



УКРАЇНА

(19) **UA** (11) **115376** (13) **C2**
(51) МПК (2017.01)
A61B 10/00
G01N 33/48 (2006.01)

МІНІСТЕРСТВО
ЕКОНОМІЧНОГО
РОЗВИТКУ І ТОРГІВЛІ
УКРАЇНИ

(12) ОПИС ДО ПАТЕНТУ НА ВІНАХІД

- (21) Номер заявки: **а 2016 01525**
(22) Дата подання заявки: **19.02.2016**
(24) Дата, з якої є чинними права на винахід: **25.10.2017**
(41) Публікація відомостей про заяву: **28.08.2017, Бюл.№ 16**
(46) Публікація відомостей про видачу патенту: **25.10.2017, Бюл.№ 20**
(72) Винахідник(и):
Грабовий Олександр Миколайович (UA),
Колесник Олена Олександрівна (UA),
Антонюк Сергій Анатолійович (UA),
Савчин Тарас Михайлович (UA)
(73) Власник(и):
НАЦІОНАЛЬНИЙ ІНСТИТУТ РАКУ,
вул. Ломоносова, 33/43, м. Київ, 03022 (UA)

- (56) Перелік документів, взятих до уваги експертизою:
Вміст ДНК у ядрах клітин аденокарцином товстої кишки та експресія Bcl-2 і p53 / Грабовий О.М., Антонюк С.А., Сільченко В.П. та ін. // Клиническая онкология. - №2 (18). - С. 18 - 21
UA 41944 U, 10.06.2009
RU 2234099 C1, 10.08.2004
Prediction of survival prognosis after surgery in patients with symptomatic metastatic spinal cord compression from non-small cell lung cancer / Mingxing L., Yaosheng L., Chuanghao T. et al. // BMC Cancer. - 2015. - Vol. 15. - P. 853 - 861
Survival Prediction of Patients with Advanced Cancer: The Predictive Accuracy of the Model Based on Biological Markers / Nobutaka Kikuchi, Kaori Ohmori, Shinichi Kuriyama et al. // Journal of Pain and Symptom Management. - 2007. - Vol. 34. - no. 6. - P. 600 - 606
The expression of multiple proteins as prognostic factors in colorectal cancer: Cathepsin D, p53, COX-2, Epidermal Growth Factor Receptor, C-erbB-2, and Ki-67 / I.Y. Shin, N.Y. Sung, Y.S. Lee et al. // Gut and Liver. - 2014. - Vol 8, № 1. - P. 13-23
Грабовий О.М. Мітотична активність та вміст нуклеїнових кислот у ядрах клітин епітеліальних пухлин товстої кишки / О.М. Грабовий, С.А. Антонюк, Є.А. Воробей // Патологія. - 2013. - № 2 (28). - С. 13-16
Вживання пацієнтів з хронічною серцевою недостатністю та систолічною дисфункцією лівого шлуночка в залежності від даних клініко-лабораторних та інструментальних методів обстеження (за даними однорічного проспективного спостереження) / Воронков Л.Г., Ільницька М.Р., Бабич П.М. // Biomedical and biosocial anthropology. - 2014. - Vol. 23. - P. 95 - 102

(54) СПОСІБ ПРОГНОЗУВАННЯ ВИЖИВАНOSTІ ПРИ АДЕНОКАРЦИНОМІ ТОВСТОЇ КИШКИ

(57) Реферат:

Винахід належить до способу прогнозування виживаності при аденокарциномі товстої кишки шляхом гістологічного дослідження з визначенням ступеня дедиференціювання, індексу проліферації Ki-67, вмісту ДНК, кількості ядерцевих організаторів, шляхом розрахунку

UA 115376 C2

кумулятивної функції ризику для різних часових інтервалів та її трансформування у розрахунок кумулятивної виживаності, і, таким чином, удвічі підвищено якість прогнозування виживаності, які ґрунтуються на використанні ступеня дедиференціювання пухлин (G), що наразі є загальновизнаним самостійним гістологічним критерієм прогнозу.

Винахід належить до галузі медицини, а саме до онкології та патологічної анатомії, і може використовуватися для прогнозування виживаності хворих на аденокарциному товстої кишки.

