

Даний винахід відноситься до медицини, а саме - до клінічної онкології та безпосередньо стосується способів лабораторного дослідження людини, які призначені для діагностики злоякісних пухлин.

Відомі способи визначення в сироватці крові окремих маркерів злоякісного тухлинного росту, що ґрунтуються, як правило, на імуноферментних реакціях взаємодії антигена та антитіла.

Підвищення рівня того чи іншого антигену в сироватці крові свідчить з вірогідністю від 30 до 60% (в залежності від локалізації та поширення злоякісної пухлини) про розвиток злоякісного росту. У зв'язку з низькою діагностичною специфічністю визначення рівня антигенів використовується в основному для моніторингу онкологічних хворих з метою виявлення рецидивів та метастазів захворювання (J.Struve. Tumour Diseases - A Clinic і Guide. Abboff GrabH, 1992, 68 p.).

У відповідності із запропонованою авторами теорією канцерогенезу вже на початковому етапі злоякісної трансформації тих чи інших клітин вони стають джерелами виділення в кров специфічних речовин (кальцій-білкових комплексів - КБК). Ці комплекси з'являються в крові незалежно від локалізації та гістологічної будови злоякісної пухлини.

На виявленні КБК в сухих мазках крові досліджуваного запропонований авторами раніше "Спосіб діагностики злоякісних пухлин людини" (патент № 19696, кл. G 01 N33/49) полягає в тому, що його здійснюють шляхом виявлення в крові досліджуваного білкових комплексів, специфічних для злоякісного росту, за рахунок того, що послідовно наносять на досліджуваний матеріал розчин комплексону, стандартну сироватку крові, потім проявник кальцій-білкових комплексів. Механізм запропонованої реакції полягає в тому, що КБК, присутні в крові онкологічного хворого, змінюють властивості еритроцитів, які після впливу спеціальних реактивів випадають в осад, утворюючи характерний темно-коричневий малюнок.

За відсутності в організмі досліджуваного злоякісного пухлинного росту еритроцити не вступають у взаємодію з реактивами, що наносяться, та при висиханні під дією сил поверхневого натягу розходяться по краях, не утворюючи характерного малюнку в центрі.

Даний метод протягом останніх 6 років пройшов багаточисленні клінічні дослідження на Україні, які підтвердили його високу чутливість та специфічність (75-90%).

Разом з тим проявився й ряд недоліків методу, що перешкоджають його широкому використанню.

До недоліків, виявлених у процесі досліджень, відносяться наступні:

1. Складність уніфікації виготовлення мазків крові. Результат реакції залежить від товщини шару еритроцитів на мазку крові.
2. Залежність реакції від стану навколишнього середовища (температури повітря, вологості, атмосферного тиску).
3. Суб'єктивна оцінка результату реакції за якісними критеріями (колір, характер малюнку).
4. Необхідність тривалого навчання медичного персоналу технології проведення методу та оцінки його результатів.

Задача, яка була поставлена перед винаходом, стосується розробки нового способу виявлення КБК, що має високу діагностичну чутливість та специфічність, який називається CST (Cancer Screening Test).

Поставлена задача досягається тим, що запропоновано спосіб діагностики злоякісних пухлин людини шляхом виявлення в крові досліджуваного білкових комплексів, специфічних для злоякісного росту, за рахунок того, що послідовно наносять на досліджуваний матеріал розчин комплексону, стандартну сироватку крові, потім проявник кальцій-білкових комплексів, і, згідно із винаходом, в якості досліджуваного матеріалу використовують сироватку крові хворого, в яку додають розчин ЕДТА або ЕГТА, потім послідовно з інтервалом у часі вводять донорську сироватку крові та розчин азотнокислого срібла, потім опромінюють денним світлом, а результат визначають спектрофотометрично за коефіцієнтом співвідношення оптичних щільностей сироватки з реактивами та без реактивів.

Крім того, згідно зі способом співвідношення реактивів, які вводяться в досліджувану сироватку, складає 1:1:1, а співвідношення реактивів та сироватки досліджуваної крові складає 1:10.

