



УКРАЇНА

(19) UA (11) 31359 (13) A

(51) 6 A61B8/08

МІНІСТЕРСТВО ОСВІТИ
І НАУКИ УКРАЇНИДЕРЖАВНИЙ ДЕПАРТАМЕНТ
ІНТЕЛЕКТУАЛЬНОЇ
ВЛАСНОСТІ

ОПИС

ДО ДЕКЛАРАЦІЙНОГО ПАТЕНТУ
НА ВИНАХІДвидається під
відповідальність
власника
патенту

(54) СПОСІБ ДІАГНОСТИКИ ЗЛОЯКІСНИХ ПУХЛИН ЛЮДИНИ

(21) 98084393

(22) 11.08.1998

(24) 15.12.2000

(33) UA

(46) 15.12.2000, Бюл. № 7, 2000 р.

(72) Галахін Костянтин Олександрович

(73) Галахін Костянтин Олександрович

(57) Спосіб діагностики злоякісних пухлин людини шляхом виявлення в периферичній крові аномального білка (онкобілка), який відрізняється тим, що на мазок крові, взятої з пальця руки пацієнта,

наноситься одна крапля водяного розчину адсорбенту і після її висихання порівнюють мікроструктуру створеної "плями" (онкологічні ознаки - "темні, округлі гранули" або темні преципітати у вигляді "німбу", "ореолу") з мікроструктурою "плями-еталону", отриманою аналогічним способом на мазку крові здорової людини-донора (неонкологічні ознаки - "чергування чорних та білих концентричних-ліній" або "гомогенна біла зернистість") і при наявності різниці діагностують присутність злоякісної пухлини в організмі.

Винахід відноситься до медицини, а саме - до клінічної онкології і, зокрема, є способом лабораторної (онкомаркерної) діагностики злоякісних пухлин людини.

Відомі за кордоном способи лабораторної (онкомаркерної) діагностики злоякісних пухлин людини, направлені на виявлення в крові пухлинно-асоційованих речовин (онкомаркерів), які є молекулярними субстанціями, що виробляють злоякісні пухлини та потрапляючими в кровотік. Найбільше розповсюдження в клінічній онкології знашло виявлення наступних онкомаркерів (I. Struve, 1993).

Онкомаркер в крові	Злоякісна пухлина органа (тканини)
NSE	Головний мозок
CT, TG	Щитоподібна залоза
NSE, CEA	Легені
CA 15-3, CEA, MCA	Молочна залоза
CA 72-4, CA 19-9, CEA	Шлунок
AFP, CEA	Печінка
CA 19-9, CEA	Кишечник
CEA, CA 19-9	Матка
CA 125, CEA, CA 72-4	Яєчники
β HCG, CEA	Трофобласт
PAP, PSA	Передміхурова залоза
β HCG, AFP	Яєчки

Але вищевказані маркери дозволяють діагностувати злоякісну пухлину тільки в одному чи в декількох органах людини, не дозволяючи здійснити перевірку всіх органів та тканин організму, у зв'язку з чим вказані онкомаркери непридатні для онкоскрінінгу населення і отримали клінічне застосування для особистого онкомоніторингу в динаміці

протипухлинного лікування для оцінки (контролю) його ефективності. Крім того, травматичне та болісне взяття крові у великій кількості з ліктьової вени, коштовні набори реактивів і апаратури лімітують широке використання онкомаркерів серед населення.

Відомий спосіб лабораторної (онкомаркерної) діагностики злоякісних пухлин людини, заснований на виявленні в крові білка класу гамма-глобулінів (Короткоручко В.П., 1967).

Здійснення цього способу має недоліки: дводобова підготовка пацієнта з відміною будь-яких лікарських препаратів, травматичне і болісне взяття крові з ліктьової вени, її дворазове центрифугування, що може призвести до отримання гемолізованої або ліпоїдної сироваток, непридатних для діагностичного дослідження. Головний недолік - суб'єктивна оцінка вмісту нерозчинного у воді білка (онкомаркера), наявність якого в пробірці оцінюється "ad oculus" ("як бачить око") - від легкої білої опалесценції до мутного кольору та пластівчано-подібного осаду (коагулянту). Діагностична ефективність способу не перевищує 90%.