Відомий спосіб прогнозування при аденокарциномі товстої кишки базується на визначенні середнього вмісту ДНК в ядрах пухлинних клітин, що у свою чергу корелює зі стадією захворювання [1]. Але такий підхід до оцінки властивостей пухлини та її потенціалу є

неправомірним через мінливість вмісту ДНК в ядрах клітин аденокарциноми товстої кишки, пов'язаної з різними патогенетичними механізмами виникнення пухлин та їх гетерогенністю [2]. За прототип вибрано спосіб прогнозування виживаності при аденокарциномі товстої кишки (The expression of multiple proteins as prognostic factors in colorectal cancer: Cathepsin D, p53, COX-2, Epidermal Growth Factor Receptor, C-erbB-2, and Ki-67 / I.Y. Shin, N.Y. Sung, Y.S. Lee [et al.] // Gut and Liver. - 2014. - Vol. 8, № 1. - P. 13-23), за яким визначають низку параметрів, пов'язаних з експресією певних білків (Cathepsin D, p53, COX-2, EGFR, c-erbB-2, and Ki-67), та їх кореляцію з виживаністю.

Позитивним у прототипі є те, що використання способу підвищує достовірність прогнозу показника виживаності хворих на аденокарциному товстої кишки при застосовуванні у рутинній патогістологічній практиці.

Недоліком прототипу є те, що при визначенні прогнозу не враховується наявність та спосіб взаємодії прогностичних факторів, які розглядалися кожен окремо або як проста сума.

В основу винаходу поставлено задачу розробити спосіб прогнозування виживаності хворих на аденокарциному товстої кишки шляхом багатофакторної оцінки стану ядерного апарату пухлинних клітин з урахуванням зціплення ознак, що включає вміст ДНК в ядрах пухлинних клітин, стан ядерцевих організаторів, проліферативну активність пухлинних клітин, що дасть можливість удвічі підвищити якість прогнозування виживаності порівняно з тими ознаками, які ґрунтуються на використанні ступеня дедиференціювання пухлини (G), що наразі є загальновизнаним самостійним гістологічним критерієм прогнозу.

Поставлена задача вирішується наступним чином.

Визначають вміст ДНК в ядрах 30 клітин аденокарциноми товстої кишки (АТК) на препаратах, забарвлених за Ейнарсоном, розраховують середнє значення вмісту ДНК (кількість ДНК диплоїдного стану = 1) у ядрах клітин пухлини (NDNA). За середнім вмістом ДНК у ядрах клітин пухлини поділяють на три підгрупи:

D - середній вміст до 1,2;

D+ - середній вміст від 1,2 до 2,5;

T+ - середній вміст понад 2,5.

На зрізах, імпрегнованих сріблом, визначають кількість ядерцевих організаторів (NOR) в ядрі 50 клітин АТК та розраховують середнє значення кількості ядерцевих організаторів для пухлини (nNOR). Для пухлини визначають частку клітин, у якій виявляють експресію Ki-67.

При оцінці прогностичної значимості поєднання показників, отриманих при дослідженні 130 епітеліальних пухлин товстої кишки та 11 зразків умовно нормальної товстої кишки, було проведено низку процедур прямого і зворотного включення змінних у регресійну модель. При цьому були використані як окремі фактори, так і їх комбінації, у яких простежувався зв'язок між ними (Табл. 1).

Таблиця 1

Параметри і змінні моделей при регресійному аналізі виживаності при аденокарциномах товстої кишки залежно від комбінації факторів

Модель	N	LR	p(M)	AUC	p(AUC)	Параметри	β	SE	p(β)	Exp(β)
I	74	140,69	<0,01	0,339	0,05	G (G2, G3)	1,870	0,504	<0,01	6,487
II	74	142,15	0,03	0,391	0,18	nNOR/Ki67	0,159	0,063	0,01	1,172
						nNOR×NDNA	0,239	0,080	<0,01	1,269
III	74	130,44	<0,01	0,605	0,18	nNOR×NDNA/Ki67	- 0,069	0,028	0,01	0,933
						nNOR/Ki67	0,173	0,066	<0,01	1,188
						nNOR×NDNA	0,265	0,086	<0,01	1,303
						nNOR×NDNA/Ki67	- 0,074	0,028	0,01	0,929
						G (G2, G3)	2,031	0,517	<0,01	7,623

Таблиця 1

Параметри і змінні моделей при регресійному аналізі виживаності при аденокарциномах товстої кишки залежно від комбінації факторів

