



УКРАЇНА

(19) UA (11) 48550 (13) A

(51) B 6 A61B10/00

МІНІСТЕРСТВО ОСВІТИ
І НАУКИ УКРАЇНИДЕРЖАВНИЙ ДЕПАРТАМЕНТ
ІНТЕЛЕКТУАЛЬНОЇ
ВЛАСНОСТІОПИС
ДО ДЕКЛАРАЦІЙНОГО ПАТЕНТУ
НА ВІНАХІДВидається під
відповідальність
власника
патенту

(54) СПОСІБ ДІАГНОСТИКИ РАКА

1

(21) 2001106848

(22) 09 10 2001

(24) 15 08 2002

(46) 15 08 2002, Бюл. № 8, 2002 р.

(72) Борзенко Берта Георгіївна, Бакурова Олена Михайлівна, Василенко Інна Василівна, Білозерцев Олексій Михайлович

(73) Борзенко Берта Георгіївна

(57) Спосіб діагностики раку шляхом забору крові з ліктьової вени обстежуваного, виділення сироватки крові, визначення активності маркера раку, який відрізняється тим, що як маркер раку використовують катаболічну тимідинфосфорилазу (ТФ), її активність визначають таким чином: експериментальну та контрольну пробірки заповнюють тимідином, калій - фосфатним буфером та розчином у фізіологічному розчині в 10 разів сироваткою у співвідношенні 1 : 3 : 1,5 відповідно, причому в контрольну пробірку сироватку додають

2

після інкубації пробірок 30 хвилин при 37°C, зупиняють реакції в пробірках, осаджують білок, в надосадовій рідині по оптичній щільності вимірюють екстинцію, визначають вміст білка в сироватці крові обстежуваного по методу Лоурі, по формулі розраховують активність катаболічної ТФ

$$ATF = \frac{(E_{KSP} - E_K) \times 10}{E_{MAX} \times B}$$

де

ATF - активність катаболічної ТФ, E_{KSP} - екстинція в експериментальній пробірці, E_K - екстинція в контрольній пробірці, E_{MAX} - максимальна екстинція тимідину, B - вміст білку в сироватці крові (мг/мл), 10 - розведення сироватки, потім розраховують відношення активності ТФ в сироватці крові відносно здорової вікової групи з активністю ТФ обстежуваного та при зниженні активності в 2,7 - 3,3 рази діагностують рак

Вінахід належить до області медицини, зокрема до практичної медицини, та може бути використаним для ранньої діагностики раку різноманітної локалізації при скринінгових профілактичних дослідженнях, при періодичних обстеженнях груп підвищеного ризику щодо розвитку злоякісних пухлинних процесів

Відомо спосіб діагностики раку [1] шляхом забору крові з ліктьової вени обстежуваного, виділення сироватки крові, визначення активності маркера раку. При цьому в якості маркера раку використовують теломеразу, її активність визначають по методиці TRAP (telomerase repeat amplification protocol), що використовує активність теломераз та полімеразну ланцюгову реакцію

Недоліком способу є його висока вартість, бо реалізація способу потребує спеціальної апаратури, наборів реактивів, а також тривалість виконання тому, що протокол TRAP - тривалий процес, який використовує активність теломераз та полімеразну ланцюгову реакцію. Враховуючи складні умови для проведення протоколу, широке впровадження способу в практику профілактичних обстежень неможливе

Найбільш близьким по технічній суті вирішуваної задачі є спосіб діагностики раку [2] шляхом забору крові з ліктьової вени обстежуваного, виділення сироватки крові, визначення активності маркера раку. При цьому в якості маркера раку використовують тимідинкіназу (ТК), її активність визначають у спеціалізованій для роботи з радіоактивними ізотопами лабораторії. Для цього в 4 пробірки вносять радіоактивний C¹⁴ тимідин, трис-HCL буфер, розчинену сироватку та ATF, MgCl₂, NaF. Пробірки інкубують при 37°C по 10, 20, 30, 40 хвилин відповідно. Зупиняють реакції, осаджують білок. Наносять аліквоти по 10мкл надосадової рідини на целюлозні диски DEAE. Диски занурюють на 10 хвилин в форміатний буфер та на 5 хвилин в воду, цю процедуру повторюють двічі. Оброблені таким чином диски висушують при 60°C. Радіоактивність дисків підраховують у сцинтиляційним лічильнику. По формулі розраховують активність ТК у перерахунку на білок сироватки крові, який визначають по методу Лоурі [3]

