



УКРАЇНА

(19) **UA** (11) **142315** (13) **U**
(51) МПК
G01N 33/48 (2006.01)

МІНІСТЕРСТВО РОЗВИТКУ
ЕКОНОМІКИ, ТОРГІВЛІ ТА
СІЛЬСЬКОГО ГОСПОДАРСТВА
УКРАЇНИ

(12) ОПИС ДО ПАТЕНТУ НА КОРИСНУ МОДЕЛЬ

(21) Номер заявки: u 2019 12203	(72) Винахідник(и): Лукавенко Іван Михайлович (UA), Гарбузова Вікторія Юріївна (UA), Атаман Олександр Васильович (UA), Циндренко Наталія Леонідівна (UA), Гарбузова Єлизавета Антонівна (UA)
(22) Дата подання заявки: 24.12.2019	
(24) Дата, з якої є чинними права на корисну модель: 25.05.2020	
(46) Публікація відомостей про видачу патенту: 25.05.2020, Бюл.№ 10	(73) Власник(и): СУМСЬКИЙ ДЕРЖАВНИЙ УНІВЕРСИТЕТ, вул. Римського-Корсакова, 2, м. Суми, 40007 (UA)

(54) СПОСІБ ОБҐРУНТУВАННЯ ПОКАЗАНЬ ДО ХІРУРГІЧНОГО ЛІКУВАННЯ ХВОРИХ НА ПРОЛІФЕРАТИВНУ ДОБРОЯКІСНУ ДИСПЛАЗІЮ МОЛОЧНИХ ЗАЛОЗ ЗА ПОЛІМОРФІЗМОМ PvuII ГЕНА РЕЦЕПТОРА ЕСТРАДІОЛУ АЛЬФА

(57) Реферат:

Спосіб обґрунтування показань до хірургічного лікування хворих на проліферативну доброякісну дисплазію молочних залоз за PvuII поліморфізмом гена рецептора естрадіолу альфа (EsR α) включає фізикальне та інструментальне обстеження хворого на доброякісну дисплазію молочної залози, а саме проведення ультразвукового дослідження молочних залоз, мамографії, рентгенографії органів грудної порожнини, комп'ютерної томографії органів грудної порожнини та ультразвукового дослідження органів черевної порожнини за показаннями, тонкогілкової біопсії чи трепан-біопсії пухлини з наступними цитологічним, морфологічним та імуногістохімічним дослідженнями. Додатково проводять генетичне дослідження периферійної венозної крові хворого для виділення геномної ДНК з наступним виявленням даних про PvuII поліморфізм гена EsR α , та при виявленні генотипу C/C за PvuII поліморфізмом гена EsR α роблять висновок про необхідність хірургічного лікування хворого на доброякісну дисплазію молочних залоз.

UA 142315 U

Корисна модель належить до галузі теоретичної та клінічної медицини, а саме до хірургії, онкології, патофізіології та медичної генетики, і може бути використана для удосконалення вибору показань до хірургічного лікування хворих на проліферативну доброякісну дисплазію молочних залоз (ДДМЗ).

5 Передпухлинні хвороби молочної залози (МЗ) набули останнім часом значної актуальності. Відомо, що проліферативна доброякісна дисплазія молочної залози (ДДМЗ) є фоном для розвитку раку молочної залози (РМЗ) [Robinson D. R. et al., 2011]. Установлено, що ризик розвитку РМЗ при непроліферативній формі ДДМЗ перевищує популяційний в 1,27 раза; при помірній проліферації - в 1,88 раза, а при атипівій проліферації - у 4,24 раза [Харченко В.П., 10 2009]. Однак прийняті на цей час методики оцінювання клінічних, інструментальних показників та морфологічних змін МЗ недостатньо інформативні та нерідко є інвазивними, що обмежує їх використання в широкому загалі, особливо під час вагітності та при лактації. Крім цього методи дослідження орієнтовані на вогнищеві утворення, що виявляються при клінічному, ехографічному та/або рентгенологічному дослідженні. Однак доведено, що у 56 % хворих 15 атипова гіперплазія МЗ проходить без розвитку вузла [Байлюк Е.Н., 2010]. Таким чином, діагностика ДДМЗ недостатньо уніфікована, як наслідок, лікування має певні труднощі.

Міжнародна програма "Геном людини" визначила бурхливий розвиток й активне впровадження в клінічну практику молекулярної медицини і зокрема генодіагностики. Уявлення про існування "генів схильності", мутантні алелі яких сумісні з народженням і життям у 20 постнатальному періоді, істотно розширили погляди на патогенез мультифакторних хвороб. Такі гени можуть сприяти розвитку того чи іншого захворювання. З огляду на поширеність захворюваності на ДДМЗ пошук механізмів її ранньої діагностики є важливим. Оскільки ця хвороба сьогодні розглядається як етап від проліферації до атипії, своєчасне виявлення дисплазії відкриває шляхи до профілактики РМЗ.

