



УКРАЇНА

(19) UA

(11) 118578

(13) C2

(51) МПК

G01N 33/53 (2006.01)

G01N 33/483 (2006.01)

МІНІСТЕРСТВО
ЕКОНОМІЧНОГО
РОЗВИТКУ І ТОРГІВЛІ
УКРАЇНИ

(12) ОПИС ДО ПАТЕНТУ НА ВІНАХІД

- (21) Номер заявки: а 2016 09367
- (22) Дата подання заявки: 09.09.2016
- (24) Дата, з якої є чинними права на винахід: 11.02.2019
- (41) Публікація відомостей про заявку: 12.03.2018, Бюл.№ 5
- (46) Публікація відомостей про видачу патенту: 11.02.2019, Бюл.№ 3
- (72) Винахідник(и):
Грабовий Олександр Миколайович (UA),
Савчин Тарас Михайлович (UA),
Антонюк Сергій Анатолійович (UA)
- (73) Власник(и):
НАЦІОНАЛЬНИЙ ІНСТИТУТ РАКУ,
вул. Ломоносова, 33/43, м. Київ, 03022 (UA)

- (56) Перелік документів, взятих до уваги експертизою:
Грабовий О. М., Антонюк С. О., Сільченко В. П., Воробей Є. А., Савчин Т.М. Вміст ДНК у ядрах клітин аденокарцином товстої кишки та експресія Bcl-2 і p53 / О. М. Грабовий, С. О. Антонюк, В. П. Сільченко, Є. А. Воробей, Т. М. Савчин // Клиническая онкология. - 2015. - № 18 (2). - С.18-21
Грабовий О. М., Антонюк С. О., Воробей Є. А., Савчин Т.М. Колоректальний рак: патогенетична інформативність гістологічного дослідження / О. М. Грабовий, С. А. Антонюк, Є. А. Воробей, Т. М. Савчин // Клиническая онкология. - 2014. - № 16 (4). - С.62-69
Menezes H.L., Jucá M.J., Gomes E.G., Nunes B.L., Costa H.O., Matos D. Analysis of the immunohistochemical expressions of p53, bcl-2 and Ki-67 in colorectal adenocarcinoma and their correlations with the prognostic factors / H.L. Menezes, M.J. Jucá, E.G. Gomes, B.L. Nunes, H.O. Costa, D. Matos // Arq. Gastroenterol. - 2010 Apr-Jun. - 47(2). - P.141-147
Gurzu S., Jung J., Mezei T., Pávai Z. The correlation between the immunostains for p53 and Ki67 with bcl-2 expression and classical prognostic factors in colorectal carcinomas/ S. GURZU, J. JUNG, T. MEZEI, Z. PÁVAI // Romanian Journal of Morphology and Embryology. - 2007. - 48(2). - P.95-99
Barresi V., Reggiani L.B., Ieni A. et al. Histological grading in colorectal cancer: new insights and perspectives / V. Barresi, L.B. Reggiani, A. Ieni, R.A. Caruso, G. Tuccari // Histol. Histopathol. - 2015 Sep. - 30(9). - P.1059-1067
Nabi U., Nagi A.H., Sami W. Ki-67 proliferating index and histological grade, type and stage of colorectal carcinoma / U. Nabi, A.H. Nagi, W. Sami // J. Ayub. Med. Coll. Abbottabad. - 2008 Oct-Dec. - 20(4). - P.44-48

UA 118578 C2

(54) СПОСІБ ВИЗНАЧЕННЯ СТУПЕНЯ ДИФЕРЕНЦІЮВАННЯ АДЕНОКАРЦИНОМИ ТОВСТОЇ КИШКИ

- (57) Реферат:

Спосіб визначення ступеня диференціювання аденокарцином товстої кишки (G), що включає гістологічне дослідження пухлини, у якому визначають показники середнього вмісту ДНК у ядрах клітин пухлини (NDNA, $1=2c$), середню кількість ядерцевих організаторів (nNOR) та їх середній об'єм (v/NOR), відсоток клітин пухлини, які експресують Ki-67, Bcl-2, p53, та розраховують за формулою логістичної регресії $P(y)$ - належність пухлин до різних G використовуючи константу та показники з коефіцієнтами послідовно у 3 етапи, й у якому встановлюють при $P(y) < 0,76$, що пухлина доброякісна, при $P(y) > 0,76$ – аденокарцинома, при $P(y) < 0,716$ - G1, при $P(y) > 0,716$ – G2/G3, при $P(y) < 0,216$ - G2, при $P(y) > 0,216$ - G3.