Недоліком відомого способу є те, що для його проведення потрібні спеціальні умови - спеціалізована для роботи з радіоактивними ізотопами ла-

(13) A

(11) 48550

(19) UA

бораторія. На її обладнання потрібні значні витрати. Спосіб багато коштує ще й тому, що використовуються дорогі реактиви та апаратура - радіоактивний тимідин та сцинтиляційний лічильник. Проведення дослідження - тривалий, трудомікий процес, що складається з проведення серії реакцій тривалістю 10, 20, 30, 40 хвилин відповідно, що заважає проводити одночасно декілька досліджень. Процес фіксації дисків складається з чотирьох етапів, загальна тривалість яких складає 2 години. Реалізація способу здійснюється за 3,5 години. Таким чином, визначення активності ТК - тривалий, трудомікий, багатокоштовний спосіб, який не може бути використаним для ранньої діагностики рака різноманітної локалізації при скринінгових профілактичних дослідженнях та при періодичних обстеженнях груп підвищеного ризику щодо розвитку злоякісних пухлинних процесів.

В основу винаходу поставлено завдання розробити спосіб діагностики рака шляхом забору крові з ліктьової вени обстежуемого, виділення сироватки крові, визначення активності маркера рака, де в якості маркера рака використовують катаболічну тимідинфосфорилазу (ТФ), що конкурує з тимідинкіназою за субстрат (тимідин), для цього визначають активність ТФ та розраховують відношення активності ТФ в сироватці крові відповідної здорової вікової групи з активністю ТФ обстежуемого, та при зниженні активності в 2,7 - 3,3 рази діагностують рак, що дає можливість спростити спосіб та значно знизити його вартість.

Суть способу полягає в тому, що діагностику рака здійснюють шляхом забору крові з ліктьової вени обстежуемого, виділення сироватки крові, визначення активності маркера рака - ТФ. І активність визначають таким чином: експериментальну пробірку заповнюють тимідином, калій-фосфатним буфером та розчиненою у фізіологічному розчині в 10 разів сироваткою крові у співвідношенні 1:3:1,5 відповідно. У контрольну пробірку помішують тимідин та калій - фосфатний буфер у відповідним співвідношенні. Пробірки інкубують при 37°C на протязі 30 хвилин. Одразу після інкубації у контрольну пробірку додають розчинену у 10 разів у фізіологічному розчині сироватку крові та зупиняють реакції в пробірках, осаджують білок, в надосадковій рідині по оптичній щільності вимірюють екстинцію, вміст білку в сироватці крові обстежуемого визначають по методу Лоурі [3]. По формулі розраховують активність катаболічної ТФ.

$$A_{TF} = \frac{(E_{EКСП} - E_K) \times 10}{E_{МАКС} \times B}, \text{ де}$$

A_{TF} - активність катаболічної ТФ, $E_{EКСП}$ - екстинція в експериментальній пробірці, E_K - екстинція в контрольній пробірці, $E_{МАКС}$ - максимальна екстинція тимідина, B - вміст білка в сироватці крові (мг/мл), 10 - розведення сироватки. Розраховують відношення активності катаболічної ТФ в сироватці крові відповідної здорової вікової групи з активністю ТФ обстежуемого та при зниженні активності в 2,7 - 3,3 рази діагностують рак.

