



УКРАЇНА

(19) **UA** (11) **136692** (13) **U**
(51) МПК (2019.01)
G01N 1/00
G01N 33/53 (2006.01)
A61B 10/00

МІНІСТЕРСТВО
ЕКОНОМІЧНОГО
РОЗВИТКУ І ТОРГІВЛІ
УКРАЇНИ

(12) ОПИС ДО ПАТЕНТУ НА КОРИСНУ МОДЕЛЬ

<p>(21) Номер заявки: u 2019 02956</p> <p>(22) Дата подання заявки: 25.03.2019</p> <p>(24) Дата, з якої є чинними права на корисну модель: 27.08.2019</p> <p>(46) Публікація відомостей про видачу патенту: 27.08.2019, Бюл.№ 16</p>	<p>(72) Винахідник(и): Думанський Юрій Васильович (UA), Бондар Олександр Вадимович (UA), Роша Лариса Григорівна (UA), Столярчук Євген Олександрович (UA)</p> <p>(73) Власник(и): ОДЕСЬКИЙ НАЦІОНАЛЬНИЙ МЕДИЧНИЙ УНІВЕРСИТЕТ, пров. Валіховський, 2, м. Одеса, 65082 (UA)</p>
--	--

(54) СПОСІБ ОЦІНКИ ЧУТЛИВОСТІ ПУХЛИНИ ДО ЛІКУВАННЯ ХВОРИХ ІЗ МІСЦЕВОРОЗПОВСЮДЖЕНИМИ ФОРМАМИ РАКУ МОЛОЧНОЇ ЗАЛОЗИ

(57) Реферат:

Спосіб оцінки чутливості пухлини до лікування хворих із місцеворозповсюдженими формами раку молочної залози (МР РМЗ) включає проведення імуногістохімічного дослідження, у якому визначають проліферативну активність пухлини з використанням маркера PCNA до та після проведення неoad'ювантної селективної внутрішньоартеріальної поліхіміотерапії СВАПХТ. При референтних значеннях рівня білка PCNA <25 % прогнозують чутливість пухлини до лікування.

UA 136692 U

Корисна модель належить медицині, а саме онкології, і може використовуватись для прицільного визначення оцінки чутливості пухлини до лікування хворих із місцеворозповсюдженими формами раку молочної залози.

Відомо, що в основі патогенезу більшої частини онкологічних патологій лежить екзогенне або ендогенне пошкодження структури ДНК або порушення репарації цих пошкоджень з формуванням та накопиченням негативних мутацій у ключових генах з набуттям клітиною функціональних та морфологічних ознак автономізації [1]. Надалі біологічна поведінка майбутньої пухлини (швидкість росту, ризик метастазування, а отже клінічний перебіг та результат захворювання) визначається якісними та кількісними змінами в генетичному апараті. Інтегральною незалежною характеристикою, що описує сформований фенотип пухлини, є її проліферативна активність (PrA). Важливою рисою PrA є її чітка кореляція зі ступенем та динамікою морфологічної та біологічної злоякісності неоплазми. Отже, цей показник має дві важливі клінічні ролі: предиктивна (визначення клінічного перебігу захворювання та ризиків метастазування) і описова (непряма характеристика поточного стану пухлини та її змін у відповідь на проведене лікування) [2].

Для оцінки проліферативної активності пухлини відомі різні підходи: оптично-мікроскопічні (підрахунок фігур мітозів), електронно-мікроскопічні (проточна цитофлуориметрія) та їхні імуногістохімічні модифікації: прямі (використання мічених нуклеотидів) і непрямі (визначення специфічних антигенів).

В основу корисної моделі поставлена задача вдосконалення способу оцінки ефективності лікування у хворих з онкологічною патологією МЗ за допомогою визначення проліферативної активності клітин МР РМЗ шляхом лабораторної діагностики антигену PCNA, визначення його діагностичного референтного значення та співвідношення результату з біологічними та морфологічними властивостями пухлини для прогнозування чутливості пухлини до неoad'ювантної поліхіміотерапії та вибору шляху її введення, що дозволить у подальшому вибирати адекватну тактику лікування жінок з вказаною патологією.

Поставлена задача вирішується тим, що спосіб оцінки чутливості пухлини до лікування хворих із місцеворозповсюдженими формами раку молочної залози (МР РМЗ), згідно з корисною моделлю, проводять імуногістохімічне дослідження, у якому визначають проліферативну активність пухлини з використанням маркера PCNA до та після проведення неoad'ювантної селективної внутрішньоартеріальної поліхіміотерапії СВАПХТ, і при референтних значеннях рівня білка PCNA < 25 % прогнозують чутливість пухлини до лікування.

