



УКРАЇНА

(19) UA (11) 35294 (13) A

(51) 6 G01N33/53

МІНІСТЕРСТВО ОСВІТИ  
І НАУКИ УКРАЇНИДЕРЖАВНИЙ ДЕПАРТАМЕНТ  
ІНТЕЛЕКТУАЛЬНОЇ  
ВЛАСНОСТІ

## ОПИС

ДО ДЕКЛАРАЦІЙНОГО ПАТЕНТУ  
НА ВИНАХІДвидається під  
відповідальність  
власника  
патенту

(54) СПОСІБ ВИЯВЛЕННЯ МЕТАСТАЗІВ ТА РЕЦИДИВУ ДИФЕРЕНЦІЙОВАНОГО РАКУ ЩИТОВИДНОЇ ЗАЛОЗИ У ДІТЕЙ

(21) 99095160

(22) 17.09.1999

(24) 15.03.2001

(46) 15.03.2001, Бюл. № 2, 2001 р

(72) Самсон Оксана Ярославівна, Мишуніна Тамара Мар'янівна, Богданова Тетяна Іванівна, Тронько Микола Дмитрович, Большова Олена Василівна, Кононенко Владислав Якович

(73) ІНСТИТУТ ЕНДОКРИНОЛОГІЇ ТА ОБМІНУ  
РЕЧОВИН ІМ. В. П. КОМІСАРЕНКА АМН УКРАЇНИ

(57) Спосіб виявлення метастазів та рецидиву диференційованого раку щитовидної залози у дітей, який заключається у визначенні у плазмі крові радіологічним методом біологічно активних сполук, відрізняється тим, що у плазмі крові визначають концентрацію гамма-аміномасляної кислоти радіорецепторним методом і по збільшенню її рівня відносно норми у прооперованих з приводу раку щитовидної залози дітей діагностують наявність метастазів або рецидиву новоутворення

Винахід відноситься до медицини, а саме ендокринології, і може застосовуватися для виявлення наявності метастазів та рецидиву злоякісного новоутворення щитовидної залози.

Відомо, що після аварії на ЧАЕС значно зросла кількість дітей, хворих на рак щитовидної залози. Для адекватної терапії хворого на рак щитовидної залози важливо своєчасно визначити метастатичне ушкодження внутрішніх органів або рецидиву раку у післяопераційному періоді саме на початковому етапі розвитку цих ускладнень.

Відомо застосування ультразвукового дослідження - методу, який дозволяє візуалізувати як саму пухлину, так і її метастази у лімфовузлах ший. На додаток до цього використовують тонкогільну аспіраційну пункційну біопсію [1]. Однак цей метод не є інформативним при визначенні уражень деяких лімфовузлів ший, а також середостіння і легень.

Крім того застосовують радіоізотопну діагностику метастазів та рецидиву раку щитовидної залози, яка дозволяє визначити всі наявні метастатичні ураження [2]. Проте, дороговизна дослідження та довготривала підготовка (до 6 тижнів після операції) хворого не дозволяє широко застосовувати цей спосіб.

Найбільш близьким до способу, що пропонують автори, є радіологічне визначення у плазмі крові вмісту тиреоглобуліну (ТГ), яке дозволяє по підвищенню рівню ТГ встановити прогресування захворювання та метастатичне ураження внутрішніх органів. Однак на рівень ТГ у плазмі крові впливають багато факторів. Так концентра-

ція ТГ підвищується у хворих із тиреоїдною карциномою, яка накопичує радіоактивний йод, але при недиференційованому раці щитовидної залози вміст ТГ у плазмі крові не збільшується. У разі диференційованих форм пухлини з низькою функціональною активністю рівень ТГ підвищується у меншій мірі, ніж при новоутвореннях із високою функціональною активністю. У деяких випадках концентрація ТГ підвищується за умов відсутності поглинання йоду малігнізованою тканиною [3]. Таким чином і цей засіб не є достатньо інформативним.

В основу цього винаходу поставлено задачу створити такий спосіб виявлення метастазів та рецидиву раку щитовидної залози, який би дозволив шляхом радіорецепторного визначення рівня гамма-аміномасляної кислоти у плазмі крові значно упростити виявлення метастатичного процесу та підвищити інформативність методу.

