тканині яєчників;

- фарбування цитоплазми стромальних і епітеліальних клітин - свідчить про сумарні активності макрофагальної та ендотеліальної NO-синтази.

Оцінка активності NO-синтази проводилася по всій площі виготовленого препарату.

Отримані результати піддавалися статистичній обробці.

Середній вік пацієнток склав 56±9,3 років і достовірно не відрізнявся між групами. Порівняльний аналіз розподілу РЯ за стадіями в обох групах показав відсутність достовірних відмінностей між досліджуваними групами (табл. 1), в якій наданий розподіл стадій РЯ у хворих досліджуваних груп, абс. (%).

Таблиця 1

| Стадія РЯ | 1 група (n=90) | II група (n=42) | P |
|-----------|----------------|-----------------|-------|
| 1C | 11(9,4 %) | 2(9,1 %) | >0,05 |
| IIA | 14(6,3 %) | 2(9,1 %) | >0,05 |
| IIB | 12(15,6 %) | 4(18,2 %) | >0,05 |
| IIC | 14(12,5 %) | 3(13,6 %) | >0,05 |
| IIIA | 19(15,6 %) | 4(18,2 %) | >0,05 |
| IIIB | 22(21,8 %) | 4(18,2 %) | >0,05 |
| IIIC | 31(18,8 %) | 3(13,6 %) | >0,05 |

У таблиці 2 показаний аналіз клініко-анамнестичних характеристик пацієнток обох груп, який підтверджує достовірну відсутність відмінностей за всіма досліджуваними показниками (табл. 2).

Таблиця 2

| Розглянутий критерій | I група (основна) n=70 | | II група (контрольна) n=42 | | P |
|---|---------------------------|------|----------------------------------|--------|-------|
| | Абс. | % | Абс. | % | |
| 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | 6 |
| Професійні шкідливості | 21 | 65,6 | 14 | 63,6 | >0,05 |
| Порушення індексу маси тіла | 17 | 53,1 | 11 | 50,0 % | >0,05 |
| Порушення менструальних функцій | 18 | 56,3 | 15 | 68,2 | >0,05 |
| Обтяжений репродуктивний анамнез | 11 | 34,4 | 7 | 31,8 | >0,05 |
| Обтяжений сімейний анамнез | 25 | 78,1 | 16 | 72,7 | >0,05 |
| Супутня ендокринна патологія | 10 | 31,3 | 7 | 31,8 | >0,05 |
| Супутня патологія молочних залоз | 13 | 40,6 | 8 | 36,4 | >0,05 |
| Супутня патологія органів шлунково-кишкового тракту | 11 | 34,4 | 7 | 31,8 | >0,05 |

Таким чином, отримані дані дозволяють судити про те, що досліджувані групи були сформовані рандомізовано і можуть бути порівняними.

У таблиці 3 наданий порівняльний аналіз стану системи оксиду азоту в організмі хворих РЯ, рефрактерних і чутливих до хіміотерапії препаратами платини [вміст нітритів у плазмі крові та сечі ($M \pm m$)].

Таблиця 3

| Досліджуване середовище | I група (n=70) | II група (n=42) | Достовірність, P |
|-------------------------|------------------------|-------------------------|------------------|
| Плазма крові | $6,1 \pm 1,5$ мкмоль/л | $10,3 \pm 1,2$ мкмоль/л | $p < 0,05$ |
| Сеча | $3,9 \pm 0,6$ мкмоль/л | $4,1 \pm 0,4$ мкмоль/л | $p > 0,05$ |

При аналізі активності оксиду азоту в крові пацієнток першої групи було виявлено, що середня концентрація нітритів у плазмі крові хворих РЯ з резистентністю пухлини до хіміотерапії препаратами платини склала $6,1 \pm 1,5$ мкмоль/л, тоді як у групі хворих без виявленого рецидиву пухлини (чутливих до препаратів платини) - $10,3 \pm 1,2$ мкмоль/л, тобто спостережувана відмінність статистично достовірна. Більше того, порівняння активності оксиду азоту в сечі пацієнток обох груп не виявило достовірного розходження цих показників. Зміст нітритів в сечі жінок першої групи склало $3,9 \pm 0,6$ мкмоль/л, тоді як концентрація даного метаболіту оксиду азоту в сечі хворих РЯ, чутливих до платинової хіміотерапії, дорівнювала $4,1 \pm 0,4$ мкмоль/л. Ця обставина дозволяє судити про те, що різна активність оксиду азоту в плазмі крові пацієнток обох груп не є результатом посилення екскреції метаболітів даної речовини сечовидільною системою, або відмінностей у вмісті прекурсорів NO в раціонах харчування.

При гістохімічній оцінці активності NO-синтази в судинах пухлинної яєчникової тканини хворих, чутливих до препаратів платини, визначалися дрібні, сіруваті, з легким жовтуватим відтінком гранули диформаганів. Гранули були розсіяні ближче до внутрішнього контуру судини. Епітелій слизової оболонки характеризувався наявністю частини клітин з сірувато-жовтим або сірувато-коричневим забарвленням цитоплазми. В інших клітинах контур тіла позначений дрібними сіруватими гранулами. У стромі тканини яєчників визначалися поля мишастого дифузного забарвлення, на тлі яких були клітини з тілами, контурованими дрібними сіруватими або чорними гранулами. Також визначалися окремі залізисті крипти, в яких тіла частин клітин мали жовтуватий контур. У першій групі розподіл активності NO-синтази в тканині яєчників абс. % був наступним (табл. 4).