Модель	N	LR	p(M)	AUC	p(AUC)	Параметри	β	SE	p(β)	Exp(β)
III _s	74	109,43	0,022	0,620	0,14	nNOR/Ki67	0,166	0,065	0,01	1,181
						nNOR×NDNA	0,257	0,086	<0,01	1,294
						nNOR×NDNA/Ki67	-0,071	0,028	0,01	0,932
IV	74	125,65	<0,01	0,663	0,04	nNOR/Ki67	0,279	0,087	<0,01	1,322
						nNOR×NDNA	0,211	0,094	0,03	1,235
						nNOR×NDNA/Ki67	-0,118	0,038	<0,01	0,889
						G (G2, G3)	1,932	0,531	<0,01	6,901
						Плоїдність (D, D+, T+)	1,459	0,692	0,04	4,301
V	65	109,78	<0,01	0,722	<0,01	nNOR/Ki67	0,378	0,107	<0,01	1,459
						nNOR×NDNA	0,232	0,104	0,03	1,262
						nNOR×NDNA/Ki67	-0,159	0,049	<0,01	0,853
						G (G2, G3)	1,936	0,557	<0,01	6,929
						Плоїдність (D+, T+)	2,006	0,801	0,01	7,431
Vs	65	88,16	<0,01	0,725	<0,01	nNOR/Ki67	0,367	0,109	<0,01	1,443
						nNOR×NDNA	0,213	0,1	0,03	1,237
						nNOR×NDNA/Ki67	-0,155	0,05	<0,01	0,856
						G (G2, G3)	1,969	0,583	<0,01	7,161

N - кількість випадків, включених в аналіз,

LR - значення тесту відношення правдоподібності (Likelihood ratio), AUC - значення площі під ROC-кривою,

β - значення коефіцієнта,

SE - стандартна помилка коефіцієнта,

p(X) - достовірність відповідного коефіцієнта (статистично значущі при p<0,05),

Exp(β) - e^{β} , III_s - варіант моделі III, де ступінь G є стратами Vs - варіант моделі V, де кількість ДНК (D+, T+) є стратами, і яка пропонується як робоча для визначення виживаності хворих на АТК.

Для оцінки відносної якості моделі було використано тест відношення достовірності (LR, нижчі значення відповідають більш високій якості) і ROC-аналіз (площа під кривою (AUC) відображає якість моделі: 0,5-0,6 - низька; 0,6-0,7 - середня; 0,7-0,8 - висока; 0,8-0,9 - дуже висока; 0,9-1 - найвища).

За формулою (1), що відображає модель виживаності Vs, визначають значення ризику для кожного часового інтервалу (місяці):

$$h_i(t) = h_0(t) \times e^{\left(0,367 \times \frac{nNOR}{Ki67} + 0,213 \times nNOR \times NDNA - 0,155 \times \frac{nNOR \times NDNA}{Ki67} + 1,969 \times G\right)} \quad (1), \text{ де:}$$

$h_i(t)$ - функція ризику в часі t ;

$h_0(t)$ - базисна функція ризику;

nNOR - кількість ЯО;

Ki67 - індекс проліферації (значення від 0 до 1);

NDNA - середній вміст ДНК у пухлині в одиницях плоїдності;

G - ступінь дедиференціювання ($G_2 = 0$, $G_3 = 1$)

Значення базисної функції ризику ($h_0(t)$), отримані емпірично на основі дослідної вибірки, відрізняються для пухлин з різним значенням середнього вмісту ДНК у ядрах клітин АТК (відмінність для груп D+ та T+) (Табл. 2.)

Таблиця 2

Значення базисної функції ризику $h_0(t)$ для часових інтервалів (t , місяці)

	Підгрупи пухлин за середньою кількістю ДНК у ядрах пухлинних клітин									
	D+(2c*(1,2-2,5))						T+(2c*(>2,5))			
t , міс.	3	5	7	9	11	36	7	8	10	11
$h_0(t)$	0,001	0,005	0,007	0,009	0,014	0,023	0,012	0,047	0,076	0,182

Таким чином, отримуємо значення функції ризику в різні моменти часу, високі значення даної функції свідчать, що пацієнт має нижчі шанси сприятливого перебігу захворювання. Для зручності, значення функції ризику переводимо у кумулятивну виживаність, що має розмірність ймовірностей (0-1). Для цього скористаємось формулою (2):

$$p_i(t) = \frac{1}{h_i(t) - h_{i-1}(t) + 1} \times p_{i-1}(t) \quad (2), \text{ де:}$$

$p_i(t)$ - значення кумулятивної виживаності у час t ;

10 i - порядковий номер часового інтервалу.