Заявка належить до галузі медицини, а саме до онкології та патологічної анатомії, і може використовуватися для визначення ступеня диференціювання аденокарциноми товстої кишки.

Відомий спосіб визначення ступеня диференціювання (грейд, Grade, G) аденокарциноми товстої кишки базується на встановленні частки залозистоподібних елементів у складі пухлини.

5 Цей показник на сьогодні є основним гістологічним прогностичним критерієм при аденокарциномах товстої кишки і, за рекомендацією ВООЗ, є обов'язковою складовою патогістологічного висновку у повсякденній практиці, та в доповнення до системи pTNM, вважається ключовим для визначення прогнозу та способу лікування. Так, аденокарциному відносять до: високодиференційованої (G1), якщо частка залозистоподібних елементів складає 10 більш як 95 %; помірно диференційованої (G2) - від 50 до 95 %; та низькодиференційованої (G3) - менше 50 % [1].

За найближчий аналог вибрано спосіб визначення ступеня диференціювання аденокарцином товстої кишки [Histological grading in colorectal cancer: new insights and perspectives / V. Barresi, L.R. Bonetti, A. Ieni, [et al.] // Histol. Histopathol. -2015. - Vol. 30. - P. 1059-1067.], за яким при застосуванні об'єктива 4x мікроскопа в пухлині виявляють ділянку з найбільшою кількістю низькодиференційованих кластерів (втратили залозистоподібну будову), потім у цій ділянці із застосуванням об'єктива 20x мікроскопу підраховують кількість низькодиференційованих кластерів у полі зору, та залежно від кількості визначених таких кластерів пухлини поділяють на грейди: <5-G1, від 5 до 9-G2, ≥10-G3.

20 Позитивним у найближчому аналогу є те, що завдяки високій стандартизації критеріїв, які використовуються у цьому способі, градація аденокарцином має більш високу відтворюваність порівняно з класифікацією ВООЗ.

Недоліком найближчому аналогу є те, що визначення ступеня диференціювання пухлини є суб'єктивним та пов'язане з труднощами розпізнавання низькодиференційованих кластерів та трансверсально зрізаних крипт або фрагментів пухлинних залоз, візуальною оцінкою атипії клітин у складі неопластичної залози, необхідністю виключення з аналізу ділянок пухлини з вираженою лімфоцитарною інфільтрацією, оцінка яких також є візуальною і, тому, суб'єктивною.

В основу винаходу поставлено задачу розробити спосіб визначення ступеня диференціювання аденокарциноми товстої кишки шляхом гістологічного дослідження пухлини з визначенням показників середнього вмісту ДНК у ядрах клітин пухлини (NDNA, 1=2с), середньої кількості ядерцевих організаторів (nNOR) та їх середнього об'єму (vNOR), відсотка пухлинних клітин, які експресують Ki-67, Bcl-2 і p53, та розрахунку за формулою логістичної регресії у три етапи значення ймовірності подій, при порівнянні яких з встановленими коефіцієнтами визначають грейд пухлини, що дасть можливість підвищити точність та відтворюваність 35 визначення ступеня диференціювання аденокарциноми товстої кишки.

Поставлена задача вирішується наступним чином.

Визначають вміст ДНК в ядрах 50 клітин аденокарциноми товстої кишки (АК) на препаратах, забарвлених за Ейнарсоном, та 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 два ранги: D - середній вміст до 1,2 умовних одиниць (у.о.); P - середній вміст понад 1,2 у.о.

На зрізах, імпрегнованих сріблом, визначають кількість ядерцевих організаторів (NOR) в ядрах 50 клітин АК та розраховують середнє значення кількості ядерцевих організаторів для пухлини (nNOR), а також діаметр кожного NOR з наступним розрахунком їх загального (vNOR) та середнього об'єму ядерця (vNOR). Для кожної пухлини визначають відсоток клітин які виявляють експресію Ki-67, Bcl-2 та p53. За наявністю/відсутністю експресії пухлини оцінюють як Bc1-2+/Bc1-2" та p53+/p53".