Спосіб полягає в тому, що автори пропонують визначати концентрацію біологічно активної сполуки - гамма-аміномасляної кислоти (ГАМК) - основного гальмівного медіатора нервової системи у плазмі крові дітей, прооперованих з приводу раку щитовидної залози, і по збільшенню її рівня відносно норми діагностувати наявність метастазів пухлини або рецидиву захворювання.

До цього рішення автори прийшли завдяки дослідженню концентрації ГАМК у плазмі крові дітей до операції та після тиреоїдектомії. Було встановлено, що після операційного втручання концентрація ГАМК у плазмі крові зменшувалася відносно високого доопераційного рівня. При розподілі хворих на групи, що включали хворих без нас-

(19) UA (11) 35294 (13) A

тупного виявлення метастазів та хворих із наявністю метастатичного ураження внутрішніх органів або рецидиву захворювання була встановлена чітка залежність рівня ГАМК у плазмі крові від наявності ускладнень. При відсутності рецидиву або метастазів концентрація ГАМК у плазмі крові знаходилася на рівні такої як у здорових осіб, тоді як при виникненні ускладнень концентрація ГАМК була збільшеною відносно норми і досягала величин передопераційних показників або й перевищувала їх.

Спосіб визначення ГАМК у плазмі крові включає виділення з мозку тварин синаптичних мембран та власне визначення за допомогою радіорецепторного методу концентрації амінокислоти [4].

Для виділення синаптичних мембран 10% гомогенат тканини мозку, який готують на 0,32 М розчині сахарози у гомогензаторі з тefлоновим товчачиком, центрифугують при 2,5 тис об. на хв на протязі 10 хв. Ці та подальші процедури проводять при температурі біля 4°C. Осад («груба» ядерна фракція) промивають 0,32 М розчином сахарози та знову центрифугують. Осад відкидають, а об'єднаний супернатант центрифугують при 20000 g на протязі 20 хв. для одержання фракції мітохондрій, осад яких гомогенізують у дистильованій воді із розрахунку 20V до величини вихідної наважки тканини. Для звільнення мембран від речовин, що інгібують зв'язування  $^{14}\text{C}$ -ГАМК (або  $^3\text{H}$ -ГАМК) *in vitro*, суспензію «шокованих» мітохондрій заморожують при -20°C, а після відтанення інкубують у присутності 0,05% (v/v) тритону X-100 30 хв при 37°C і центрифугують при 40000 g на протязі 20 хв. Одержаний осад синаптичних мембран тричі промивають розчином 50 мМ трис-цитратно-

го буферу pH 7,4 з наступним центрифугуванням і зберігають при -20°C. Перед використанням мембрани суспендують у свіжому трис-цитратному буфері. Кінцева концентрація білка у суспензії синаптичних мембран, яку безпосередньо використовують для визначення вмісту ГАМК, становить біля 10 мг/мл.

Для визначення концентрації ГАМК плазми крові (0,2 мл) інкубують 15 хв. при кімнатній температурі у середовищі, яке містить 1,5 мл трис-цитратного буферу pH 7,4, 0,1 мл суспензії синаптичних мембран та 0,1 мл розчину  $^{14}\text{C}$ -ГАМК або  $^3\text{H}$ -ГАМК (2,5 пмоль). Інкубацію рекомендовано проводити у пластикових флаконах, наприклад рВ фірми «Beckman» (США), що дозволяє їх використовувати у якості ємкості при підрахунку радіоактивності. Реакцію зупиняють швидким центрифугуванням проб при 1000 g на протязі 10 хв; старанно звільняють їх за допомогою фільтрувального паперу від залишків супернатанту, а до осаду приливають 3,0 мл сцинтиляційної рідини ЖС-8. Підрахунок радіоактивності проводять на рідинному сцинтиляційному лічильнику наприклад, LS 5000ТА фірми «Beckman» (США). Специфічне зв'язування встановлюють як різницю між загальним (у відсутності) та неспецифічним (у присутності  $10^{-6}$  М стабільної ГАМК) зв'язуванням, а його відсоток розраховують по відношенню до загального. Кількість ГАМК у пробах визначають за напілогогарифмічною калібровочною кривою (відсоток специфічного зв'язування-логарифм концентрації), яку будують у діапазоні концентрацій 17-2250 нмоль/л, та виражають у нмоль на 1 л плазми. Отриманий результат порівнюють з показниками у здорових осіб. У таблицях 1, 2, 3 наведені дані, які підтверджують інформативність способу.