Також запропонованим способом передбачено, що використовують 6-10%, переважно 8% розчин ЕДТА або ЕГТА.

Згідно з винаходом донорську сироватку крові та розчин азотнокислого срібла вводять у досліджуваний матеріал з інтервалом у 10 хвилин, а дослідження оптичної щільності проводять на довжині хвиль 364, тах 400-410нм.

Запропонований спосіб щодо відомих раніше має переваги, які полягають:

- в уніфікації технології приготування об'єкту дослідження,
- відсутності впливу особливостей приготування об'єкту дослідження на результат реакції,
- відсутність необхідності створення спеціальних умов оточуючою середовища (температури, вологості, атмосферного тиску) при проведенні реакції,
- інструментальна оцінка об'єктивних критеріїв результату реакції,
- стабільна відтворюваність тесту та простота навчання медичного персоналу.

Згідно зі способом діагностики злоякісних пухлин людини - CST, відповідно запропонованому винаходу до крові досліджуваного послідовно додають розчин комплексону, донорську сироватку крові та розчин проявника КБК та відрізняється тим, що в якості об'єкту дослідження використовують сироватку крові, приготовану шляхом центрифугування не менше 5мл венозної крові досліджуваного, в яку додають 6-12% розчин ЕДТА або ЕГТА, через 10 хвилин донорську сироватку крові та ще через 10 хвилин - 0,2% розчин азотнокислого срібла. Після цього сироватку з доданими реактивами опромінюють лампами денного світла протягом 1 години, а потім визначають криву різної оптичної щільності сироватки з реактивами та контролю (без реактивів) на довжинах хвиль 364нм та 400-410нм.

Дослідним шляхом встановлено, що оптична щільність сироватки крові будь-якої людини в інтервалі 364-440нм має характерну криву (фіг. 1), яка утворює пік оптичної щільності в інтервалі 400-410нм, в залежності від індивідуальних особливостей людини. Максимальна точка даного піку у більшості здорових людей завжди вище рівня оптичної щільності сироватки на довжині хвилі 364нм.

При додаванні вищевказаних реактивів та опроміненні денним світлом, крива оптичної щільності сироватки здорових людей змінюється таким чином, що максимальний рівень піку в інтервалі 400-410нм стає нижче рівня, що вимірюється на 364нм (фіг. 2).

В онкологічних хворих оптична щільність піку в інтервалі 400-410нм залишається вище або порівнюється з рівнем на 364нм (фіг. 3).

Іншими словами, якщо взяти співвідношення піку оптичної щільності в інтервалі 400-410нм та на 364нм, то у здорових людей воно завжди нижче одиниці, а в онкологічних хворих - більше або дорівнює одиниці.

Таким чином, результат реакції CST оцінюється за формулою:

$$1 > \frac{D_{\max 400-410\text{нм}}}{D_{364\text{нм}}} > 1$$

Дослідним шляхом встановлено, що на вищевказану реакцію впливають концентрація реактивів; їх кількісне співвідношення між собою та сироватками досліджуваного; тривалість інтервалів між нанесенням реактивів та час експозиції на світлі.

Оптимальна концентрація комплексону повинна знаходитись у проміжку 6-12%. При більш високій концентрації співвідношення коефіцієнтів оптичної щільності  $D_{\max 400-410\text{нм}} / D_{364\text{нм}}$  завжди більше одиниці, що призводить до псевдопозитивних результатів. При концентрації менше 6% 400-410нм/  $D_{364\text{нм}}$  завжди менше одиниці, що призводить до псевдонегативних результатів.

Кількісне співвідношення комплексону, донорської сироватки та проявника в оптимальному варіанті повинно бути однаковим. Наприклад 1:1:1, або 2:2:2 й т.д. Співвідношення кожного реактиву до сироватки досліджуваного в оптимальному варіанті має дорівнювати 1:10. Дослідним шляхом встановлено, що при збільшенні кількості комплексону або проявника відносно інших реактивів збільшується число псевдопозитивних результатів. Якщо ж збільшити кількість донорської сироватки, залишаючи незмінною кількість комплексону та проявника, спостерігається зсув реакції в бік псевдонегативних результатів.