Зважаючи на вказані недоліки спосіб не дістав розповсюдження для масових обстежень населення та в онкологічній клініці.

Прототипом цього винаходу є спосіб лабораторної (онкомаркерної) діагностики злоякісних пухлин, заснований на виявленні в периферичній крові, взятої з пальця руки, т.з. "кальцій-гістонових білкових комплексів", що є універсальним онкомаркером для більшості злоякісних пухлин органів і тканин організму людини (Є.І. Суслов з співавт. "Спосіб діагностики злоякісних пухлин людини", патент Росії, RU № 2077051 С1, 1992).

(19) UA (11) 31359 (13) A

Здійснення цього способу потребує нанесення трьох крапель ("крапля в краплю") різних реагентів на мазок крові (комплексон ЕДТА або ЕГТА + стандартна сироватка донора + нітрат срібла) з інтервалом 10 хвилин, що потребує хроноконтролю протягом 30 хвилин виконання цієї процедури. Протікання цієї реакції потребує стандартизованого освітлення і висихання "великої" краплі як результату злиття трьох крапель з наступним утворенням "плями", що займає 2-4 години. Таким чином, технічна процедура виконання способу займає від 2,5 до 4,5 годин. Головний недолік способу - суб'єктивна візуальна оцінка діагностичних колористичних ознак вмісту "кальцій-гістонових білкових комплексів", а саме: світло-коричневий, коричневий колір краєвої зони "плями" і зернистість темно-коричневого, буро-коричневого кольору в середній і центральній зонах "плями", оскільки всі вказані відтінки належать до однієї (жовтої) частини видимого спектра кольору при мікроскопії ("ad oculus") і при мікроскопії. Діагностична ефективність способу не перевищує 90%.

В основу винаходу поставлено завдання створення способу діагностики злоякісних пухлин людини, в якому шляхом виявлення в мазку крові, взятої з пальця обстежуваного, аномального білка (онкобілка) специфічного для злоякісної пухлини, забезпечується підвищення діагностичної ефективності (достовірності) способу з усуненням суб'єктивізму, спрощенням технології, що дозволяє, в кінцевому підсумку, використовувати пропонований спосіб для масових обстежень населення з метою онкоскрінінгу і для індивідуального онкомоніторингу в клініці.

Поставлене завдання вирішується наступним чином: в способі діагностики злоякісних пухлин людини, заснованому на виявленні аномального білка (онкобілка), специфічного для злоякісної пухлини, згідно з виходом, виготовляють мазок крові, узятій з пальця руки, і наносять на нього одну краплю розчину реактиву, після висихання якої порівнюють структуру "плями" зі структурою "плями-еталона", отриманого аналогічним способом на мазку крові здорової людини-донора, і при виявленні різниці діагностувати наявність в організмі людини злоякісної пухлини. Спосіб дозволяє виявити онкобілок в крові як продукт аномальної експресії злоякісних пухлинних клітин, що виробляються в процесі їх розмноження, в будь-яких органах і тканинах, уражених злоякісним пухлинним процесом.

Згідно з пропонованим способом аномальний білок (онкобілок) є універсальною онкомаркерною молекулярною субстанцією, присутньою в крові при злоякісних пухлинах дізентогенетичного походження у дітей, а також злоякісних пухлин у дорослих, незалежно від локалізації, гістогенезу (тканинного походження) - раки (епітеліальна тканина), саркоми (мезенхімальна тканина), лімфоми (лімфоїдна тканина), стадії розвитку злоякісного пухлинного процесу (I-IV), статі і віку.

Таким чином, пропонований спосіб є простим і нетрудомістким в технічному виконанні, універсальним і високоспецифічним для діагностики будь-яких злоякісних пухлин в організмі людини, в зв'язку з чим його можливо використовувати як при масових обстеженнях населення (онкоскрінінг), так і в

онкологічній клініці для індивідуального динамічного контролю за ефективністю протипухлинного лікування (онкомоніторинг).

У відповідності до пропонованого способу доцільно, щоб концентрація водяного розчину адсорбенту варіювала в межах 0,5-1%.

При використанні концентрації адсорбенту менше 0,5%, мікроскопічне дослідження мазку крові не дозволяє виявити у онкохворих ділянки (локуси) виборочного (селективного) зв'язку з аномальним білком (онкобілком), а при використанні концентрації більш 1% утворюються тотальні осадки (преципітати) адсорбенту, що робить його непридатним для дослідження.