Новим в способі, що заявляється, є те, що в якості маркера рака використовують катаболічну ТФ. І активність визначають таким чином: експериментальну та контрольну пробірки заповнюють

тимідином, калій-фосфатним буфером та розчиненою у фізіологічному розчині в 10 разів сироваткою крові у співвідношенні 1:3:1,5 відповідно, причому у контрольну пробірку сироватку додають одразу після інкубації пробірок при 37°C на протязі 30 хвилин. Зупиняють реакції в пробірках, осаджують білок, в надосадковій рідині по оптичній щільності вимірюють екстинцію. Вміст білку в сироватці крові обстежуемого визначають по методу Лоурі [3]. По формулі розраховують активність катаболічної ТФ.

$$A_{TF} = \frac{(E_{EКСП} - E_K) \times 10}{E_{МАКС} \times B}, \text{ де}$$

A_{TF} - активність катаболічної ТФ, $E_{EКСП}$ - екстинція в експериментальній пробірці, E_K - екстинція в контрольній пробірці, $E_{МАКС}$ - максимальна екстинція тимідина, B - вміст білка в сироватці крові (мг/мл), 10 - розведення сироватки. Розраховують відношення активності катаболічної ТФ в сироватці крові відповідної здорової вікової групи з активністю ТФ обстежуемого та при зниженні активності в 2,7 - 3,3 рази діагностують рак.

Розробка способу, що заявляється, стала можливою завдяки встановленому авторами науковому факту, що сироватка крові відображає особливості проліферативних процесів у тканинах [4]. Катаболічна ТФ розщеплює тимідин до тиміна, т.ч. знижує можливість використання тимідина у синтезі ДНК, каталізує тимідинкіназою [5]. В результаті дослідження активності ТК та ТФ у сироватці крові при раці різноманітної локалізації (рак шлунка, рак кишечника, рак молочної залози) встановлена чітка кореляція між активністю ТК та ТФ [2, 4, 5]. Збільшення активності ТК, що є характерним для рака [6], супроводжується зниженням активності катаболічної ТФ. Згідно попереднім дослідженням авторів, активність ТФ залежить від віку. За показниками активності ТФ в сироватці крові здорових людей різного віку, їх об'єднано у вікові групи [7]. Встановлено достовірне зниження активності ТФ у хворих раком шлунка, мінімальна активність спостерігається у віці 46 - 60 років. У жінок хворих раком молочної залози мінімальна активність ТФ (в 3 рази нижче норми) спостерігається після 60 років.

Вказане співвідношення тимідина, калій-фосфатного буфера та розчиненої в 10 разів у фізіологічному розчині сироватки є оптимальним для роботи катаболічної ТФ, причому максимальну активність катаболічна ТФ виявляє на 30 хвилин інкубації. Контрольну пробірку використовують для визначення екстинції продукту реакції, коли знаходять різницю між екстинціями експериментальної та контрольної пробірок. Активність ТФ виражали в умовних одиницях. За одиницю ферментативної активності приймали збільшення екстинції тимідина при 300nm на мг білку на протязі 30 хвилин інкубації. Спосіб, що заявляється, має добре відтворення та схожість результатів в паралельних дослідженнях та є високочутливим, що дає можливість діагностувати рак різноманітної локалізації на ранніх стадіях.

Реалізують спосіб діагностики рака таким чином: з ліктьової вени обстежуемого шприцем набирають 0,5мл крові в пробірку, центрифугують 5

хвилин при 3000 оборотів на хвилину та виділяють сироватку крові. Експериментальну пробірku заповнюють тимідином, калій-фосфатним буфером та розчиною у фізіологічному розчині в 10 разів сироваткою крові у співвідношенні 1 : 3 1,5 відповідно. У контрольну пробірku помішують тимідин та калій-фосфатний буфер у відповідним співвідношенні. Обидві пробірki інкубують при 37°C на протязі 30 хвилин. Одразу після інкубації у контрольну пробірku додають розчинену у 10 разів у фізіологічному розчині сироватку крові. Зупиняють реакції в пробірках, занурюючи їх на 2 хвилини в киплячу водяну баню та охолоджуючи на льоді 2 хвилини. Осаджують білок за допомогою 0,01н розчину NaOH, доводячи об'єм проб до 3мл, та центрифугуючи обидві пробірki при 3000 оборотів на хвилину на протязі 15 хвилин. В надосадовій рідині по оптичній щільності на спектрофотометрі СФ-46 при 300nm виміряють екстинкцію в пробірках. Паралельно визначають вміст білку в сироватці крові обслідуемого по методу Лоурі [3]. По формулі розраховують активність катаболічної ТФ

$$A_{TF} = \frac{(E_{\text{експ}} - E_{\text{к}}) \times 10}{E_{\text{макс}} \times B}, \text{ де}$$