Пропорційне збільшення кількості реактивів, що додаються до сироватки досліджуваного, так само як і їх концентрації призводить до ролі в псевдопозитивних результатів. Відповідно, зменшення кількості та концентрації реактивів - до псевдонегативних результатів.

Експозиція сироватки з реактивами на світлі залежить від кількості та концентрації реактивів. При збільшенні кількості або концентрації I-го та III-го реактивів експозиція на світлі повинна бути зменшена та навпаки. Збільшення кількості II-го реактиву при зміні кількості та концентрації I-го та III-го потребує збільшення експозиції на світлі.

Свідчення, що підтверджують можливість здійснення винаходу, представлені в таблиці № 1.

Таблиця №1

Назва параметрів, що досліджуються	Кількісні показники %	П Параметри, що характеризують результат	
		Онкологічні хворі	здорові
		$D_{\max 400-410\text{нм}} / D_{364\text{нм}}$	$D_{\max 400-410\text{нм}} / D_{364\text{нм}}$
1. Концентрація розчину комплексону (ЕДТА або ЕГТА)	5	Менше 1	менше 1
	6-12	Більше або дорівнює 1	менше 1
	20	Більше 1	більше 1
2. Концентрація $\text{AgNO}_3$	0,1	Менше 1	менше 1
	0,15-0,2	Більше або дорівнює 1	менше 1
	0,3 та більше	Дорівнює 1	більше 1
3. Кількісне співвідношення сироватки, що досліджується	1:5	Більше 1	більше 1
	1:10	Більше або дорівнює 1	менше 1
	1:15 та більше	дорівнює 1	менше 1
4. Кількісне співвідношення реактивів між собою	1:1:1	Більше 1	менше 1
	2:1:1	Більше 1	більше 1
	1:2:1	Менше 1	менше 1
	1:1:2	Більше 1	більше 1

Спосіб здійснюється наступним чином:

З вени набирають 5 мл крові. Шляхом центрифугування отримують сироватку. До сироватки у співвідношенні 1:10 додають 8,0% розчин комплексону (ЕГТА або ЕДТА), через 10 хвилин донорську сироватку крові та ще через 10 хвилин - 0,2% розчин  $\text{AgNO}_3$ . Сироватку досліджуваного з реактивами ретельно перемішують та розміщують на денному світлі (приблизно 2-2,5 тис. люкс) протягом 1 години.

Потім вимірюють оптичну щільність сироватки з реактивами у відношенні до сироватки без реактивів.

Якщо коефіцієнт співвідношення оптичної щільності між піком в інтервалі 400-410нм та на 364нм більше або дорівнює одиниці, тоді результат CST оцінюють як позитивний, а якщо менше одиниці - як негативний.

Для кращого розуміння винаходу наводяться приклади конкретного виконання способу.

Приклад 1

Доставлено 10,0 крові пацієнтки М., яка була взята з вени з метою профілактичного дослідження. Під час лікарського обстеження пацієнтка скарг не пред'являла. Шляхом центрифугування була відокремлена

сироватка (4мл) в 2мл послідовно з інтервалом у 10 хвилин були додані 20мкл 8% розчину ЕДТА, 20мкл донорської сироватки крові та 20мкл 0,2% розчину азотнокислого срібла. Після ретельного перемішування пробірка з розчином була розміщена на денному світлі на 1 годину. 2мл сироватки, що залишилися, використовували в якості контролю (тобто без реактивів).

Після засвітлення вміст обох пробірок (дослідів та контролю) переливали до спеціальних кювет та розміщували для вимірювання оптичної щільності в фотоколориметр КФК-3.