Таблиця 1

Концентрація ГАМК (нмоль/л) у плазмі крові здорових та хворих на рак щитовидної залози дітей (M±m)

Група обстежених дітей	n	Вміст ГАМК
Практично здорові	49	211,6±19,4
Рак щитовидної залози	38	1454,4±150,4*

\*P<0,05 порівняно із здоровими.

Таблиця 2

Концентрація ГАМК (нмоль/л) у плазмі крові хворих, прооперованих з приводу новоутворень щитовидної залози (M±m)

Групи прооперованих хворих	n	Вміст ГАМК
Доброякісні новоутворення	10	308,7±68,9
Рак щитовидної залози	44	790,3±142,8***
У т.ч.: без метастазів	23	246,6±47,9
з метастазами	16	1094,2±240,7****
рецидив пухлини	5	2553,3±387,3****

\*P<0,05 порівняно із здоровими (див.табл. 1).

\*\*P<0,05 порівняно із неоперованими ( див. табл.1).

\*\*\*P<0,05 порівняно із групою "без метастазів".

\*\*\*\*P<0,05 порівняно із групою "з метастазами".

Таблиця 3

Концентрація ГАМК (нмоль/л) у плазмі крові дітей, оперованих з приводу рака щитовидної залози, в залежності від терміну післяопераційного періоду (М±м)

Строк після операції	Вміст ГАМК у плазмі крові хворих					
	n	загальна група	n	без метастазів	n	з метастазами
1-12 місяців	17	629,1±229,1	10	156,3±35,6	7	1304,9±455,3
13-24 місяця	10	637,9±212,6	5	141,7±47,1	5	1134,0±279,6
Більше 24 місяців	17	1110,7±278,6	8	426,2±100,0***	9	1718,4±433,0

\* P<0,05 порівняно із групою "1-12 місяців".

\*\*P<0,05 порівняно із групою "13-24 місяця".

Приклад № 1.

Хвора Д., дівчина восьми років. Наявність новоутворення була встановлена на профогляді у школі. Дитина не виказувала ніяких скарг. При огляді встановлено: шкіра рожевого кольору, нормальної вологості, без трофічних змін, добре береться у поперечну складку на передплічч. Регіонарні лімфатичні вузли не пальпуються. Щитовидна залоза не збільшена, м'яка, у правій долі - новоутворення до 2 см у діаметрі; безболісне, рухоме. Частота серцебиття 80 уд/хв., артеріальний тиск 105/70 мм рт.ст. Внутрішні органи без суттєвих змін, супутньої патології не виявлено. Дані лабораторних досліджень: УЗД, щитовидна залоза розташована у типовому місці, збільшена за рахунок правої долі, капсула не ущільнена. У правій долі визначається новоутворення діаметром 23 мм, округлої форми без чітких меж, тканина якого гіпоехогенна, ехоструктура не однорідна за рахунок осередків фіброзу. Вся інша тканина залози ізоехогенна, ехоструктура однорідна. Об'єм правої долі 5,6 куб.см, лівої 1,79 куб.см. В області правого судинного пучка визначено утворення до 8 мм зниженої ехогенності, неоднорідне за рахунок осередків фіброзу. Цитологічне заключення: підозра на малигнізацію вузла щитовидної залози. Концентрація ГАМК у плазмі крові 1276 нмоль/л.