Таблиця 4

| Активність NO-синтази | I група (n=32) | II група (n=22) | Достовірність, P |
|------------------------|----------------|-----------------|------------------|
| Висока активність | - | 3(13,6 %) | p<0,05 |
| Помірна активність | - | 8(36,4 %) | p<0,05 |
| Слабка активність | 3(9,4 %) | 11(50,0 %) | p<0,05 |
| Слідові активність | 11(34,4 %) | - | p<0,05 |
| Відсутність активності | 18(56,3 %) | - | p<0,05 |

Високої тканинної активності оксиду азоту в першій групі не спостерігалось, а в другій групі вона склала 13,6 % (3 жінки). Помірна активність NO-синтази в тканині яєчників була виявлена у 8(36,4 %) пацієнок з аденокарциномою яєчників, чутливої до хіміотерапії препаратами платини, тоді як у групі хворих із резистентними до платини пухлинами помірної активності оксиду азоту в тканині яєчників виявлено не було. При цьому слабка і слідова активність оксиду азоту були зареєстровані у 3(9,4 %) і 11(34,4 %) хворих першої групи - відповідно, тоді як відсутність активності NO-синтази була виявлена в 56,3 % (18 пацієнок) випадків. У той же час, помірна і слабка активність NO-синтази відзначалася у 8(36,4 %) і 11(50,0 %) пацієнок другої групи - відповідно. Слідова активність оксиду азоту або її відсутність не відзначалися в жодному випадку в групі хворих РЯ без виявленого рецидиву протягом 5 років спостереження,

Слід зазначити, що у жінок, в яких при гістологічному дослідженні виявлялися: соковитість забарвлення ядер і вираженість цитоплазми клітин стромі, візуальний ефект накопичення ядер цитоплазми, неправильність конфігурації розширених крипт, стало підставою для діагностики в них проліферативних процесів тканини яєчників. Проведення гістохімічного дослідження активності NO-синтази показало наступне: у просвіті судин і в лакунах визначалися еритроцити жовтувато-коричневого або коричневого забарвлення (фіг. 1); строма проявляла сірувате дифузне забарвлення, на тлі якого видно клітини з сірувато пофарбованою цитоплазмою, що має м'який жовтуватий відтінок. У деформованих клітинах цитоплазма епітеліоцитів має сірувате, але більш густе, ніж у стромі, забарвлення, з легким рожевим відтінком. Обстеження пацієнок, у яких проліферація яєчкової тканини доповнювалася наявністю поліпозних розростань по внутрішній оболонці капсули (фіг. 2), не виявило відмінностей активності NO-синтази по відношенню до наведеного вище опису. Єдиною особливістю даних випадків була наявність у стромі тканини яєчників окремих витягнутих клітин, цитоплазма яких мала дифузне, жовтувато-коричнєве забарвлення цитоплазми.

- у досліджуваних групах не було виявлено достовірної кореляції між стадією захворювання клініко-анамнестичними характеристиками хворих на рак яєчників і чутливістю пухлини до препаратів платини;

- загальна активність оксиду азоту у хворих аденокарциномою яєчників, рефрактерних до платинової хіміотерапії, достовірно нижче такої в групі пацієнок з аденокарциномою яєчників, чутливою до терапії препаратами платини;

- місцева активність оксиду азоту у хворих аденокарциномою яєчників, рефрактерних в платиновій хіміотерапії, достовірно нижче такої в групі пацієнок з аденокарциномою яєчників, чутливою до терапії препаратами платини;

- виявлене достовірне зниження активності системи оксиду азоту у хворих з аденокарциномою яєчників, резистентної до препаратів платини, є свідченням достовірної більш вираженої дизрегуляційної патології і зниження саногенезу у таких хворих. Стан системи оксиду азоту в організмі пацієнок впливає на чутливість або резистентність пухлини до хіміотерапії препаратами платини.

У порівнянні з прототипом запропоноване технічне рішення за рахунок оригінального підходу до прогнозування платинорезистентності в хворих на рак яєчника, а саме - визначення активності оксиду азоту як маркера чутливості рака яєчника до платинової хіміотерапії, дозволяє з високим ступенем вірогідності прогнозувати платинорезистентність або чутливість пухлини до хіміотерапії препаратами платини, підвищити доступність застосування, завдяки низьких економічних витрат на його виконання.

Джерела інформації:

1. Аксель М.А., Барінов В.В., Бокин Л.І. Лекції з онкогінекології. - М.: МЕДпресс-інформ, 2009. - 425 с.

2. Бохман Я.В. Лекції з онкогінекології. - М.: МІА, 2007. - 304 с.

3. Переводчикова Н.І. Керівництво по хіміотерапії пухлинних захворювань. - М.: Мед., 2005. - 698 с.

4. Корман Д.Б. Основи протипухлинної хіміотерапії. -М.: Практична медицина. - 2006. - 503 с.
5. Клінічна онкогінекологія / під ред. В.П. Козаченко. - М.: Медицина, 2005. - 376 с.: іл.
6. Свинціцький В.С. Комплексне лікування хворих на злоякісні пухлини яєчника. Автореф. дис. докт. мед. н.: 14.01.07. - К., 2010. - 24 с.

5

ФОРМУЛА КОРИСНОЇ МОДЕЛІ

- 10 Спосіб прогнозування платинорезистентності у хворих на рак яєчника з використанням біохімічних та імуногістохімічних досліджень крові і тканини пухлини яєчника, який **відрізняється** тим, що проводять оцінку стану системи оксиду азоту шляхом визначення рівнів нітратів та нітритів у сироватці крові і активності синтази оксиду азоту в тканині пухлини яєчника і при зниженні показників активності оксиду азоту як у крові, так і в тканині пухлини яєчника судять про наявність резистентності до лікування препаратами платини.

Комп'ютерна верстка Л. Литвиненко

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