У результаті отримують перелік критеріїв, притаманних пухлині: NDNA - середній вміст ДНК; nNOR - середня кількість ядерцевих організаторів; vNOR - загальний об'єм ядерцевих організаторів у ядрі; vNOR - середній об'єм ядерцевого організатора; Ki-67, Bc1-2(%), p53 (%) - відсоток клітин пухлини, що експресують відповідний маркер; ранг пухлини за середньою кількістю ДНК: D (NDNA до 1,2) - 1, P (NDNA понад 1,2)- відповідає значення 2; фенотип за p53: 1 відповідає p53+, 0 - p53-; фенотип за Bcl-2: 1 відповідає Bc1-2+, 0 - Bcl-2-.

В основі визначення ступеня диференціювання лежить метод ієрархічної класифікації, при якому відбувається послідовний поділ множини об'єктів на підмножини, утворюючи 55 деревоподібну структуру. При цьому основою розподілу є певна вибрана ознака, яка найкраще розподіляє вказані підмножини. У цьому випадку основою розподілу виступає не ознака, а сукупність ознак, сформованих на основі логістичної регресії, точка відсічення для якої попередньо задана. Значення критеріїв підставляють у наступну формулу (логістичної регресії):

$$P(y) = \frac{1}{1 + e^{-z}},$$

де: $P(y)$ - ймовірність настання події y ;

$z = \beta_0 + \beta_1 x_1 + \dots + \beta_n x_n$;

β_0 - константа;

β_n - коефіцієнти регресії;

x_n - значення показників, що досліджуються.

Процес моделювання проведено на клінічному матеріалі 127 біопсій або вилученому під час оперативного втручання у пацієнтів з АК та доброякісними новоутвореннями: умовно нормальна кишка, контроль (K) - 10; поліпи та аденоми (B) - 15; АК G1 (G1) - 27; АК G2 (G2) - 62; АК G3 (G3) - 13.

На першому етапі загальна множина пухлин була поділена на доброякісні і злоякісні новоутворення. На другому етапі множина злоякісних поділена на високодиференційовані АК (G1) і АК помірно та низькодиференційовані (G2 і G3). На третьому етапі відбувається розподіл АК G2 та АК G3. Таким чином, визначені три послідовні логістичні моделі зі своїм набором параметрів для встановлення грейду АК.

Для оцінки якості отриманих моделей використали ROC-аналіз (значення площі під кривою). Для пошуку оптимальних значень точки відсічення був побудований комплексний графік кривих чутливості та специфічності для усіх трьох етапів розрахунків, тобто використаний графічний метод пошуку оптимуму. Були отримані наступні константи, набори параметрів з коефіцієнтами регресії та точки відсічення для кожного з етапів:

- для визначення належності пухлини до доброякісної чи аденокарциноми: $= -10,06$, використовують 6 параметрів з : 5,51NDNA, 3,6nNOR, $-1,95\text{NDNA} \cdot \text{nNOR}$, 0,03 Ki 67 (%), 0,07p53 (%), $-3,48 \cdot \text{p53} \pm$; точка відсічення 0,76;

- для визначення належності пухлини до високодиференційованої (G1) чи помірно-/низькодиференційованої аденокарциноми (G2/G3): $= 2,11$, 6 параметрів з : 1,97NDNA, 2,2v/NOR, 0,01p53 (%), -9nNOR/Ki67 , $3,4\text{NDNA} \cdot \text{nNOR/Ki67}$, $-2,5\text{D/P}$; точка відсічення 0,716;

- для визначення належності пухлини до помірнодиференційованої (G2) чи низькодиференційованої (G3) аденокарциноми: $= -1,26$ і використовують 4 параметри з : $-0,04\text{Vcl-2}(\%)$, $-0,03\text{p53}(\%)$, $+2,28\text{p53} \pm$, $+1,67\text{Vcl-2} \pm$, точка відсічення 0,216.

