



УКРАЇНА

(19) UA (11) 61235 (13) U
(51) МПК (2011.01)
A61B 10/00

МІНІСТЕРСТВО ОСВІТИ
І НАУКИ УКРАЇНИ

ДЕРЖАВНИЙ ДЕПАРТАМЕНТ
ІНТЕЛЕКТУАЛЬНОЇ
ВЛАСНОСТІ

ОПИС ДО ПАТЕНТУ НА КОРИСНУ МОДЕЛЬ

видається під
відповідальність
власника
патенту

(54) СПОСІБ РАНЬОГО ВИЯВЛЕННЯ МАЛІГНІЗАЦІЇ ПРИ ВИРАЗКОВІЙ ХВОРОБІ ШЛУНКА

1

2

(21) u201100022

(22) 04.01.2011

(24) 11.07.2011

(46) 11.07.2011, Бюл.№ 13, 2011 р.

(72) ЖЕБЕЛЕНКО ЯРОСЛАВ ГЕОРГІЙОВИЧ, БА-
КУРОВА ОЛЕНА МИХАЙЛІВНА, ЗУЙКОВ СЕРГІЙ
ОЛЕКСАНДРОВИЧ, МИРОНОВА КСЕНІЯ ОЛЕК-
САНДРІВНА

(73) ДОНЕЦЬКИЙ НАЦІОНАЛЬНИЙ МЕДИЧНИЙ
УНІВЕРСИТЕТ ІМ. М.ГОРЬКОГО

(57) Спосіб раннього виявлення малігнізації при
виразковій хворобі шлунка, що включає визначен-

ня активності гліколітичного ферменту, який **відрі-
зняється** тим, що як гліколітичний фермент ви-
значають активність гліцеральдегід-3-
фосфатдегідрогенази в плазмі крові, багатій на
тромбоцити, з урахуванням в ній концентрації
тромбоцитів та рівня активності ферменту в безт-
ромбоцитарній плазмі і, при підвищенні активності
ферменту у 2 рази та більше в порівнянні з віко-
вою нормою, кажуть про розвиток онкологічної
патології.

Спосіб належить до медицини, а саме до гаст-
роентерології і онкології, та може бути використа-
ний для ранньої діагностики малігнізації в хворих
на виразкову хворобу шлунка, індивідуального
моніторингу, для визначення тактики лікування та
як прогностичний критерій.

Відомо, що до факторів, які супроводжують
злоякісне переродження, належить зростання тка-
нинної гіпоксії та активація гліколізу. Поглиблення
гіпоксії та системний вплив пухлини призводить до
росту активності гліколітичних ферментів [1].

Найбільш близьким по технічній суті вирішува-
ної задачі є спосіб прогнозування розвитку малігні-
зації при виразковій хворобі, який включає визна-
чення активності гліколітичного ферменту -
лактатдегідрогенази в біоптатах слизової оболон-
ки шлунка [2], розраховуючи відношення анаероб-
них та аеробних ізоформ лактатдегідрогенази
ЛДГ5/ЛДГ1.

Недоліком цього способу є ряд обмежень, го-
ловні з них: неможливість регулярного проведення
через наявність складних і тривалих маніпуляцій
під час взяття біопсії слизової оболонки шлунка,
потреба підготовки пацієнта до процедури, необ-
хідність використання складної апаратури; визна-
чення активності ферменту у гомогенаті тканини -
це багатостадійна процедура, досить тривала у
виконанні, яка також потребує визначення концен-
трації білка у гомогенаті, що фактично є окремим
методичним етапом, істотно збільшує затрати часу
та вимагає додаткових методичних навичок. Все

це знижує прогностичну та діагностичну цінність
способу.

В основу корисної моделі поставлено задачу
розробити спосіб раннього виявлення малігнізації
при виразковій хворобі шлунка шляхом визначен-
ня активності гліколітичного ферменту гліцераль-
дегід-3-фосфатдегідрогенази (КФ 1.2.1.12) в плаз-
мі крові, багатій на тромбоцити.