Білок PCNA (ядерний антиген проліферуючих клітин) вперше був описаний у кінці 1970-х років як антиген у сироватці хворих на системний червоний вовчак. PCNA є негістоновим білком ДНК-клемпу масою 90 кДа, який діє як фактор процесивності для дельта-ДНК-полімерази в клітині і відіграє важливу роль в реплікації ДНК, репарації ДНК, ремодельованні хроматину, епігенетичних процесах і когезії сестринських хроматид [3].

Гомотримірна молекула PCNA, будучи амбівалентною основою топологічного зв'язку ДНК-полімерази, запобігає її дисоціації від матриці ДНК та збільшує швидкість роботи до 1000 разів у порівнянні з непроцесованим ферментом. Кодується однойменним геном. Експресія PCNA знаходиться під контролем E2F-вмісних транскрипційних факторів [3].

Структурно PCNA є мультимерним комплексом із трьох однакових мономерів, що мають торичну внутрішню форму та шестигранну зовнішню з локусами зв'язку з ДНК-полімеразою та іншими білками для виконання різних метаболічних процесів ДНК на вершинах. У процесі роботи субодиниці білка збираються у вигляді симетричної асоціації навколо подвійної нитки ДНК в області вилки реплікації і "ковзають" по ній разом з полімеразою. "Ковзання" полегшується наявністю шару молекул води в центральній порі клемпу; цей шар розділяє поверхню білка і ДНК. Збірка і утилізація молекули проводиться регуляторним реплікаційним фактором C [3].

PCNA має найвищу експресію під час G₁ і S-фаз; його експресія зменшується в G₂ і M-фазах. Цей маркер також присутній на ранній фазі G₀ через його довге напівжиття - 8-20 годин. Референтні значення PCNA корелюють зі ступенем проліферації клітин або їхньої неопластичної трансформації [4].

Індекс проліферативної активності має різні референтні значення для різних сценаріїв онкологічної патології. На основі ІГХ діагностичного дослідження для РМЗ виділені такі типи: низькоагресивна пухлина - PCNA менше 25 % і високоагресивна - PCNA більше 25 % [4].

Спосіб виконують наступним чином.

До дослідження залучено 30 пацієнток з первинно неоперабельними формами раку молочної залози T_{4A}-DN₀₋₃M₀, що отримували комплексне лікування на базі Донецького обласного протипухлинного центру та Університетської клініки Одеського національного

медичного університету в період 2009 по 2015 рр. На неoad'ювантному етапі усім пацієнткам проведено 2-3 курси регіонарної або 3-4 курси системної поліхіміотерапії з метою циторедукції та досягнення пухлиною операбельного стану.

5 Вибірка була стандартизована за віковими та клінічними параметрами. Віковий склад: [27-42 роки], середній вік - $34\pm 7,2$ років. Усім пацієнткам проведено ІГХ-дослідження PCNA у рамках розширеного діагностичного пошуку, на рівні з рутинними лабораторними і інструментальними дослідженнями організму та морфологічними дослідженнями біопсійного матеріалу. Після аналізу отриманих даних усі пацієнтки розподілені на 2 групи.

10 До першої досліджуваної групи увійшли 15 пацієток (50 %) з неоперабельними формами МР РМЗ, яким в якості неoad'ювантного курсу була проведена селективна внутрішньоартеріальна поліхіміотерапія - СВАПХТ.

До другої досліджуваної групи увійшли 15 пацієток (50 %) з неоперабельними формами МР РМЗ, яким як неoad'ювантний курс була проведена системна поліхіміотерапія - СПХТ.

15 Для аналізу змін імуногістохімічних даних була застосована статистика динамічних рядів, для оцінки значущості цих змін - непараметричний тест χ^2 Мак-Немара, а для порівняння результатів між групами - непараметричний тест χ^2 Пірсона.

У першій групі до проведення ПХТ референтні показники PCNA становили: [$<25\%$] у 8 пацієток (53 %) з $M\pm m=20,4\pm 1,4$; [$>25\%$] у 7 пацієток (47 %) з $M\pm m=27,9\pm 1,9$. Після проведення ПХТ референтні показники PCNA мали таку динаміку: у групі з низьким рівнем PCNA [$<25\%$] середній рівень маркера знизився до $7,6\pm 0,8$ ($p<0,001$), а в групі з високим показником PCNA [$>25\%$] - до $24,9\pm 1,3$ ($p=0,748$).