Було виміряно співвідношення оптичної щільності дослідів та контролю на довжинах хвиль 364нм та в інтервалі 400-410нм. Відповідно  $D_{364} = 0,021$ ,  $D_{\max 400-410\text{нм}} = 0,025$ ,

$$D_{\text{рез.}} = \frac{D_{\max 400-410}}{D_{364}} = \frac{0,025}{0,021} = 1,2$$

Результат було оцінено як позитивний. При клінічному обстеженні в правій молочній залозі над ареолою пальпується щільне утворення до 1см в діаметрі що може зсуватись. Була проведена пункційна біопсія. Гістологічний висновок - аденокарцинома.

#### Приклад 2

Пацієнтка А., яка звернулася в поліклініку за місцем проживання зі скаргами на почуття стороннього тіла в прямій кишці. При ректороманоскопії на 8см було винайдено поліп на ніжці розміром 0,8см. Лікар-ендоскопіст не став видаляти поліп та порекомендував пацієнтці звернутись для повторного обстеження через 6 місяців. Проте пацієнтка вирішила здати аналіз крові на CST.

Було взято з вени 10,0мл крові. До сироватки (2мл), яка була отримана шляхом центрифугування, додавали послідовно з інтервалом в 10 хвилин 20мкл 8% розчину ЕДТА, 20мкл донорської сироватки та 20мкл 0,2% розчину азотнокислого срібла. Одночасно була приготована сироватка без реактивів (2мл). Після засвітлення протягом 1 години на денному світлі була проведена порівняльна оцінка оптичної щільності дослідів та контролю на фотоколориметрі КФК-3 в інтервалі довжини хвилі 364-410нм.

$D_{364} = 0,032$ ,  $D_{\max 400-410} = 0,033$ ,

$$D_{\text{рез.}} = \frac{0,033}{0,032} = 1,0$$

Результат було оцінено як позитивний. Хворій рекомендували наполягти на видаленні поліпу прямої кишки. При гістологічному дослідженні - залозистий поліп з малігнізацією.

#### Приклад 3

Хвора С., 1973 р.н. Звернулася до дільничного терапевту зі скаргами на збільшення шийних лімфовузлів. Терапевт запідозрив лімфогранулематоз та направив хвору до онкологічного диспансеру. В диспансері було проведено пункцію лімфовузла. Цитологічний висновок - елементи злоякісної лімфоми. Хворій та родичам запропонували курс опромінення та хіміотерапії. Проте вони вирішили попередньо здати кров на CST. Було доставлено 10мл крові, з якої шляхом центрифугування отримували 4мл сироватки. В 2мл - додали послідовно з інтервалом в 10 хвилин 8% розчин ЕДТА - 20мкл, донорська сироватка крові 20мкл та 0,2% розчин азотнокислого срібла - 20мкл.

Пробірка з реактивами була розміщена на 1 годину під денним світлом. З 2мл, що залишилися, було приготовлено контроль.

Після засвітлення дані результуючої оптичної щільності виявились наступні:  $D_{364} = 0,018$ ;  $D_{\max 400-410} = 0,013$ ;

$$D_{\text{рез.}} = \frac{D_{\max 400-410}}{D_{364}} = \frac{0,013}{0,018} = 0,7$$

Результат було оцінено як негативний. Пацієнтці рекомендували видалити один з лімфовузлів та зробити гістологічне дослідження перед тим, як приймати хіміотерапію. Результат гістології видаленого лімфовузла - реактивний лімфаденіт.

#### Приклад 4

Хворий М. був направлений районним урологом на визначення рівню простатичного антитіла (PSA) у зв'язку з підозрою на рак передміхурової залози. Рівень PSA в декілька разів перевищував норму. Пацієнт вирішив звернутись на обстеження на CST.

Було взято 5,0мл крові. З неї було приготовано 2мл сироватки за допомогою центрифугування. В 1мл послідовно додавали 10мкл 0,8% розчину ЕДТА, через 10 хвилин 10мкл донорської сироватки крові та ще через 10 хвилин - 10мкл 0,2% розчину азотнокислого срібла. Розчин розміщували на 1 годину під денне світло. 1 мл сироватки залишали для контролю. Результат спектрометрії був наступний:

$D_{364} = 0,037$ ;  $D_{\max 400-410} = 0,03$ ;

$$D_{\text{рез.}} = \frac{D_{\max 400-410}}{D_{364}} = \frac{0,03}{0,037} = 0,8$$

Таким чином, результат CST - негативний. Враховуючи виражене порушення сечовиділення, хворому було проведено одноразову простатектомію. Результат гістологічного дослідження - гіперплазія передміхурової залози з ділянками фіброзу та полікістоз. Злоякісного росту не винайдено.