Спосіб здійснюється наступним чином: на мазку крові (2-3 краплі), взятої з пальця руки пацієнта і рівномірно розподіленої по предметному склу, наноситься у вигляді однієї краплі 0,1 мл 0,7% водяного розчину тонкодисперсного адсорбенту (емпірична формула $C_{15}H_{13}O_3N_3$, м.в.=283 г), яка спочатку знаходилась в "рідинній" фазі (1-1,5 год.), після чого висихає ("тверда" фаза) з утворенням "плями", після чого придатна для мікроскопічного діагностичного дослідження.

Результат оцінюють за структурними відмінностями при мікроскопії "плями" на мазку крові хворого злоякісною пухлиною і "плями-еталона" на мазку крові здорової людини (донора) у відповідності до наступних діагностичних критеріїв (ознак).

Нормальна структура "плями-еталона" має два варіанта мікроскопічної будови: наявність концентричних темних і світлих ліній, що чергуються між собою (фіг. 1), або при відсутності таких ліній має місце наявність гомогенної (однорідної) дрібнозернистої маси (фіг. 2). Якщо зображення вказаних варіантів будови "плями" на мазку крові обстежуваного пацієнта співпадає з "прямою-еталоном", то це свідчить про відсутність в організмі обстежуваного злоякісної пухлини.

Структура "плями" у хворого злоякісною пухлиною має два варіанти мікроскопічної будови: на світлому фоні гомогенної (однорідної) дрібнозернистої маси хаотично розташовані темні круглясті дрібні гранули, що відповідають локусам вибіркового зв'язування адсорбенту з аномальним онкобілком (фіг. 3) або на світлому фоні гомогенної (однорідної) дрібнозернистої маси переважно по периферії "плями" розташовуються темні аморфні макромолекулярні конгломерати, оточені інтенсивно темним дрібнозернистим преципітатом (осадам) у вигляді "німба" ("ореола") (фіг. 4).

Приклад 1

На мазок крові пацієнта Г. зі скаргами на постійні головні болі, запаморочення нанесена 1 крапля 0,5% водяного розчину адсорбенту, яка після експозиції в "рідинній" фазі (1 год.), шляхом природного висихання при кімнатній температурі (20°C) перейшла в "тверду" фазу з утворенням "сухої" плями придатної для мікроскопічного дослідження.

Результат: наявність в "плямі" концентричних ліній темного і світлого кольору, що чергуються між собою.

Висновок: відсутність в організмі пацієнта злоякісної пухлини. Правильний результат підтверджено комплексним діагностичним обстеженням за допомогою комп'ютерної томографії та ядерно-

магнітного резонансу головного мозку, що свідчать про відсутність злоякісного пухлинного новоутворення.

Приклад 2

На мазок крові пацієнта А. зі скаргами на щільне затвердіння в правій молочній залозі нанесена 1 крапля 1% водяного розчину адсорбенту, яка після експозиції в "рідинній" фазі (1,5 год.), шляхом природного висихання при кімнатній температурі (18°C) перейшла в "тверду" фазу з утворенням "сухої" плями, придатної для мікроскопічного дослідження.

Результат: наявність в "плямі" гомогенної (однорідної) зернистості при відсутності концентричних темних та світлих ліній.

Висновок: відсутність в організмі пацієнтки злоякісної пухлини. Правильний результат підтверджено оглядом лікаря-мамолога і мамографією, а також цитологічним дослідженням пункційної біопсії - фібroadенома (доброякісна пухлина).

Приклад 3

На мазок крові пацієнта К. зі скаргами на припухлість шиї в надключичній області, шкіряну сверблячку, пітливість нанесена 1 крапля 0,7% водяного розчину адсорбенту, яка після експозиції в "рідинній" фазі (1 год. 20 хв.), шляхом природного висихання при кімнатній температурі (21°C) перейшла в "тверду" фазу з утворенням "сухої" плями, придатної для мікроскопічного дослідження.

Результат: на світлому фоні гомогенної (однорідної) зернистості наявність хаотично розташованих темних округлих дрібних гранул.

Висновок: наявність в організмі злоякісної пухлини. Правильний результат в подальшому підтверджено біопсією надключичного лімфовузла, морфологічний діагноз - лімфобластна лімфосаркома.