25 Серед генів, поліморфізми яких можуть відігравати певну роль у розвитку ДДМЗ, є ген рецептора естрадіолу альфа ($EsR\alpha$). У 1991 з'явилися перші та суперечливі повідомлення про те, що перебудови у локусі кодування $EsR\alpha$ пов'язані з розвитком проліферації й малігнізації в МЗ [Zurran P. et al., 1991]. На сьогодні $PvuII$ є найбільш вивченим поліморфізмом гена $EsR\alpha$. Проте інформації щодо впливу $PvuII$ на розвиток проліферативних форм ДДМЗ в Україні не 30 знайдено. Перспективними методами у розмежуванні осіб із підвищеним ризиком проліферативних змін при дисплазії МЗ є молекулярно-генетичні дослідження. Визначення у пацієнтів генотипу за $PvuII$ -поліморфізмом гена $EsR\alpha$ дозволило наблизитися до кінцевої мети - визначити хворих, яким потрібне хірургічне лікування, та встановити осіб із меншим ризиком, яких можна орієнтувати на консервативну терапію.

35 Найближчим аналогом вибраний наказ МОЗ України № 645 від 30.07.2010 р. За аналогом хворі на доброякісну дисплазію молочної залози підлягають фізикальному та інструментальному обстеженню (УЗД молочних залоз, мамографія, рентгенографія ОГП, КТ ОГП та УЗД ОЧП за показаннями, тонкогістохімічна біопсія чи трепан-біопсія пухлини з наступними цитологічним, морфологічним та імуногістохімічним дослідженнями). При цьому показаннями до 40 хірургічного лікування слугують результати комплексної оцінки клінічного та інструментального обстеження, а також результати цитологічного, морфологічного та імуногістохімічного досліджень отриманих біоптатів.

Зважаючи на те, що прийняті на цей час методики оцінювання клінічних, інструментальних та морфологічних показників змін молочних залоз недостатньо інформативні та часто інвазивні, 45 що обмежує їх використання під час вагітності та лактації, а також враховуючи вплив поліморфізму $PvuII$ гена рецептора естрадіолу альфа на розвиток ДДМЗ, недоліком даного методу є те, що не проводяться генетичні дослідження з визначенням поліморфізму $PvuII$ гена рецептора естрадіолу альфа.

В основу корисної моделі поставлена задача оптимізації вибору показань до хірургічного лікування хворих на проліферативну доброякісну дисплазію молочних залоз за поліморфізмом 50 $PvuII$ гена рецептора естрадіолу альфа.

На основі отриманих об'єктивних даних про наявність носійства мінорного алеля за даним поліморфізмом можна підвищити прогностичну цінність на ранніх етапах розвитку ДДМЗ, покращити діагностику, раніше виявляти необхідність проведення хірургічного лікування та 55 запобігання розвитку малігнізації у пацієнтів групи високого ризику атипії тканини молочної залози.

Поставлена задача вирішується тим, що у способі обґрунтування показань до хірургічного лікування хворих на проліферативну доброякісну дисплазію молочних залоз за $PvuII$ поліморфізмом гена рецептора естрадіолу альфа ($EsR\alpha$), що включає фізикальне та 60 інструментальне обстеження хворого на доброякісну дисплазію молочної залози, а саме

- проведення ультразвукового дослідження молочних залоз, мамографії, рентгенографії органів грудної порожнини, комп'ютерної томографії органів грудної порожнини та ультразвукового дослідження органів черевної порожнини за показаннями, тонкогілкової біопсії чи трепан-біопсії пухлини з наступними цитологічним, морфологічним та імуногістохімічним дослідженнями,
- 5 згідно з корисною моделлю, додатково проводять генетичне дослідження периферійної венозної крові хворого для виділення геномної ДНК з наступним виявленням даних про PvuII поліморфізм гена EsR α та при виявленні генотипу C/C за PvuII поліморфізмом гена EsR α роблять висновок про необхідність хірургічного лікування хворого на доброякісну дисплазію молочних залоз.
- 10 Використання запропонованого способу дозволяє вирішити питання про доцільність хірургічного лікування хворих на проліферативну ДДМЗ та запобігання розвитку малігнізації, вирішуючи тим самим поставлену технічну задачу.
- Для визначення поліморфізму PvuII гена рецептора естрадіолу альфа було проведено обстеження 84 хворих з ДДМЗ (взято 134 зразки). Під час аналізу розподілу варіантів генотипів
- 15 за поліморфізмом PvuII гена EsR α видалених новоутворень у оперованих осіб одержали результати, подані у таблиці 1.