#### Приклад 5

Хвора Б. Звернулася на обстеження з профілактичною метою. Скарг при бесіді не було.

Було взято 10мл крові. Шляхом центрифугування отримали 4мл сироватки. 2мл залишили для контролю. В 2мл додавали послідовно - 20мкл 0,8% розчину ЕДТА, через 10 хвилин - 20мкл донорської сироватки, ще через 10 хвилин - 20мкл азотнокислого срібла. Вміст пробірки ретельно перемішували та розміщували під денним світлом на 1 годину. Після засвітлення було проведено порівняльну спектрометрію оптичної щільності розчинів. Результат наступний:

$D_{364} = 0,017$ ;  $D_{\max 400-410} = 0,036$ ;

$$D_{\text{рез.}} = \frac{0,036}{0,017} = 2,1$$

Тест був оцінений як позитивний. Хворій рекомендували звернутись для обстеження в діагностичний центр. Було проведено комплексне обстеження, проте пухлин не було винайдено. Через 1 місяць у хворої з'явилась кров у сечі. При цистоскопії спостерігалась пухлина сечового міхура розміром 9см. Була проведена резекція сечового міхура з пересадкою сечоводу. Гістологічний висновок був таким: перехідно-клітинний рак.

Оцінка діагностичної інформативності способу проводилась у відповідності з рекомендацією Американського Протиракового Товариства.

З метою визначення діагностичної чутливості (ДЧ) та діагностичної специфічності (ДС) нами вивчені результати застосування способу у практично здорових осіб (донорів) та хворих злоякісними пухлинами різної локалізації.

Чутливість та специфічність визначалась за наступною таблицею:

Скринінговий спосіб	Наявність раку			
		+	-	Всього
	+	a	B	a+b
	-	c	D	c+d
Всього		a+c	b+d	

$$\text{Діагностична чутливість (ДЧ)} = \frac{a}{a+c}$$

$$\text{Діагностична специфічність (ДС)} = \frac{d}{b+d}$$

Результати обстеження пацієнтів за допомогою CST представлені в Таблиця 3 та 4.

Таблиця 3

Результати обстеження онкологічних хворих за способом CST

Локалізація пухлини	Кількість обстежених	Кількість істинно-позитивних результатів	Кількість псевдо-позитивних результатів	Діагностична чутливість
		абс.	абс.	%
Порожнина роту	3	3	-	100,0
Щитовидна залоза	1	1	-	100,0
Стравохід та шлунок	15	11	4	73,3
Молочна залоза	15	11	4	73,3
Нирки та сечовий міхур	10	9	1	90,0
Товста та пряма кишка	20	19	1	95,0
Інші	11	8	3	72,7
ВСЬОГО	75	62	13	82,7