Визначення ступеня диференціювання відбувається наступним чином. Визначають кількісні значення згаданих раніше параметрів. Підставляють у формулу (1) значення параметрів для першого етапу. Отримують значення від 0 до 1. Якщо отримане значення менше 0,76 - пухлину відносять до доброякісної, якщо вище - до злоякісної. Далі підставляють у формулу (1) значення критеріїв для другого етапу й отримують значення, якщо воно нижче 0,716 аденокарциному відносять до групи G1, вище - до G2 чи G3. Для розподілення останніх необхідно вирішити рівняння логістичної регресії із значеннями критеріїв для третього етапу, якщо отримане за формулою значення менше 0,216, отже це аденокарцинома G2, якщо значення вище 0,216, тоді це аденокарцинома G3. Перевагою такого підходу, є те, що використовувати дані формули можна непослідовно, а окремо, для уточнення того чи іншого ступеня диференціювання без додаткових розрахунків.

Прикладом конкретного використання способу є визначення ступеня диференціювання аденокарцином товстої кишки у 10 пацієнтів, за матеріалами біопсій або вилученого під час оперативного втручання.

Отриманий матеріал фіксували в забуференому 10 % формаліні з pH 7,4 та ущільнювали у парафіні із застосуванням гістіопроектора Histo-5 (Milestone, Італія). З отриманих блоків виготовляли гістологічні зрізи товщиною 5 мкм за допомогою мікротома Microm HM325 (Thermo Scientific, Німеччина). Зрізи забарвлювали гематоксилін-еозином для загальної оцінки пухлини, галоціанін-хромовим галуном за Ейнарсоном (pH 1,62, 37 °C, 24 год.) для виявлення вмісту нуклеїнових кислот (НК) у клітинах, що досліджували [3, 4]. Для кожного випадка частину зрізів обробляли РНК-азою для екстракції РНК [3]. Ядерцеві організатори виявляли імпрегнацією азотнокислим сріблом. Імуногістохімічні реакції з моноклональними мишиними антитілами проти антигену Ki-67 людини (clone MIB-1, Dako, Данія), BCL2 онкопротеїну (clone 124, Dako, Данія), p53 протешу (clone DO-7, Dako, Данія) проводили за протоколом виробника з використанням системи детекції EnVision FLEX (Dako, Данія). 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, 1280 × 960 пікселів RGB). На зображеннях з препаратів, забарвлених галоціанін-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 (2с), що знаходились у стромі пухлини. За середнім вмістом ДНК у ядрах клітин, пухлини були поділені на два ранги: D - середній вміст до 1,2 у.о.; P - середній вміст понад 1,2 у.о. На зрізах, імпрегнованих сріблом, у 50 клітинах визначали площу перетину ядра клітини, кількість NOR (nNOR) та діаметр кожного NOR з наступним розрахунком їх загального об'єму (vNOR) та середнього об'єму ядерця (v/NOR). Для кожної пухлини визначали відсоток клітин, які виявляли експресію Ki-67, Bcl-2 і p53. Також, пухлини за наявністю/відсутністю експресії Bcl-2 пухлини оцінювали як Bcl-2⁺/Bcl-2⁻. Для p53 позитивними вважали з часткою мічених клітин понад 10 %.

Отримавши необхідні дані для аналізу, провели визначення ступеня диференціювання для даних пацієнтів з використанням трьох моделей, а саме формули логістичної регресії та перелічених параметрів (Табл.).

Таблиця

Параметри стану ядер клітин аденокарцином товстої кишки, ступінь диференціювання пухлин визначений візуально за прототипом та розрахований за розробленою моделлю

№	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
NDNA, у.о.	2,43	1,74	1,58	2,27	1,27	1,3	2,74	1,07	2,45	3,1
nNOR	2,34	2,15	2,58	2,57	1,58	1,16	1,58	3,22	4,66	1,13
v/NOR	0,82	0,92	1,21	1,35	0,48	2,96	1,73	0,91	0,87	3,7
Ki-67 (%)	38,3	10	51,06	35	40	62,5	30	35,9	2,78	6,9
Bcl-2 (%)	0	12,25	0	50	18	0	4	0	4	7,32
p53 (%)	0	8	76	85,71	100	0	52,08	94	100	51,06
D/P	2	2	2	2	2	2	2	1	2	2
p53 [±]	0	0	1	1	1	0	1	1	1	1
Bcl-2 [±]	0	1	0	1	1	0	1	0	1	1
G _e	B	G2	G1	G3	G3	G2	G2	G1	G2	G3
G _p	G1	G1	G3	G2	G3	B	G3	G1	G1	G3