При оперативному втручанні у правій долі щитовидної залози виявлено вузол кам'янистої щільності розміром 2,5-3 см. Ліва доля не змінена. Проведена екстрафасціальна правостороння гемитиреоїдектомія, при підтвердженні діагнозу карциноми щитовидної залози експрес-гістологічними дослідженнями, була видалена й залишкова тканина щитовидної залози. Патогістологічне заключення: папілярна карцинома, сопідно-фолікулярний варіант з ознаками суттєвого інфільтруючого росту за межі капсули залози, інвазія у лімфатичні та кровеносні судини на фоні виразного склерозу, багаточисельних псамомних тілець. У лівій долі: мікролокус пухлини, відокремлені псамомні тілця, осередки тиреоїдиту на тлі інтенсивного склерозу судин. Заключний діагноз: Папілярна карцинома щитовидної залози T4N2Mx, стан після тиреоїдектомії. Концентрація ГАМК через місяць після оперативного лікування 1249 нмоль/л, тобто залишався підвищеним, що вказувало на наявність метастазів. Діагностичне сканування NaI<sup>131</sup> підтвердило наявність метастазів у лімфо-вузлах середостіння.

Приклад № 2.

Хворий хлопчик В., 12 років. Новоутворення у щитовидній залозі було виявлено на огляді у районного ендокринолога. При огляді дитина виказу-

вала скарги на наявність новоутворення у щитовидній залозі і збільшення останньої у розмірах. Пальпаторно підтверджено наявність великого, до 3 см у діаметрі, вузла у лівій долі щитовидної залози. Щитовидна залоза збільшена у розмірах за рахунок лівої долі, тканина щитовидної залози не ущільнена. Периферичні лімфоузли не збільшені. Встановлено наявність супутньої патології - вегетосудинної дистонії по гіпотонічному типу. Клініко-лабораторні дані: УЗД: щитовидна залоза розташована у типовому місці, збільшена за рахунок лівої долі, капсула не ущільнена. У лівій долі визначається новоутворення діаметром 33 мм, округлої форми без чітких меж, тканина якого гіпоехогенна, ехоструктура не однорідна за рахунок осередків фіброзу. Вся інша тканина залози ізоехогенна, ехоструктура однорідна. Об'єм правої долі 5,6 куб.см, лівої 21,79 куб.см. Цитологічне заключення: підозра на малигнізацію. Концентрація ГАМК 1059 нмоль/л. Проведено оперативне лікування тиреоїдектомією. Патогістологічне заключення: типовий варіант папілярного раку щитовидної залози, виражена інвазія у лімфатичні та кровеносні судини. Заключний діагноз: Папілярний рак щитовидної залози T3N0M0. Стан після тиреоїдектомії. Концентрація ГАМК у плазмі крові через місяць після операції 206 нмоль/л, що є нормою. Проведення діагностичного сканування підтвердило відсутність метастазів. Через три роки після оперативного лікування концентрація ГАМК різко збільшилася, її рівень у плазмі крові встановив 1482 нмоль/л, що дозволило запідозрити наявність рецидиву або метастазів раку. При проведенні діагностичного сканування встановлено рецидив захворювання. Проведено повторне оперативне лікування.

Таким чином видно, що запропонований спосіб виявлення наявності метастазів або рецидиву новоутворення у прооперованих з приводу раку щитовидної залози хворих дітей дійсно є інформативним та доступним і може мати практичне застосування у клінічній практиці для широкого постійного і динамічного скринінгу хворих, які прооперовані з приводу раку щитовидної залози. У випадку підозри на метастазування таким хворим необхідне проведення діагностичного сканування та радіоізотопного лікування.

#### Література

1. Е.П.Демидчик, А.Ф.Цыб, Е.Ф.Лушанков. Рак щитовидної залози. // М.: Медицина, 1996. - 208с.
2. В.М.Славнов, В.В.Марков. Радіонуклідна діагностика пухлин щитовидної залози. //УРЖ, 1995, № 2, С. 155-159.

3 В.М. Славнов, В.В. Марков. Радиоімуннологічний аналіз пухлинних маркерів у діагностиці раку щитовидної залози.// УРЖ, 1995, 3, № 1, С. 53-55

4. Mousah H., Jacqmin P., Lesne M. The quantification of gamma - aminobutyric acid in the cerebrospinal fluid by radioreceptorassay. CLIN. Chim. Acta 1987; 170 (2-3), 151-159.

---

Тираж 50 екз

Відкрите акціонерне товариство «Патент»  
Україна, 88000, м Ужгород, вул Гагаріна, 101  
(03122) 3 - 72 - 89 (03122) 2 - 57 - 03

---