Поставлена задача вирішується тим, що в
способі раннього виявлення малігнізації при вира-
зковій хворобі шлунка як гліколітичний фермент
досліджують активність гліцеральдегід-3-
фосфатдегідрогенази (КФ 1.2.1.12) в плазмі крові,
багатій на тромбоцити з урахуванням в ній концен-
трації тромбоцитів та рівня активності ферменту в
безтромбоцитарній плазмі і, при підвищенні актив-
ності ферменту у 2 рази та більше в порівнянні з
віковою нормою, кажуть про розвиток онкологічної
патології.

Новим в способі, що заявляється є те, що як
гліколітичний фермент використовують визначен-
ня активності гліцеральдегід-3-
фосфатдегідрогенази в плазмі крові, багатій на
тромбоцити з урахуванням кількості тромбоцитів і
рівня активності ферменту в безтромбоцитарній
плазмі. Зростання активності у 2 рази та вище, в
порівнянні з віковою нормою, свідчить про розви-
ток онкологічної патології. Активність ферменту
визначають за стандартною методикою [3]. Спосіб
дозволяє проводити визначення активності гліце-
ральдегід-3-фосфатдегідрогенази у динаміці, для

(13) U
(11) 61235
(19) UA

ранньої діагностики виникнення онкологічної патології у хворих на виразкову хворобу шлунка.

Розробка способу, що заявляється, стала можливою завдяки встановленому авторами науковому факту, що активність гліцеральдегід-3-фосфатдегідрогенази в плазмі крові, багатій на тромбоцити, істотно відрізняється від активності ферменту у безтромбоцитарній плазмі того ж самого пацієнта. І в плазмі, багатій на тромбоцити, активність гліцеральдегід-3-фосфатдегідрогенази різко зростає саме при злоякісній трансформації виразки, що забезпечує більш високу чутливість способу [4].

Авторами було встановлено, що активність гліцеральдегід-3-фосфатдегідрогенази в здоровому організмі має вікову залежність і підвищується в осіб похилого віку. Це узгоджується з даними багатьох авторів про існування "циркуляторної гіпоксії" у людей старше 60 років, яка пов'язана з порушенням оксигенації крові та транспорту кисню до тканин [5] та змінами активності тромбоцитів в осіб похилого віку [6]. Тому для коректного оцінювання показника у хворих виразковою хворобою, необхідно спиратися на норму для відповідної вікової групи.

Для пацієнтів з виразковою хворобою характерне підвищення активності гліцеральдегід-3-фосфатдегідрогенази в плазмі, багатій на тромбоцити у 1,3-1,8 разу, однак при малігнізації виразки активність ферменту зростає у 2-5 разів.

Реалізують спосіб таким чином.

З ліктьової вени шприцем набирають 1мл крові в пробірку з 0,1мл 3,8% розчину цитрату натрію, центрифугують 3хв. при 1200g, після чого відбирають плазму, багату на тромбоцити і рахують концентрацію тромбоцитів в камері Горяєва [7]. Далі кров центрифугують ще 15хв. при 1200g і відбирають плазму крові, що не містить тромбоцитів (безтромбоцитарну). За стандартними методами визначають активність гліцеральдегід-3-фосфатдегідрогенази [3] в плазмі, багатій на тромбоцити, та в плазмі, що не містить тромбоцитів.

Концентрація тромбоцитів в плазмі, багатій на тромбоцити, може бути різною, а це прямо впливає на результат тесту. Крім того, рівень активності ферменту в безтромбоцитарній плазмі, впливає як фоновий рівень на значення активності ферменту у плазмі, багатій на тромбоцити. Тому, для врахування цих факторів, розраховують активність гліцеральдегід-3-фосфатдегідрогенази, приведену до 10^8 тромбоцитів в мл плазми, за формулою:

$$\text{Аст} = \text{Апл} + (\text{Атр} - \text{Апл}) \cdot 10^{-8} / \text{Т}$$

Апл - активність гліцеральдегід-3-фосфатдегідрогенази в безтромбоцитарній плазмі.