№ - порядковий номер пацієнта;

NDNA - кількість ДНК (у.о.);

nNOR - кількість ядерцевих організаторів;

v/NOR - середній об'єм ядерцевого організатора;

Ki-67 (%), Bcl-2 (%) і p53 (%) - індекс мічення пухлинних клітин відповідним маркером;

D/P - ранг пухлини за кількістю ДНК (D-1, P - 2);

p53[±] - фенотип пухлини за експресією p53 (p53⁺ - 1, p53⁻ - 0);

Bcl-2[±] - фенотип пухлини за експресією Bcl-2 (Bcl-2⁺ - 1, Bcl-2⁻ - 0);

G_e - гістологічний грейд пухлини емпірично визначений (за існуючою методикою);

G_p - гістологічний грейд пухлини розрахований (з використанням розробленої моделі).

Таким чином, запропонований спосіб визначення ступеня диференціювання товстої кишки дає можливість визначити грейд пухлини на основі об'єктивних критеріїв, що забезпечує високу точність та відтворюваність.

Джерела інформації:

1. Carcinoma of the colon and rectum. / S.R. Hamilton, F.T. Bosnian, P. Boffetta, [et al.] // In: WHO classification of tumors of the digestive system. Bosnian T., F. Carneiro, R.H. Hruban and N.D. Theise (eds). Lyon: IARC Press. - 2010. - P. 134-146.

2. Histological grading in colorectal cancer: new insights and perspectives / V. Barresi, L.R. Bonetti, A. Ieni, [et al.] // Histol. Histopathol. - 2015. - Vol. 30. - P. 1059-1067 (прототип).

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

4. Ташке К. Введение в количественную цито-гистологическую морфологию: пер. с рум. / К. Ташке. - М., 1980. - 192 с.

ФОРМУЛА ВИНАХОДУ

- Спосіб визначення ступеня диференціювання аденокарцином товстої кишки (G), що включає гістологічне дослідження пухлини, який **відрізняється** тим, що визначають показники середнього вмісту ДНК у ядрах клітин пухлини (NDNA, $1=2c$), середню кількість ядерцевих організаторів (nNOR) та їх середній об'єм (v/NOR), відсоток клітин пухлини, які експресують Ki-67, Bcl-2, p53, та розраховують за формулою логістичної регресії $P(y)$ - належність пухлин до різних G, використовуючи константу та показники з коефіцієнтами послідовно у 3 етапи:
- на першому етапі для визначення належності пухлини до доброякісної чи аденокарциноми використовують 6 параметрів NDNA, vNOR, Ki67 (%), p53(%), $NDNA \cdot nNOR$, $p53^{+/-}$, розраховують $P(y)$, де $z_1 = -10,06 + 5,51 \cdot NDNA + 3,6 \cdot nNOR - 1,95 \cdot NDNA \cdot nNOR + 0,03 \cdot Ki67(\%) + 0,07 \cdot p53(\%) - 3,28 \cdot p53^{+/-}$, та при $P(y) < 0,76$ встановлюють, що пухлина доброякісна, при $P(y) > 0,76$ - аденокарцинома;
 - на другому етапі для визначення належності пухлини до вискодиференційованої (G1) чи помірно-/низкодиференційованої аденокарциноми (G2/G3) використовують 6 параметрів, при цьому $z_2 = -2,11 - 1,97 \cdot NDNA + 2,2 \cdot v/NOR + 0,01 \cdot p53(\%) - 9 \cdot nNOR/Ki67 + 3,4 \cdot NDNA \cdot nNOR/Ki67 + 2,5 \cdot D/P$, встановлюють при $P(y) < 0,716$ - G1; при $P(y) > 0,716$ - G2/G3;
 - на третьому етапі для визначення належності пухлини до помірнодиференційованої (G2) чи низкодиференційованої (G3) аденокарциноми використовують 4 параметри, при цьому $z_3 = -1,26 - 0,04 \cdot Bcl-2(\%) - 0,03 \cdot p53(\%) + 2,28 \cdot p53^{+/-} + 1,67 \cdot Bcl-2^{+/-}$, встановлюють при $P(y) < 0,216$ - G2; при $P(y) > 0,216$ - G3.

Комп'ютерна верстка А. Крижанівський

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