A_{TF} - активність катаболічної ТФ, $E_{\text{експ}}$ - екстинкція в експериментальній пробірці, $E_{\text{к}}$ - екстинкція в контрольній пробірці, $E_{\text{макс}}$ - максимальна екстинкція тимідина, B - вміст білка в сироватці крові (мг/мл), 10 - розведення сироватки. Розраховують відношення активності катаболічної ТФ в сироватці крові відповідної здорової вікової групи з активністю ТФ обслідуемого та при зниженні активності в 2,7 - 3,3 рази діагностують рак. Спосіб реалізують за 1,5 години.

Конкретні приклади реалізації заявляемого способу діагностики рака

Приклад 1. Хвора 3, 48 років. Клінічний діагноз - виразкова хвороба, активна фаза, виразка дванадцятипалої кишки, виразка шлунка, ускладнена кровотечею середнього ступеня важкості. За даними фіброгастродуоденоскопії (ФГДС) виразка шлунка до 6см, з щільними, нерівними краями, що потребує морфологічної оцінки. На задній стінці дванадцятипалої кишки виразка до 5мм, з рівними краями, вкрита фібрином. У хворої з плітьової вени набрано кров. Виділяють сироватку. В експериментальну пробірku у співвідношенні 1 : 3 1,5 помішують тимідин, калій-фосфатний буфер та розчинену у фізіологічному розчині в 10 разів сироватку крові. У контрольну - тільки тимідин та калій-фосфатний буфер. Після інкубації пробірок при 37° С на протязі 30 хвилин у контрольну пробірku додають розчинену у 10 разів у фізіологічному розчині сироватку крові. Обидві пробірki занурюють на 2 хвилини в киплячу водяну баню, а потім в штативи ставлять на лід на 2 хвилини. Загальний об'єм проб в пробірках доводять 0,01н розчином NaOH до 3мл. Центрифугують при 3000 оборотів на хвилину на протязі 15 хвилин. В надосадовій рідині виміряють екстинкцію в експериментальній та контрольній пробірках. Екстинкція в експериментальній пробірці - $E_{\text{експ}} = 0,379$, в контрольній - $E_{\text{к}} = 0,368$. По методу Лоурі визначають вміст білку в сироватці крові $B = 64 \text{ г/л}$. По формулі розраховують активність катаболічної ТФ $A_{TF} = 0,0372 \text{ ум}$

од. В результаті дослідження встановлено еталонну активність ТФ в здорових вікових групах. В здоровій віковій групі активність катаболічної ТФ в сироватці крові дорівнює $0,3600 \pm 0,02 \text{ ум}$ од. Розраховують відношення $0,3600 / 0,0372 = 9,83$. Таким чином, у хворої 3 активність катаболічної ТФ знижена в 9,8 рази, що дає можливість діагностувати рак. Хворій 3 було зроблено резекцію шлунку. Згідно з гістологічним дослідженням було встановлено діагноз недиференційований поліморфноклітинний рак шлунку.

Приклад 2. Хвора X, 46 років. Клінічний діагноз - фіброзно-кістозна мастопатія правої молочної залози. Захворювання молочної залози? Аналогічно, як і у хворої 3, 48 років, проводять дослідження активності катаболічної ТФ у сироватці крові. У хворої X $E_{\text{експ}} = 0,4297$, $E_{\text{к}} = 0,3581$. Вміст білку в сироватці крові $B = 73 \text{ г/л}$. По формулі розраховують активність катаболічної ТФ $A_{TF} = 0,2338 \text{ ум}$ од. Відношення активності ТФ здорової вікової групи до активності ТФ хворої X дорівнює $0,3600 / 0,2338 = 1,6$. Встановлено зниження активності катаболічної ТФ в 1,6 рази, що вказує на доброякісний характер новоутворення правої молочної залози. Хворій X виконано секторальну резекцію правої молочної залози. Гістологічне дослідження підтвердило діагноз фіброзно-кістозної мастопатії.