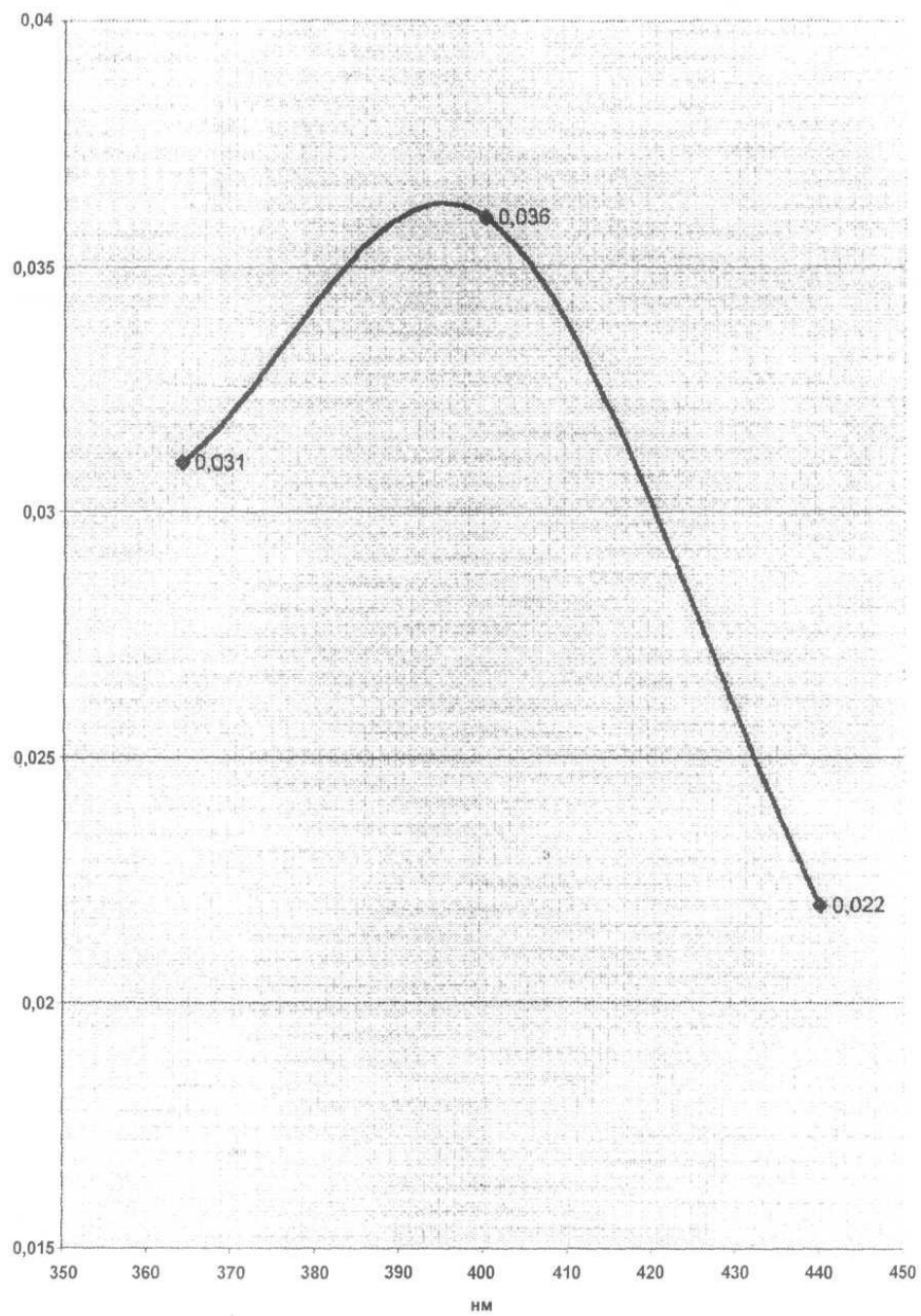
Таблиця 4

Результати обстеження здорових людей (донорів) за способом CST

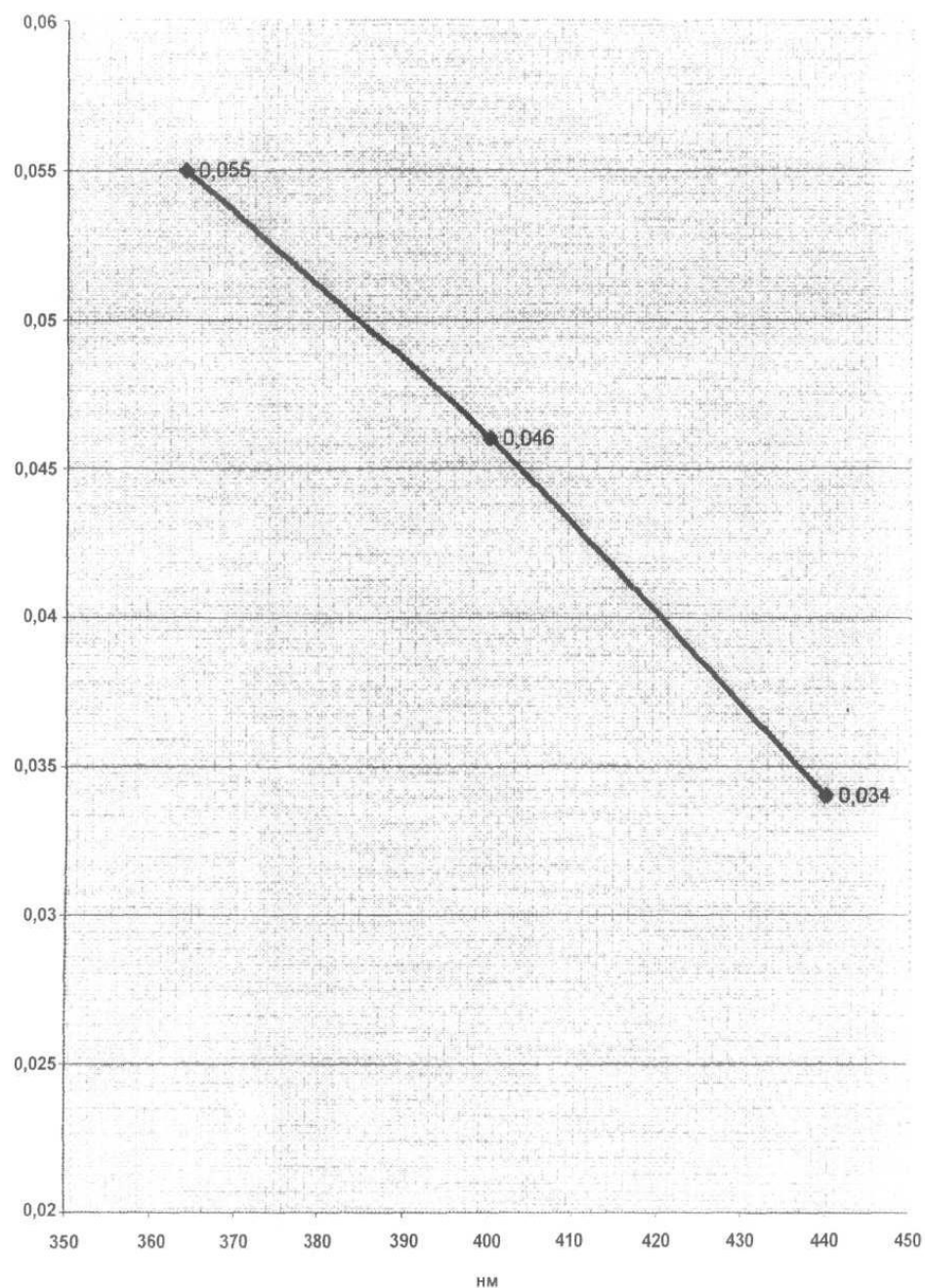
Всього обстежено	Кількість істинно-негативних результатів	Кількість псевдо-позитивних результатів	Діагностична специфічність
абс.	абс.	абс.	%
68	65	3	95,6

Таким чином, розроблений спосіб діагностики злоякісних пухлин людини CST високо інформативний, простий у виконанні, нетривалий за часом проведення (вся реакція займає 2-2,5 години); універсальний, тобто може використовуватись для скринінгової діагностики найбільш поширених форм злоякісним новоутворень, заснований на об'єктивних критеріях оцінки (вимірювання результуючої оптичної щільності); не потребує тривалого навчання та високо кваліфікаційного персоналу для оцінки результатів.