Прикладом конкретного використання способу є прогнозування виживаності 10 пацієнтів з АТК ступеня дедиференціювання G2 та G3, за матеріалами біопсій або вилучених при оперативному втручанні з середнім вмістом ДНК, що є більшим за диплоїдний.

Отриманий матеріал фіксували в забуференому 10 % формаліні з pH 7,4 та ущільнювали у парафіні із застосуванням гістіопроектора Histo-5 (Milestone, Italy). З отриманих блоків виготовляли гістологічні зрізи товщиною 5 мкр за допомогою мікротома Microm HM325 (ThermoScientific, Germany). Зрізи забарвлювали гематоксилін-еозином для загальної оцінки пухлини, галлоціанін-хромовим галуном за Ейнарсеном (pH 1,62, 37 °C, 24 год.) для виявлення вмісту нуклеїнових кислот (НК) у клітинах, що досліджували [4, 5]. Для кожного випадку частину зрізів обробляли РНК-азою для екстракції РІЖ. Ядерцеві організатори виявляли імпрегнацією азотнокислим сріблом. Імуногістохімічні реакції проводили з моноклональним мишиним антитілом проти антигену Ki-67 людини (клон MIB-1, Dako, Denmark) за протоколом виробника з використанням системи детекції EnVision™ FLEX (Dako, Denmark). Зрізи дозбарвлювали гематоксиліном Gill.

Отримані препарати вивчали та фотографували за допомогою мікроскопа Nikon Eclipse 80i з камерою DS-5SMc/L2 за стандартизованих умов (збільшення мікроскопа x400, 1280x960 пікселів RGB). На зображеннях з препаратів, забарвлених галлоціанін-хромовим галуном після екстракції РНК у 30 клітинах кожної пухлини, за допомогою системи аналізу зображення ImageJ 1,46, визначали: площу перетину ядра клітини (NArea), питому оптичну щільність ядра клітини (NDM), інтегративну оптичну щільність ядра клітини (NIntDen), а також розраховували вміст у ньому сумарної кількості ДНК (NDNA). За одиницю кількості ДНК у ядрі використовували її середній вміст у ядрах малих лімфоцитів (2c), що знаходилися у стромі пухлини. За середнім вмістом ДНК у ядрах клітин, пухлини були поділені на три підгрупи:

D - середній вміст ДНК до 1,2;

35 D+ - середній вміст ДНК від 1,2 до 2,5;

T+ - середній вміст ДНК понад 2,5.

На зрізах, імпрегнованих сріблом у 50 клітинах, визначали кількість NOR (nNOR). Для кожної пухлини визначали частку клітин, у яких виявляли експресію Ki-67.

Отримавши необхідні дані для аналізу (Таблиця 2), було проведено обчислення виживаності для даних пацієнтів з використанням формул (1) та (2), які наведено в таблиці 3:

Таблиця 3

Вихідні дані та результати розрахунку ймовірності виживаності пацієнтів з АТК для груп з різним середнім вмістом ДНК (плоідність: D+/T+)

	№ п/п	G	NDNA	nNOR	Ki67	h	Ймовірність дожиття до t, міс.							tф	5-р в.
							3	5	7	9	11	36	60		
D+	1	G2	1,83	1,46	0,93	2,02	1,00	0,99	0,99	0,98	0,97	0,95	0,95	60	+
	2	G2	1,64	2,74	0,20	12,14	0,99	0,94	0,92	0,90	0,85	0,76	0,76	36	-
	3	G2	1,74	2,15	0,10	17,97	0,98	0,92	0,88	0,85	0,78	0,67	0,67	11	-
	4	G3	1J4	1,96	0,89	18,3	0,98	0,92	0,88	0,85	0,78	0,67	0,67	7	-
	5	G3	1,26	2,53	0,09	1715,40	0,37	0,05	0,01	0	0	0	0	3	-
	№ п/п	G	NDNA	nNOR	Ki67	h	Ймовірність дожиття до t, міс.							tф	5-р в.
							7	8	10	11	24	36	60		
T+	6	G2	2,55	2,75	0,41	3,68	0,96	0,85	0,77	0,55	0,55	0,55	0,55	60	+
	7	G2	2,79	1,16	0,88	1,82	0,98	0,92	0,87	0,73	0,73	0,73	0,73	60	+
	8	G2	5,09	3,48	0,68	5,05	0,94	0,80	0,70	0,46	0,46	0,46	0,46	11	-
	9	G3	3,10	1,13	0,07	2,35	0,97	0,90	0,84	0,67	0,67	0,67	0,67	60	+
	10	G3	2,72	2,20	0,50	20,14	0,81	0,47	0,3	0,1	0,1	0,1	0,1	8	-