Приклад 3. Хворий С, 53 роки. Клінічний діагноз - бластома шлунку? ФГДС - поверхневий рефлюкс - гастрит. Гіперемія слизової оболонки середньої треті тіла. Виражений дуоденіт. Цибуля дванадцятипалої кишки зменшена в об'ємі, позитивний симптом "манної крупи". Аналогічно, як у попередніх прикладах, у хворого С у перший день перебування у лікарні беруть кров з плітьової вени, виділяють сироватку крові. Проводять реакцію. В надосадовій рідині виміряють екстинкції $E_{\text{експ}} = 0,559$, $E_{\text{к}} = 0,551$. По методу Лоурі визначають вміст білку в сироватці крові $B = 70 \text{ г/л}$. Відношення активності ТФ здорової вікової групи до активності ТФ хворого С дорівнює $0,4700 / 0,03 = 15,7$. Активність катаболічної ТФ хворого С знижена в 15,7 рази, що дозволяє діагностувати рак. Хворого було дообслідовано. Згідно з даними ультразвукового дослідження органів черевної порожнини у хворого С діагностовано рак підшлункової залози.

Лабораторні випробування способу, що заявляється, проведені на 52 хворих та 85 здорових людях.

Перевагою способу, що заявляється є те, що він простий у виконанні, не потребує спеціальних умов для проведення. Нерадіоактивний тимідин, що використовується в якості субстрату в пробах, має малу коштовність. Спектрофотометр СФ-46 є стандартним обладнанням клінічних лабораторій. Реалізація способу здійснюється за 1 годину. Одночасно може бути проведено до десяти досліджень.

Все це робить перспективним вживання способу в практичній медицині для ранньої діагностики рака різноманітної локалізації при скринінгових профілактичних дослідженнях, при періодичних обстеженнях груп підвищеного ризику щодо розвитку злоякісних пухлинних процесів.

Література

1. Раков А.Л., Бокарев И.Н., Резван В.В. Тепло-

мераза - новые диагностические и лечебные возможности в онкологии // Военно-медицинский журнал — 2000 — № 11 — С 26 - 29

2 Борзенко Б Г, Думанский Ю Я, Сорока В Р Тимидинкиназа сыворотки крови как тест в диагностике рака желудочно-кишечного тракта // Информационный листок о научно-техническом достижении № 90 - 255 — Информация № 25 РЦНМИ МЗ УССР — 1990

3 Lowry O H, Rosenbroug N L, Farr A Z, Randall B J // J Biol Chem — 1951 — V 193, № 1 — p 265 - 267

4 Борзенко Б Г, Помазан В О, Горбачев А А и др Возрастные особенности метаболизма предшественников ДНК у больных мастопатией // Вопросы медицинской химии — 1997 — Т 43,

вып 4 — С 267 - 271

5 Борзенко Б Г, Бакурова Е М, Ватутин Н Т Два изоферментных спектра тимидинфосфорилазы и их участие в метаболизме ДНК // Архив клинической и экспериментальной медицины — 2000 — Т 9, № 3 — С 407 - 412

6 O'Neil K L, Grigsby R V, Fairbairn D W Thymidine kinase the future in breast cancer prognosis // The Breast — 1995 — Vol 4, № 2 — P 79 - 83

7 Борзенко Б Г, Горбачев А А, Думанский Ю В и др Активность ферментов метаболизма ДНК в сыворотке крови больных раком молочной железы // Вопросы онкологии — 1990 — Т 36, № 1 — С 17 - 23

ДП «Український інститут промислової власності» (Укрпатент)

вул. Сим'ї Хохлових, 15, м. Київ, 04119, Україна

(044) 456 – 20 – 90

ТОВ «Міжнародний науковий комітет»

вул. Артема, 77, м. Київ, 04050, Україна

(044) 216 – 32 – 71