



УКРАЇНА

(19) UA (11) 45210 (13) U  
(51) МПК (2009)  
A61P 35/00

МІНІСТЕРСТВО ОСВІТИ  
І НАУКИ УКРАЇНИ

ДЕРЖАВНИЙ ДЕПАРТАМЕНТ  
ІНТЕЛЕКТУАЛЬНОЇ  
ВЛАСНОСТІ

## ОПИС ДО ПАТЕНТУ НА КОРИСНУ МОДЕЛЬ

видається під  
відповідальність  
власника  
патенту

**(54) СПОСІБ ІНТЕГРАЛЬНОЇ ОЦІНКИ НЕСПЕЦИФІЧНОЇ РЕЗИСТЕНТНОСТІ ОРГАНІЗМУ ЩОДО ЗЛОЯКІСНИХ ПУХЛИН ЗА ДОПОМОГОЮ РЕАКЦІЇ КАНЦЕРОЛІЗУ**

1

2

(21) u200906136

(22) 15.06.2009

(24) 26.10.2009

(46) 26.10.2009, Бюл.№ 20, 2009 р.

(72) ОРЛОВСЬКИЙ ОЛЕКСІЙ АРКАДІЙОВИЧ, ЧЕХУН ВАСИЛЬ ФЕДОРОВИЧ

(73) ІНСТИТУТ ЕКСПЕРИМЕНТАЛЬНОЇ ПАТОЛОГІЇ, ОНКОЛОГІЇ І РАДІОБІОЛОГІЇ ІМ. Р.С. КАВЕЦЬКОГО НАН УКРАЇНИ

(57) 1. Спосіб інтегральної оцінки неспецифічної резистентності організму щодо злоякісних пухлин за допомогою реакції канцеролізу, в якому вимірюють здатність сироватки та плазми крові викликати лізис клітин злоякісних пухлин, до яких організм-донор крові не має специфічного імунітету, задля чого готують реакційну суміш, що складається з заданих об'ємів суспензії визначеної концентрації пухлинних клітин-мішеней, одержаних з асцитної форми одного зі штамів перещеплюваних пухлин лабораторних тварин, та суцільної або розведеної сироватки або плазми крові досліджуваного організму, який раніш не стикався з антигенами клітин даного типу, потім реакційну суміш інкубують в термостаті при заданій температурі протягом заданого часу, після чого за допомогою одного з відомих пристроїв для підрахунку клітин,

наприклад рахункової камери Горяєва, проводять кінцевий підрахунок концентрації клітин-мішеней в реакційній суміші, який **відрізняється** тим, що суспензію клітин-мішеней, яка міститься в одержаній від лабораторної тварини асцитній рідині, розводять до необхідної робочої концентрації штучним середовищем, наприклад ізотонічним розчином натрію хлориду, не відмиваючи від асцитної рідини шляхом центрифугування в штучному середовищі.

2. Спосіб за п. 1, який **відрізняється** тим, що підрахунок концентрації клітин в реакційній суміші, зміненої в результаті реакції канцеролізу, проводять кілька разів, наприклад чотири рази протягом заданого терміну інкубації, і одержані таким чином результати підсумовують.

3. Спосіб за п. 2, який **відрізняється** тим, що безпосередньо перед підрахунком концентрації клітин в реакційній суміші реакцію канцеролізу в усіх досліджуваних зразках одночасно зупиняють шляхом додавання до реакційної суміші певної кількості спеціально підібраного фіксуєного розчину, такого, що не спричиняє утворення конгломератів клітин в суспензії, наприклад, насиченого розчину біхромату калію.

Корисна модель, що заявляється, належить до медицини, зокрема онкології.

Рівень техніки. Відомий, обраний як показник рівня техніки і водночас як прототип, спосіб інтегральної оцінки неспецифічної резистентності організму щодо злоякісних пухлин за допомогою реакції канцеролізу, в якому вимірюють здатність сироватки та плазми крові викликати лізис клітин злоякісних пухлин, до яких організм-донор крові не має специфічного імунітету, задля чого готують реакційну суміш, що складається з заданих об'ємів суспензії визначеної концентрації пухлинних клітин-мішеней, одержаних з асцитної форми одного зі штамів перещеплюваних пухлин лабораторних тварин, та суцільної або розведеної сироватки або плазми крові досліджуваного організму, який раніш

не стикався з антигенами клітин даного типу, потім реакційну суміш інкубують в термостаті при заданій температурі протягом заданого часу, після чого за допомогою одного з відомих пристроїв для підрахунку клітин - наприклад, камери Горяєва - проводять кінцевий підрахунок концентрації клітин-мішеней в реакційній суміші [1-3].

При виконанні цього способу клітини-мішені, які містяться в асцитній рідині, перед розведенням до робочої концентрації зазвичай відмивають від асцитної рідини шляхом кількаретового центрифугування в штучному середовищі, наприклад, ізотонічному розчині натрію хлориду. Результат реакції канцеролізу підраховують лише одноразово, а саме по закінченні заданого терміну інкубації в термостаті. Крім того, по закінченні терміну інкуба-

UA (19) 45210 (13) U

ції реакцію канцеролізу не зупиняють, тобто вона продовжується і в рахунковій камері, і в тих зразках, що чекають своєї черги на підрахунок клітин.