№ п/п - порядковий номер пацієнта, для якого визначали прогноз виживаності;

G - ступінь дедиференціювання пухлини;

NDNA - середній вміст ДНК у ядрах пухлинних клітин;

h - ризик смерті у 5-річний період;

nNOR - кількість ядерцевих організаторів;

Ki67 - індекс проліферації;

tф - фактичний (реальний) час виживаності пацієнта (міс.);

5-р в. - прогноз п'ятирічної виживаності ("+" - так, "-" - ні).

Таким чином, запропонований спосіб прогнозу виживаності при АТК забезпечує удвічі вищу якість та є більш інформативною, ніж визначення тільки сприятливого чи несприятливого перебігу захворювання [3].

Джерела інформації:

1. Пат. № 2234099, RU, МПК G01N 33/96. Спосіб дифференціальної діагностики стадій канцерогенеза / Автандилов Г.Г.; заявитель и патентовладелец Российская медицинская академия последипломного образования (RU). - № 2003107326/15; заявл. 18.03.03; опубл. 10.08.04.

2. Грабовий О.М. Мітотична активність та вміст нуклеїнових кислот у ядрах клітин епітеліальних пухлин товстої кишки / О.М. Грабовий, С.А. Антонюк, Є.А. Воробей // Патологія. - 2013. - № 2 (28). - С. 13-16.

3. The expression of multiple proteins as prognostic factors in colorectal cancer: Cathepsin D, p53, COX-2, Epidermal Growth Factor Receptor, C-erbB-2, and Ki-67 / I.Y. Shin, N.Y. Sung, Y.S. Lee [et al] // Gut and Liver. - 2014. - Vol 8, № 1. - P. 13-23 (прототип).

4. Лупа Х. Основы гистохимии (пер. с нем.) / Х. Лупа - М.: Мир, 1980. - 344 с.

5. Ташке К. Введение в количественную цито-гистологическую морфологию (пер. с рум.). - М., 1980. - 192 с.

ФОРМУЛА ВИНАХОДУ

Спосіб прогнозування виживаності хворих на аденокарциному товстої кишки, що включає гістологічне дослідження з визначенням ступеня дедиференціювання, індексу проліферації Ki-67, вмісту ДНК, кількості ядерцевих організаторів, який **відрізняється** тим, що кумулятивну функцію ризику для різних часових інтервалів розраховують за формулою:

$$h_i(t) = h_0(t) \times e^{\left(0,367 \times \frac{nNOR}{Ki-67} + 0,213 \times nNOR \times NDNA - 0,155 \times \frac{nNOR \times NDNA}{Ki-67} + 1,969 \times G\right)} \quad (1), \text{ де:}$$

$h_i(t)$ - функція ризику в часі t (місяці);

$h_0(t)$ - базисна функція ризику в часі t (місяці);

n_{NOR} - кількість ядерцевих організаторів;

K_i – 67 - індекс проліферації (значення від 0 до 1);

NDNA - середній вміст ДНК у пухлині в одиницях плоїдності;

G - ступінь дедиференціювання ($G_2=0$, $G_3=1$),

- 5 та трансформують у кумулятивну виживаність, що має розмірність ймовірностей (0-1) за формулою (2):

$$p_i(t) = \frac{1}{h_i(t) - h_{i-1}(t) + 1} \times p_{i-1}(t) \quad (2), \text{ де:}$$

$p_i(t)$ - значення кумулятивної виживаності у часі t ;

i - порядковий номер часового інтервалу, i

- 10 де одержане значення 0,5-0,6 відображає низьку виживаність; 0,6-0,7 - середню; 0,7-0,8 - високу; 0,8-0,9 - дуже високу; та 0,9-1 - найвищу виживаність.

Комп'ютерна верстка А. Крулевський

Міністерство економічного розвитку і торгівлі України, вул. М. Грушевського, 12/2, м. Київ, 01008, Україна

ДП "Український інститут інтелектуальної власності", вул. Глазунова, 1, м. Київ – 42, 01601