Таблиця 1

Частота алельних варіантів гена EsR α за поліморфізмом PvuII у пацієнтів з проліферативною формою ДДМЗ

Генотип	Частота, n	Процент, %
T/T	23	27,4
T/C	43	51,2
C/C	18	21,4
Разом	84	100

Примітка: n - кількість осіб

- 20 Доведена залежність між алельним розподілом за поліморфізмом PvuII гена EsR α + і ступенем проліферації у цій зоні (табл. 2).

Таблиця 2

Зв'язок алельних варіантів гена EsR α за поліморфізмом PvuII зі ступенем проліферативних змін при ДДМЗ

Генотип	Ступінь проліферації	
	значна проліферативна активність із тенденцією до атипових змін (3-4-го ступенів), n (%)	невиражена проліферація без атипії (1-2-го ступенів), n (%)
T/T	5 (10,4)	5 (10,4)
T/C	19 (39,6)	52 (60,5)
C/C	24 (50,0)	3 (3,5)
Разом	48 (100)	86 (100)
$\chi^2=43,142; P < 0,0001$		

Примітка: n - кількість морфологічних зразків

- 25 Визначений зв'язок між рівнем експресії EsR α і молекулярно-генетичним маркером - поліморфізмом PvuII гена EsR α . При ДДМЗ різні алельні варіанти поліморфізму PvuII можуть впливати на рівень експресії EsR α в осередках проліферації. Результати статистичного аналізу наведені у таблицях 3 і 4.

Таблиця 3

Зв'язок алельних варіантів гена EsR α за поліморфізмом PvuII залежно від рецепторного статусу при ДДМЗ

Генотип	EsR α -, n (%)	EsR α +, n (%)
T/T	32 (53,3)	4 (5,4)
T/C	28 (46,7)	43 (58,1)
C/C	0 (0)	27 (36,5)
Разом	60 (100)	74 (100)
$\chi^2=51,041$; P < 0,0001		

Примітки: n - кількість морфологічних зразків; EsR α - - рецепторнегативні зразки за експресією EsR α ; EsR α + - рецепторпозитивні зразки за експресією EsR α

Таблиця 4

Зв'язок алельних варіантів гена EsR α за поліморфізмом PvuII в оперованих із різним ступенем експресії EsR α при ДДМЗ

Генотип	Ступінь експресії EsR α , n (%)			
	негативна	слабопозитивна	помірнопозитивна	Сильно позитивна
T/T	19 (100)	17 (21,8)	0 (0)	0 (0)
T/C	0 (0)	61 (78,2)	10 (34,5)	0 (0)
C/C	(0)	0 (0)	19 (65,5)	8 (100)
Разом	19 (100)	78 (100)	29 (100)	8 (100)
$\chi^2=148,541$; P < 0,0001				

Примітка: n - кількість морфологічних зразків

При генотипі C/C ступінь експресії EsR α є сильнопозитивним, що є маркером значної проліферації з атипією.

5 Спосіб здійснюється наступним чином.

Матеріалом для аналізу слугує венозна кров. Венозну кров у досліджуваних хворих набирають в стерильних умовах у моновети об'ємом 2,7 мл з калієвою сіллю етилендіамінтетраоцтової кислоти (11,7 мМ) - ("Sarstedt", Німеччина), заморожують та зберігають за температури - 20 °С.

10 ДНК виділяють з венозної крові з використанням наборів DIAtom DNA Prep 100 ("Neogen", Україна). PvuII (rs2234693) - поліморфізм визначають методом полімеразної ланцюгової реакції (PCR) з подальшим аналізом довжини рестрикційних фрагментів (PCR-RFLP).

15 Для цього ампліфікують ділянку зазначеного гена за допомогою пари специфічних праймерів: прямого (sense) -5' CACACATCACCATTTCTCAGC 3' і зворотного (antisense) - 5' TCTAGACCACACTCAGGGTCTC 3'. Праймери синтезовані фірмою "Metabion" (Німеччина). Для ампліфікації беруть 50-100 нг ДНК і додають до суміші, що містить 5 мкл 5-кратного PCR-буфера, 1,5 мМ сульфату магнію, 200 мкМ суміші чотирьох нуклеотидтрифосфатів, по 15 пМ кожного з праймерів і 0,75 ОД Таq-полімерази ("Ферментас", Литва), об'єм доводять до 25 мкл деіонізованою водою. PCR проводять в термоциклері GeneAmp PCR System 2700 ("Applied Biosystems", США). Ампліфікація фрагмента 1-го інтрона складається із трьох циклів: денатурації - 94 °С (50 с), гібридизації праймерів - 64,5 °С (45 с) та елонгації - 72 °С (1 хв.).
 20 Потім 6 мкл продукту ампліфікації інкубують за 37 °С упродовж 18 годин із 3 ОД-рестриктази PvuII ("Thermo Scientific", США) у буфері G такого складу: 10 мМ трис-НСl (рН 7,5), 10 мМ хлориду магнію, 50 мМ NaCl і 0,1 мг/мл альбуміну. Якщо в С1943Т позиції гена ESR1 міститься
 25 тимін то ампліфікат, що складається із 392 пар основ, розщеплюється рестриктазою PvuII на два фрагменти - 342 і 50 пар основ. У разі заміни тиміну на цитозин сайт рестрикції для PvuII втрачається й утворюється один фрагмент розміром 392 пари основ. Ампліфікати після рестрикції розділяють в 2,5 % агарозному гелі, що містить 10 мкг/мл бромистого етидію.