20 У другій групі до проведення ПХТ референтні показники PCNA становили: [$<25\%$] у 7 пацієток (47 %) з $M\pm m=21,5\pm 2,1$; [$>25\%$] у 8 пацієток (53 %) з $M\pm m=27,4\pm 1,4$. Після проведення ПХТ референтні показники PCNA мали таку динаміку: у групі з низьким рівнем PCNA [$<25\%$] середній рівень маркера знизився до $14,2\pm 1,0$ ($p=0,141$), а в групі з високим показником PCNA [$>25\%$] - до $25,4\pm 2,0$ ($p=0,748$).

Серед пацієток з низьким рівнем PCNA [$<25\%$] за критерієм χ^2 Пірсона має місце статистично достовірною перевагою на користь результатів лікування серед пацієток першої групи (χ^2 Пірсона = 4,023, $p=0,045$ за критичних значень 3,841 та 0,05 - відповідно).

30 Для першої групи: середня тривалість життя хворих $3,4\pm 0,9$ роки, загальна 3-річна виживаність – 10 пацієток (66 %). Досягнення можливості проведення оперативного лікування - 13 пацієток (86,7 %). Віддалені метастази у період 36 місяців після проведення оперативного лікування – 5 пацієток (33 %).

35 Для другої групи: середня тривалість життя хворих $2,3\pm 1,0$ роки, загальна 3-річна виживаність – 6 пацієток (40 %). Досягнення можливості проведення оперативного лікування - 9 пацієток (60 %). Віддалені метастази у період 36 місяців після проведення оперативного лікування - 5 пацієток (33 %).

При детальному дослідженні не виявлено кореляції метастатичного потенціалу пухлини з рівнем PCNA.

40 Отже, PCNA є перспективним показником для оцінки проліферативної активності пухлини при розробці унікальних програм спеціалізованої онкологічної допомоги з урахуванням індивідуальних особливостей організму пацієнта та маркерного профілю новоутворення для уникнення неефективних уніфікованих методів лікування на основі емпіричного підходу.

45 При референтних значеннях рівня білка PCNA $<25\%$ спосіб СВАПХТ є більш ефективним методом неoad'ювантного ведення пацієнтів з первинно неоперабельними формами раку молочної залози та має кращі результати за результативністю гальмування та реверсії прогресування пухлинного росту.

50 Таким чином, за запропонованим способом з високим ступенем достовірності можна ефективно оцінювати біологічні властивості пухлини, передбачати перебіг захворювання (сприятливий або несприятливий), визначати схильність пухлини до метастазування (висока або низька), шляхи розповсюдження пухлини (поетапний або метастатичний) та обирати оптимальну тактику неoad'ювантної ПХТ (регіонарна або системна) у складі комплексного протипухлинного лікування.

Джерела інформації:

55 1. Sueishi M, Takagi M., Yoneda Y. The forkhead-associated domain of Ki-67 antigen interacts with the novel kinesin-like protein Hklp2. The Journal of Biological Chemistry. 2000. 275:28888-28892. <https://doi.org/10.1074/jbc.M003879200>

60 2. Viale G., Regan M.M., Mastropasqua M.G. et al. Predictive value of tumor Ki-67 expression in two randomized trials of adjuvant chemoendocrine therapy for node-negative breast cancer. Journal of the National Cancer Institute. 2009. 100 (3): 207-212. <https://doi.org/10.1093/jnci/djm289>

3. Strzalka, W., Ziemienowicz, A. Proliferating cell nuclear antigen (PCNA): a key factor in DNA replication and cell cycle regulation. *Annals of Botany*. 2010. 107(7): 1127-1140. <https://doi.org/10.1093/aob/mcq243>.

5 4. Hoege C, Pfander B., Moldovan G.L., Pyrowolakis G., Jentsch S. "RAD6-dependent DNA repair is linked to modification of PCNA by ubiquitin and SUMO". *Nature*. 2002. 419 (6903): 135-141. <https://doi.org/10.1038/nature00991>.

ФОРМУЛА КОРИСНОЇ МОДЕЛІ

10 Спосіб оцінки чутливості пухлини до лікування хворих із місцеворозповсюдженими формами
раку молочної залози (МР РМ3), що включає проведення імуногістохімічного дослідження, у
якому визначають проліферативну активність пухлини з використанням маркера PCNA до та
після проведення неoad'ювантної селективної внутрішньоартеріальної поліхіміотерапії СВАПХТ,
15 і при референтних значеннях рівня білка PCNA <25 % прогнозують чутливість пухлини до
лікування.

Комп'ютерна верстка В. Юкін

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