Приклад 4

На мазок крові пацієнта Л. зі скаргами на болі в епігастральній області шлунка (раніше видалена ракова пухлина шлунка) нанесена 1 крапля 0,8% водяного розчину адсорбенту, яка після експозиції в "рідинній" фазі (1 год.), шляхом природного висихання при кімнатній температурі (20°C) перейшла в "тверду" фазу з утворенням "сухої" плями, придатної для мікроскопічного дослідження.

Результат: на світлому фоні гомогенної (однорідної) зернистості в периферичній зоні "плями" розташовуються темні аморфні конгломерати, оточені інтенсивно-темними преципітатами (осадам) у вигляді "німба" ("ореола").

Висновок: наявність в організмі злоякісної пухлини. Правильний результат в подальшому підтверджено біопсією кулки шлунка, морфологічний діагноз - аденокарцинома. Таким чином, має місце рецидив пухлинної хвороби.

Приклад 5

На мазок крові дитини Щ. зі скаргами на тупу, розливу біль в поперековій області, нанесена 1 крапля 0,6% водяного розчину адсорбенту, яка після експозиції в "рідинній" фазі (1 год. 10 хв.), шляхом природного висихання при кімнатній температурі (19°C) перейшла в "тверду" фазу з утворенням "сухої" плями, придатної для мікроскопічного дослідження.

Результат: на світлому фоні гомогенної (однорідної) зернистості хаотично розташовані темні округлі дрібні гранули.

Висновок: наявність в організмі злоякісної пухлини, правильний результат в подальшому підтверджено морфологічним дослідженням оперативно видаленої нирки - злоякісна нефробластома (пухлина Вільмса).

Приклад 6

На мазок крові пацієнтки К. зі скаргами на біль в боку, порушенні менструального циклу, нанесена 1 крапля 0,8% водяного розчину адсорбенту, яка після експозиції в "рідинній" фазі (1 год. 15 хв.), шляхом природного висихання при кімнатній температурі (19°C) перейшла в "тверду" фазу з утворенням "сухої" плями, придатної для мікроскопічного дослідження.

Результат: на світлому фоні гомогенної (однорідної) зернистості в периферичній зоні "плями" розташовані округлі темні аморфні конгломерати, оточені інтенсивно темними преципітатами (осадам) у вигляді "німба" ("ореола").

Висновок: наявність в організмі злоякісної пухлини. Правильний результат в подальшому підтверджено морфологічним дослідженням оперативно видаленого яєчника - злоякісна дисгермінома.

Приклад 7

На мазок крові пацієнта М. зі скаргами на триваллий запор, нанесена 1 крапля 0,9% водяного розчину адсорбенту, яка після експозиції в "рідинній" фазі (1 год. 5 хв.), шляхом природного висихання при кімнатній температурі (18°C) перейшла в "тверду" фазу з утворенням "сухої" плями, придатної для мікроскопічного дослідження.

Результат: на світлому фоні гомогенної (однорідної) зернистості хаотично розташовані темні округлі дрібні гранули.

Висновок: наявність в організмі злоякісної пухлини. Правильний результат в подальшому підтверджено морфологічним дослідженням оперативно видаленої пухлини сигмоподібної кишки - аденокарцинома.

Приклад 8

На мазок крові пацієнтки Т. зі скаргами на кровоточиву "родимку", нанесена 1 крапля 1% водяного розчину адсорбенту, яка після експозиції в "рідинній" фазі (1 год. 30 хв.), шляхом природного висихання при кімнатній температурі (21°C) перейшла в "тверду" фазу з утворенням "сухої" плями, придатної для мікроскопічного дослідження.

Результат: на світлому фоні гомогенної (однорідної) зернистості хаотично розташовані темні округлі дрібні гранули.

Висновок: наявність в організмі злоякісної пухлини. Правильний результат в подальшому підтверджено морфологічним дослідженням оперативно видаленої "родимки" - злоякісна меланома.

Оцінка діагностичної ефективності пропонованого способу проводилась відповідно до рекомендацій Міжнародної Академії пухлинних маркерів і Міжнародного Товариства розвитку онкології в біології та медицині.