Горизонтальний електрофорез (0,13A; 200V) проводять впродовж 35 хв. Візуалізацію ДНК після електрофорезу здійснюють за допомогою транслюмінатора ("Біоком", Росія).

Приклад конкретного випадку.

5 Пацієнтка К., 38 років, попередньо обстежена клінічно та інструментально. Основні клінічні прояви - мастодинія. Пацієнтці провели оцінку характеристик УЗД та рентгенологічної картини за шкалою BIRADS. Отримали результат - BIRADS 4. Це обґрунтовує показання до інвазійних методів діагностики. Провели гістологічне дослідження - переважає фіброепітеліальний тип проліферації. Виконали цитологічне дослідження пунктуату - виявлений активний проліферативний процес. Провели імуногістохімічне дослідження - спостерігається

10 сильнопозитивна реакція до EsR α . На основі отриманих результатів встановлено діагноз доброякісної дисплазії молочних залоз. Після цього проводять забір крові з наступним визначенням генотипу за поліморфізмом Pvull гена EsR α . Венозну кров набирають у стерильних умовах у моновет об'ємом 2,7 мл з калієвою сіллю етилендіамінтетраоцтової кислоти (11,7 мМ) - ("Sarstedt", Німеччина), заморожують та зберігають за температури -20 °С.

15 ДНК виділяють з венозної крові з використанням наборів DIAtom DNA Prep 100 ("Neogen", Україна). Pvull (rs2234693) - поліморфізм визначають методом полімеразної ланцюгової реакції (PCR) з подальшим аналізом довжини рестрикційних фрагментів (PCR-RFLP). Отриманий результат - гомозиготний стан C/C за поліморфізмом Pvull гена EsR α . Враховуючи, що останній є достовірним індикатором підвищеної проліферативної активності зі схильністю до атипових змін, пацієнтці було рекомендовано хірургічне лікування.

20

Технічний результат, який досягається при здійсненні корисної моделі, полягає у обґрунтуванні вибору показань до хірургічного лікування хворих на проліферативну доброякісну дисплазію молочних залоз з визначенням генотипів за поліморфізмом Pvull гена EsR α . Гомозиготний стан (C/C) за поліморфізмом Pvull гена EsR α є достовірним індикатором

25 підвищеної проліферативної активності зі схильністю до атипових змін, що є об'єктивним критерієм необхідності хірургічного лікування хворих на доброякісну дисплазію молочної залози. Отримані дані дозволяють контролювати модифіковані фактори ризику розвитку проліферативної доброякісної дисплазії молочних залоз, проводити профілактичні заходи, що суттєво знизить ризик розвитку ДДМЗ.

30

ФОРМУЛА КОРИСНОЇ МОДЕЛІ

Спосіб обґрунтування показань до хірургічного лікування хворих на проліферативну доброякісну дисплазію молочних залоз за Pvull поліморфізмом гена рецептора естрадіолу альфа (EsR α),

35 що включає фізикальне та інструментальне обстеження хворого на доброякісну дисплазію молочної залози, а саме проведення ультразвукового дослідження молочних залоз, мамографії, рентгенографії органів грудної порожнини, комп'ютерної томографії органів грудної порожнини та ультразвукового дослідження органів черевної порожнини за показаннями, тонкогolkової біопсії чи трепан-біопсії пухлини з наступними цитологічним, морфологічним та імуногістохімічним дослідженнями, який **відрізняється** тим, що додатково проводять генетичне дослідження периферійної венозної крові хворого для виділення геномної ДНК з наступним виявленням даних про Pvull поліморфізм гена EsR α , та при виявленні генотипу C/C за Pvull поліморфізмом гена EsR α роблять висновок про необхідність хірургічного лікування хворого на доброякісну дисплазію молочних залоз.

45

Комп'ютерна верстка О. Гергіль

Міністерство розвитку економіки, торгівлі та сільського господарства України,
вул. М. Грушевського, 12/2, м. Київ, 01008, Україна

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