Атр - активність гліцеральдегід-3-фосфатдегідрогенази в плазмі, багатій на тромбоцити.

Аст - розрахована активність гліцеральдегід-3-фосфатдегідрогенази у плазмі, багатій на тромбоцити, приведена до 10^8 тромбоцитів в мл.

10^{-8} - коефіцієнт, для розрахунку активності гліцеральдегід-3-фосфатдегідрогенази, приведеної до 10^8 тромбоцитів в мл.

Т - кількість тромбоцитів в 1мл плазми, багатій на тромбоцити (порахована на етапі її отримання)

Розраховану активність гліцеральдегід-3-фосфатдегідрогенази, приведену до 10^8 тромбоцитів в мл плазми, порівнюють з нормою для здорових людей відповідного віку. Для пацієнтів з виразковою хворобою характерне підвищення активності гліцеральдегід-3-фосфатдегідрогенази в плазмі, багатій на тромбоцити у 1,3-1,8 разу, однак при малігнізації виразки, активність ферменту зростає у 2-5 разів. Тому підвищення активності в 2 рази та більше, говорить про злоякісне переорудження виразки.

Спосіб реалізують за 50 хвилин.

Конкретні приклади реалізації способу що заявляється.

Приклад 1.

Хворий Л., 41 рік був прийнятий до хірургічного відділення №1 ДОКТМО із скаргами на схуднення, біль в епігастральній області, нудоту, блювання після їжі, зниження ваги тіла на 9кг. За даними фіброгастродуоденоскопії (ФГДС): виразка на задній стінці шлунка, 4х3см, рельєф слизової зглажений. У хворого з ліктьової вени шприцем набрано 1мл крові в пробірку з 0,1мл 3,8% розчином цитрату натрію, виділено плазму, багату на тромбоцити з концентрацією тромбоцитів $0,4 \times 10^8$ /мл. та безтромбоцитарну плазму. За стандартною методикою визначено активність гліцеральдегід-3-фосфатдегідрогенази в плазмі, багатій на тромбоцити: 55,16нмоль/хв*мл. В безтромбоцитарній плазмі активність гліцеральдегід-3-фосфатдегідрогенази склала 31,25нмоль/хв*мл. Активність гліцеральдегід-3-фосфатдегідрогенази приведена до 10^8 тромбоцитів в мл. склала:

$$31,25 + (55,16 - 31,25) \cdot 10^8$$

$/0,4 \times 10^8 = 91,13$ нмоль/хв. на 10^8 тромбоцитів. У здорових людей відповідного віку активність гліцеральдегід-3-фосфатдегідрогенази в плазмі, багатій на тромбоцити складає 24,46нмоль/хв. на 10^8 тромбоцитів. Таким чином, у хворого Л. підвищена активність гліцеральдегід-3-фосфатдегідрогенази у 3,6 разу, що характерне для малігнізації. При морфологічному дослідженні біопсійного матеріалу встановлений діагноз: аденокарцинома.

Приклад 2.

Хворий О., 54 роки був прийнятий до хірургічного відділення №1 ДОКТМО зі скаргами на важкість в епігастральній області, нудоту, біль в епігастральній області, який зникає після їжі. За даними фіброгастродуоденоскопії (ФГДС): поверхневий гастрит, виразка шлунка до 2 см в діаметрі. У хворого з ліктьової вени шприцем набрано 1мл крові в пробірку з 0,1мл 3,8% розчином цитрату натрію, виділено плазму, багату на тромбоцити з концентрацією тромбоцитів $0,5 \times 10^8$ /мл, та безтромбоцитарну плазму. За стандартною методикою визначено активність гліцеральдегід-3-фосфатдегідрогенази в плазмі, багатій на тромбоцити: 18,38 нмоль/хв. мл. В безтромбоцитарній плазмі активність гліцеральдегід-3-фосфатдегідрогенази склала 10,45нмоль/хв. мл. Активність гліцеральдегід-3-фосфатдегідрогенази приведена до 10^8 тромбоцитів в мл склала:

$$10,34 + (20,88 -$$

$10,34) \cdot 10^8 / 0,5 \times 10^8 = 31,42$ нмоль/хв. на 10^8 тромбоцитів.