Діагностична чутливість (ДЧ) - здатність методу діагностувати злоякісну пухлину у хворій людині, тобто давати істиннопозитивний результат (наявність злоякісної пухлини).

Діагностична специфічність (ДС) - здатність методу давати у здорової людини істиннонегативний результат (відсутність злоякісної пухлини).

Діагностична ефективність (ДЕ) - здатність методу правильно виявляти хворих злоякісними утвореннями і здорових осіб.

$$ДЧ = \frac{ІП}{ІП + ЛН} \times 100\%; \quad ДС = \frac{ІН}{ІН + ЛП} \times 100\%;$$

$$ДЕ = \frac{ІП + ІН}{ІП + ЛП + ІН + ЛН} \times 100\%$$

де:

ІП - істиннопозитивний результат, ІН - істиннонегативний результат, ЛП - ложнопозитивний результат (гіпердіагностика); ЛН - ложнонегативний результат (гіподіагностика).

Зведені результати діагностичної специфічності способу при обстеженні практично здорових осіб (донорів) представлені в табл. 1. Зведені результати діагностичної ефективності способу як інтегративного показника діагностичної специфічності і чутливості представлені в табл. 2.

Джерела інформації

В.П. Короткоручко Осадочная реакция на рак при диагностике опухолевой болезни. - К.: Наукова думка. - 1967. - 77 с.

Е.И. Суслов, К.А. Галахин, В.А. Владимиров Способ диагностики злокачественных опухолей человека. - Патент России. - RU № 2077051 С1, 1992. - 12 с. (прототип).

I. Struve Tumour Diseases - A Clinical Guide Tumour Markers. - Germany, Abbott, 1993. - 68 p.

Таблиця 1

Результати обстеження осіб (донорів) за допомогою способу за винаходом

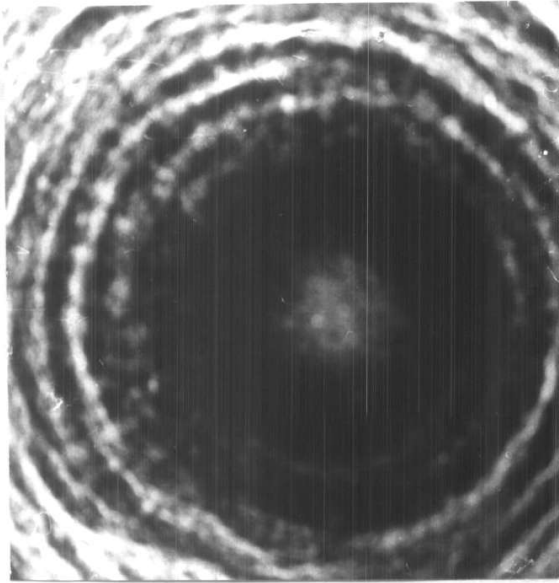
Кількість обстежених осіб, (а. ч.)	Число істиннонегативних результатів, (а. ч.)	Число ложнопозитивних результатів, (а. ч.)	Діагностична специфічність, (%)
100	98	2	98

Таблиця 2

Результати обстеження онкологічних хворих за допомогою способу за винаходом

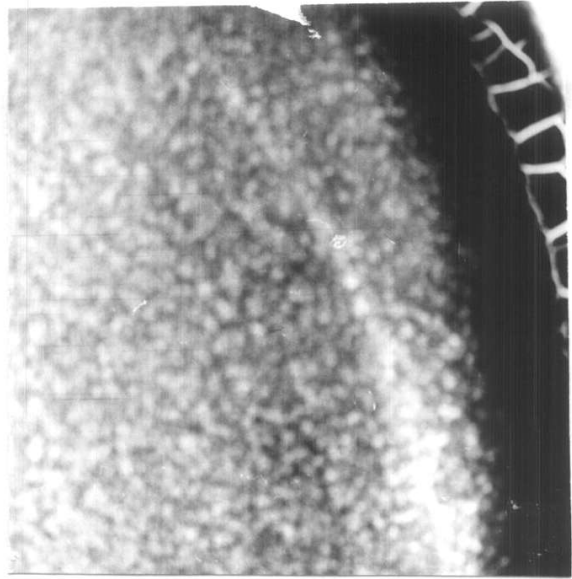
Локалізація злоякісної пухлини	Кількість пацієнтів, (а. ч.)	Число істиннопозитивних результатів, (а. ч.)	Число ложнонегативних результатів, (а. ч.)	Діагностична чутливість, (%)
Головний мозок	30	26	4	86,6
Щитоподібна залоза	40	35	5	87,5
Легені	5	5	немає	100,0
Шлунок	12	9	3	75,0
Товста кишка	10	8	2	80,5
Пряма кишка	11	10	1	90,5
Передміхурова залоза	5	5	немає	100,0
Молочна залоза	30	27	3	90,0
Матка	15	14	1	93,3
Яєчники	13	12	1	92,3
Кістки	10	9	1	90,0
М'які тканини (шкіра, м'язова сполучна, жирова тканина, судини)	20	18	2	90,0
Лімфатична тканина	32	30	2	93,7
Всього	233	208	25	90,5