Недоліки цього способу такі. 1) При відмиванні клітин-мішеней від асцитної рідини руйнується та видаляється найближче мікрооточення клітин, відоме під назвою «екстрацелюлярний матрикс». Це, в свою чергу, веде до неприпустимого викривлення результатів вимірювань, оскільки, за нашими даними [4], чутливість клітин, звільнених від екстрацелюлярного матриксу, до регуляторних факторів сироватки та плазми крові відрізняється принципово, аж до переходу від стимуляції лізису клітин до стимуляції їх мітотичного поділу. 2) До неприпустимого викривлення результатів веде також одноразовий підрахунок результату реакції. Справа в тому, що результат реакції - канцеролітичний індекс - є своєрідною рівнодіючою двох процесів - власне лізису клітин та мітотичного поділу тих клітин, що вже до нього підготовані. Завдяки цьому, як встановлено нами раніш [4], концентрація клітин в реакційній суміші змінюється квазіперіодично, причому тривалість квазіперіоду істотно змінюється залежно від цілої низки фізіологічних чинників, і такі зміни зазвичай вкрай важко передбачити. Таким чином, при одноразовому підрахунку результатів реакції неможливо гарантувати, що підрахунок завжди ведеться на одній і тій самій фазі квазіперіоду. Підрахунок же на різних фазах означає позбавлення сенсу одержаних даних. 3) Нарешті, ще одним джерелом викривлення даних є відсутність процедури зупинки реакції по закінченні інкубації, перед підрахунком клітин. З цієї причини реакція (як лізис, так і поділ клітин) продовжується і в рахунковій камері, і в тих зразках, що чекають своєї черги на підрахунок клітин. В результаті, лише дані щодо першого підрахованого зразка більш-менш заслуговують довіри, а зі зростанням номера зразка в черзі на підрахунок наростає похибка.

Саме ці недоліки класичної постановки реакції канцеролізу завадили свого часу використанню цієї реакції для діагностики онкологічних захворювань та моніторингу процесу лікування онкологічних хворих.

Власне опис корисної моделі, що заявляється. В основу корисної моделі поставлено задачу: побудувати всіх трьох недоліків класичного способу постановки реакції канцеролізу і таким чином підвищити її точність та адекватність її результатів реальному рівню неспецифічної резистентності організму щодо злоякісних пухлин.

Поставлена задача вирішується тим, що задля підвищення точності реакції канцеролізу та адекватності її результатів реальному рівню неспецифічної резистентності організму щодо злоякісних пухлин виконуються 3 додаткові умови, а саме: 1) суспензію клітин-мішеней, яка міститься в одержаній від лабораторної тварини асцитній рідині, розводять до необхідної робочої концентрації штучним середовищем, наприклад, ізотонічним розчином натрію хлориду, не відмиваючи від асцитної рідини шляхом центрифугування в штучному середовищі; 2) підрахунок концентрації клітин в реакційній суміші, зміненої в результаті реакції канцеролізу, проводять кілька разів, наприклад,

чотири рази на протязі заданого терміну інкубації, і одержані таким чином результати підсумовують, що дає змогу нівелювати похибку, обумовлену невизначеністю фази квазіперіодичної реакції (нівелювати тим більшою мірою, чим більшим є число часових точок дослідження); 3) безпосередньо перед підрахунком концентрації клітин в реакційній суміші реакцію канцеролізу в усіх досліджуваних зразках одночасно зупиняють шляхом додавання до реакційної суміші певної кількості спеціально підбраного фіксуючого розчину, такого, що не спричиняє утворення конгломератів клітин в суспензії, наприклад, насиченого розчину біхромату калію, що дає змогу нівелювати похибку, обумовлену продовженням реакції в рахунковій камері і в тих зразках, що чекають своєї черги на підрахунок клітин.

Причинно-наслідковий зв'язок між сукупністю ознак способу, що заявляється, та технічним результатом корисної моделі наступний.

Оскільки суспензію клітин-мішеней, яка міститься в одержаній від лабораторної тварини асцитній рідині, розводять до необхідної робочої концентрації штучним середовищем, наприклад, ізотонічним розчином натрію хлориду, не відмиваючи від асцитної рідини шляхом центрифугування в штучному середовищі, найближче мікрооточення - екстрацелюлярний матрикс - клітин-мішеней залишається практично нативним, а тому і їх реакції на регуляторні чинники сироватки або плазми крові є природними, не викривленими.

Підрахунок концентрації клітин в реакційній суміші, зміненої в результаті реакції канцеролізу, проводять кілька разів, наприклад, чотири рази протягом заданого терміну інкубації, і одержані таким чином результати підсумовують, що дає змогу нівелювати похибку, обумовлену невизначеністю фази квазіперіодичної реакції (нівелювати тим більшою мірою, чим більшим є число часових точок дослідження).