У здорових людей відповідного віку активність гліцеральдегід-3-фосфатдегідрогенази в плазмі, багатій на тромбоцити складає 24,46нмоль/хв. на 10^8 тромбоцитів. Таким чином, у хворого Л. підвищена активність гліцеральдегід-3-фосфатдегідрогенази у 1,3 разу, що характерне для виразкової хвороби, але не для малігнізованої виразки. Хворий лікувався в стаціонарі протягом 11 діб, і після досягнення ремісії був виписаний.

Лабораторні випробування способу, що заявляється, проведені у 39 хворих на виразкову хворобу як з ускладненою, так і з неускладненою течією, 25 хворих на рак шлунка, а також у 45 здорових в віці від 20 до 69 років.

Перевагою способу, що заявляється, є використання активності гліцеральдегід-3-фосфатдегідрогенази, який визначається в плазмі крові, багатій на тромбоцити (яка є доступним біологічним матеріалом, що гарантує можливість виконання регулярного обстеження хворого); активність обчислюється з урахуванням концентрації тромбоцитів, що виключає вплив коливань кількості тромбоцитів в плазмі на результат аналізу. Також враховується рівень активності гліцеральдегід-3-фосфатдегідрогенази в безтромбоцитарній плазмі. Цим досягається підвищення точності прогнозування розвитку онкологічної патології в хворих на виразкову хворобу. Тромбоцити є швидкооновлюючою популяцією клітин крові, і швидко реагують на системні зміни у організмі хворого. Спосіб, що заявляється, добре відтворюється в паралельних пробах, має малу вартість. Реалізація способу здійснюється за 50 хвилин. Виконується на стандартному лабораторному обладнанні, є високочутливим. Це дає можливість, збільшити діагностичну цінність пропонованого способу, скоротити час, потрібний для дослідження.

Все це робить перспективним вживання способу в практичній медицині для прогнозування розвитку онкологічної патології в хворих на виразкову хворобу, веде до підвищення ефективності

профілактичних заходів, ефективного формування групи онкологічного ризику і проведення своєчасного лікування.

Джерела інформації:

1. Т.М.Мишуніна Механізми, переваги та наслідки активації гліколізу у пухлинних клітинах / Т. М. Мишуніна // «Журн. АМН України». - 2009. - Т.15, №3. - С.417-448.

2. Александрова В.А. Изоферментный спектр лактатдегидрогеназы слизистой оболочки желудка как ранний маркер возможной онкопатологии у детей с хроническими гастродуоденальными заболеваниями / В.А.Александрова, В.Ф.Приворотский // Вопр. Онкологии. - 1994. - Т.40, №4. - С.175-180.

3. Кочетов Г.А. Практическое руководство по энзимологии: Учеб. пособие для студентов биологических специальностей университетов. - [2-е изд.]. - М.: Высш. школа, 1980. - 272с.

4. Жебеленко Я.Г. Активность ферментов гликолиза в плазме богатой тромбоцитами при язвенной болезни и раке желудка. // Питання експериментальної та клінічної медицини. - 2010. - Вип. 14, Т.2. - С.330-335.

5. Саркисов К.Г., Коркушко О.В., Ступина А.С. и др. Микроциркуляция и гемореология при старении человека // Проблемы старения и долголетия. - 1998. - Т.7, №3. - С.269-278.

6. Соболева Н.И. Изменение антиагрегационных влияний сосудистой стенки у людей пожилого и старческого возраста с физиологическим и патологическим типами старения / Н.И.Соболева // Университетская наука: теория, практика, инновации сборник трудов 73-й научной конференции КГМУ и сессии Центрально-Черноземного научного центра РАМН. – Т.3. - Курск, 2008. - С.33-36.

7. Клиническая лабораторная диагностика: Справочник для врачей / [В.В.Медведев, Ю.З.Волчек]; под ред. Яковлева В.А. - СПб.: Гиппократ, 2006. - 360с.