Мікроскопічне зображення ознак норми і злоякісної онкології на мазках крові обстежуваних осіб за допомогою способу за винаходом



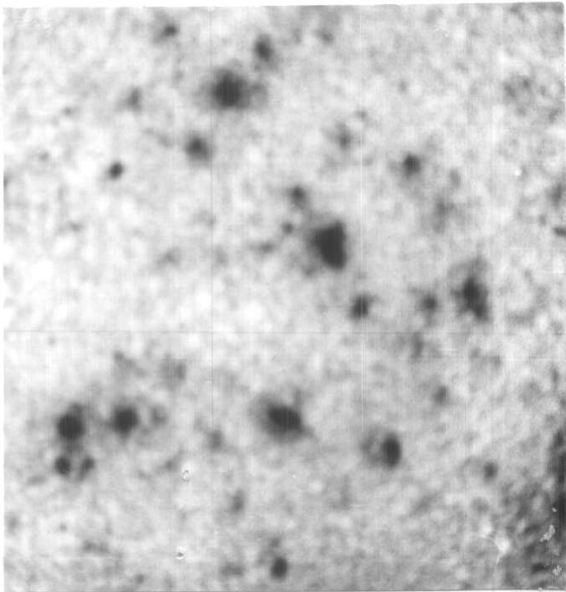
Мікрофото. 36. × 32 (лупа)
"Пляма-еталон", норма. Чергування концентричних чорно-білих ліній.

Фіг. 1



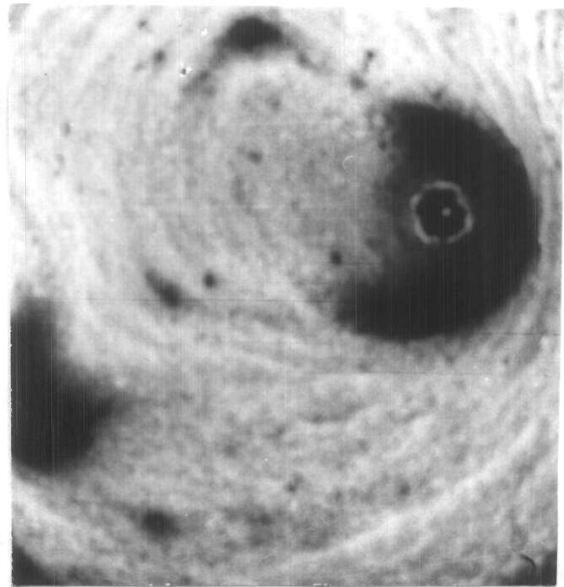
Мікрофото. 36. × 32 (лупа)
"Пляма-еталон", норма. Гомогенна (однорідна) зернистість.

Фіг. 2



Мікрофото. 36. × 32 (лупа)
"Онкопляма", злоякісна онкологія. Темні, дрібні, округлі гранули.

Фіг. 3



Мікрофото. 36. × 32 (лупа)
"Онкопляма", злоякісна онкологія. Темні преципітати у вигляді "німба" ("ореола").

Фіг. 4

ДП "Український інститут промислової власності" (Укрпатент)
Україна, 01133, Київ-133, бульв. Лесі Українки, 26
(044) 295-81-42, 295-61-97

Підписано до друку _____ 2002 р. Формат 60х84 1/8.
Обсяг _____ обл.-вид. арк. Тираж 35 прим. Зам. _____

УкрІНТЕІ, 03680, Київ-39 МСП, вул. Горького, 180.
(044) 268-25-22