Оскільки безпосередньо перед підрахунком концентрації клітин в реакційній суміші реакцію канцеролізу в усіх досліджуваних зразках одночасно зупиняють шляхом додавання до реакційної суміші певної кількості спеціально підбраного фіксуючого розчину, такого, що не спричиняє утворення конгломератів клітин в суспензії, наприклад, насиченого розчину біхромату калію, нівелюється похибка, обумовлена продовженням реакції в рахунковій камері і в тих зразках, що чекають своєї черги на підрахунок клітин.

Приклад практичного застосування корисної моделі

Досліджували кореляційний зв'язок між значенням канцеролітичного індексу сироватки крові та середньою кількістю метастазів на одну тварину у мишей лінії C57B1/6 з перещепленою карциномою легені Льюїс (синоніми - карцинома 3LL, LLC). Пухлини цього штаму відомі тим, що, будучи перещеплені, наприклад, внутрішньом'язово в гомілку мишей, дають велику кількість метастазів у легені, і ці метастази легко підрахувати при розтині тварин. У досліді було використано 6 груп по 10 мишей, з яких група № 1 була контрольною (цим тваринам лише перещеплювали пухлини без будь-яких лікувальних або профілактичних процедур),

кожна ж з інших груп одержувала лікувальний курс одного з варіантів протипухлинної вакцини.

В деяких дослідних групах мало місце виникнення первинних пухлин та метастазів не у всіх тварин. Такі тварини з кожної групи були при взятті крові виділені в окремі підгрупи, позначені індексом «а». Наприклад, група 3а в подальшому викладі - це підгрупа мишей з групи № 3, у яких не спостерігалось ані первинних пухлин, ані метастазів у легені. В цьому ж випадку група 3 баз індексу

«а» - це підгрупа тварин з групи № 3, у яких і первинні пухлини, і метастази були виявлені.

Значення канцеролітичного індексу в кожній з дослідних груп (підгруп) розраховували відносно інтактного контролю, індекс якого, як і зазвичай роблять в подібних дослідках, було прийнято за умовну одиницю (100 %).

В таблиці 1, що подана нижче, наведені результати типового досліді із застосуванням корисної моделі, що заявляється.

Таблиця 1

Дослідні значення канцеролітичного індексу та середньої кількості метастазів

Параметр	Група тварин								
	1	2	3	3а	4	4а	5	6	6а
Канцеролітичний індекс (%)	-23	-20	-4,6	8,8	-7	6	-8	-3,4	15
Середня кількість метастазів на 1 тварину	22,9	19,3	12	0	14,7	0	14,2	11,3	0

У таблиці 2 ті ж самі дані наведені у ранговому вигляді, що необхідно для визначення коефіцієнта рангової кореляції Спірмена [5]. У тих випадках, коли значення середньої кількості метастазів на 1 тварину були однаковими в різних групах тва-

рин (в даному випадку - нульові значення в підгрупах 3а, 4а та 6а), менший ранг присвоювали тій підгрупі з індексом «а», якій відповідає підгрупа без індексу «а» з меншою кількістю метастазів на тварину.

Таблиця 2

Ранговані значення канцеролітичного індексу та середньої кількості метастазів

Параметр	Числові значення								
Ранговані значення канцеролітичного індексу	-23	-20	-8	-7	-4,6	-3,4	6	8,8	15
Ранг числового значення	1	2	3	4	5	6	7	8	9
Група тварин	1	2	5	4	3	6	4а	3а	6а
Ранговані значення середньої кількості метастазів на 1 тварину	0	0	0	11,3	12	14,2	14,7	19,3	22,9
Ранг числового значення	1	2	3	4	5	6	7	8	9
Група тварин	6а	3а	4а	6	3	5	4	2	1

Дані таблиці 2 свідчать про те, що коефіцієнт кореляції Спірмена між значеннями канцеролітичного індексу та середньої кількості метастазів на одну тварину дорівнює (-0,983), що за даної кількості варіант є статистично достовірним при  $P < 0,001$ , тобто обернена кореляція між цими параметрами є майже абсолютною, отже, технічний ефект корисної моделі експериментально доведений.

Джерела інформації:

1. Кавецкий Р. Е. К вопросу о феномене канцеролиза и его значении. В кн.: Р. Е. Кавецкий. Реактивность организма и опухолевый рост. Избранные труды. - Киев: Наукова думка, 1981. - С. 183-189.

2. Дядюша Г. Ф., Булкина З. П. Система соединительной ткани и злокачественные опухоли. - Киев: Наукова думка, 1978. - 255 с.

3. Олейник С. Ф., Панчишина М. В. Биология канцеролиза. - Львов: Вища школа, 1978. - 179 с.

4. Орловский А. А., Видный В. Г., Коляденко В. Г., Цапенко В. Ф. Системная энзимотерапия в регуляции неспецифической резистентности организма // Актуальные проблемы медицины и биологии. - 2002. - Вып. 2. - С. 355-449.

5. Бойко И. И., Стаховский Э. А. Математическая обработка данных медицинских исследований. - Киев: ВЕТАпрес, 2008. - С. 121-133.