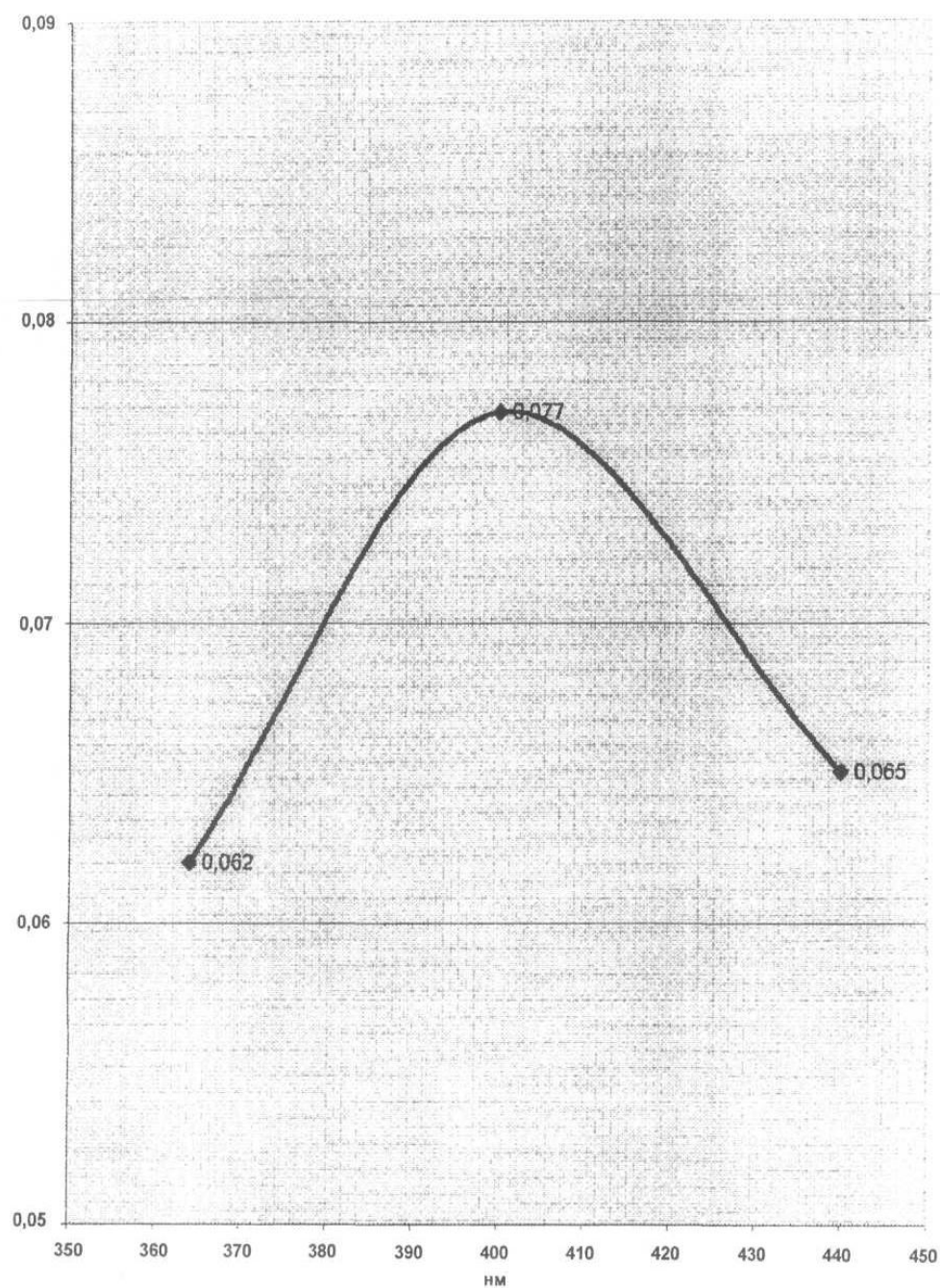
Висока діагностична чутливість (82,7%) та специфічність 95,6% дозволяють широко використовувати спосіб в практичній охороні здоров'я з метою ранньої діагностики злоякісних новоутворень.



Фіг. 1. Крива оптичної щільності сироватки  
крові здорової людини



Фіг. 2. Результуюча крива оптичної щільності  
сироватки крові здорової людини  
після обробки реактивами



Фіг. 3. Результуюча крива оптичної щільності  
сироватки крові пацієнта з раком сигмоподібної  
кишки після обробки реактивами