

Новый метод скрининга онкологических заболеваний ОНКОТЕСТ-2

BY VETERINĀRĀRSTS ON 02.02.2014 IN PUBLIKĀCIJAS

Новый метод скрининга онкологических заболеваний ОНКТЕСТ-2

ВЛАДИМИРОВ Виталий Александрович (Кандидат медицинских наук. Заведующий Централизованной клинико-диагностической лабораторией Киевской городской онкологической больницы. Автор метода «Онкотест». Врач-онколог с 27-летним стажем работы. Автор 40 научных работ.)

ВИШНЕВСКИЙ Виталий Вячеславович (Кандидат технических наук. Член-корреспондент АТН Украины. Старший научный сотрудник Института проблем математических машин и систем НАН Украины. Автор 30 научных работ.)

ВВЕДЕНИЕ.

Целесообразность скрининга злокачественных новообразований до настоящего времени остается предметом дискуссий, в связи с недостаточной информативностью, трудоемкостью и

относительно высокой стоимостью скрининговых методик обследования (5,12).

С другой стороны, уже проведенные и проводимые в настоящее время долгосрочные скрининговые программы диагностики рака молочной железы, шейки матки, толстой кишки, предстательной железы и др. наглядно свидетельствуют о значительном возрастании при таких исследованиях числа больных с начальными стадиями онкологических заболеваний и даже снижении смертности от некоторых видов рака в целом. (4,6-8).

На сегодняшний день почти для каждого из наиболее распространенных злокачественных новообразований разработан более или менее эффективный метод скрининговой диагностики,

(маммография — для рака молочной железы, цитологические исследования мазков – для рака матки, тест на скрытую кровь в кале – для рака толстой кишки, PSA – для рака предстательной железы и т.п.). Вместе с тем, проводя скрининг того или иного онкологического заболевания с помощью вышеуказанных методов, можно легко пропустить злокачественную опухоль другого органа для выявления которой, эти методы не пригодны.

Разработанные универсальные скрининговые тесты для ранней диагностики рака (2), одновременное исследование у больного нескольких известных опухолевых маркеров (9), определение генетических изменений в клетках секретов и выделений (10) пока не получили широкого распространения в клинической практике, в связи, либо, с недостаточной диагностической эффективностью, либо, высокой стоимостью.

Нами в течение последних 10 лет разрабатываются методы скрининга злокачественных новообразований с использованием в качестве материала исследования крови, которая с нашей точки зрения является наиболее удобным объектом для универсальных скрининговых тестов.

Первым из таких методов явился Способ диагностики злокачественных новообразований, получивший название «Онкотест»,(3, 11).

Согласно гипотезе, на которой основан этот метод, опухолевые антигены оседают на поверхности эритроцитов, меняя их заряд и некоторые свойства. Антигены могут быть самыми разнообразными, в зависимости от вида и локализации злокачественной опухоли. Однако, общим для них является то, что в их структуре присутствуют ионы кальция. Эти антигены мы условно называем кальций-белковыми комплексами (КБК).

Реактивы, наносимые на мазок крови онкологического больного, взаимодействуют с КБК, вызывая агглютинацию и выпадение в осадок эритроцитов, с образованием после высыхания характерного рисунка. У здорового человека КБК в крови отсутствуют, или их очень мало, поэтому агглютинации и выпадения в осадок эритроцитов не происходит. По мере высыхания реактивов силы поверхностного натяжения растягивают эритроциты к краям «пятна», центр которого остается прозрачным.

За 6 лет испытаний и клинического использования была доказана высокая эффективность «Онкотеста», в качестве метода скрининговой диагностики онкологических заболеваний, вместе с тем проявились и ряд недостатков способа, препятствующих его широкому внедрению в медицинскую практику.

Этими недостатками являются:

1. Сложность приготовления мазков крови, пригодных для проведения реакции;
2. Необходимость поддержания заданных условий внешней среды (температуры, влажности, атмосферного давления) во время проведения реакции;
3. Субъективная оценка результата реакции, требующая длительного обучения;
4. Отсутствие количественного учета результата реакции, что делало невозможным ее использование для динамического наблюдения за обследуемыми.

Все эти недостатки учтены в новом методе скрининга онкологических заболеваний – «Онкотест – 2».

Новый тест основан на определении вышеуказанных комплексов, выделяемых злокачественной опухолью, но уже не в цельной крови, а в сыворотке обследуемого. С наибольшей вероятностью они относятся к ядерным белкам. Реактивы, добавляемые к сыворотке обследуемого взаимодействуют с этими веществами, образуя иммунные комплексы, которые проявляются на свету и изменяют оптическую плотность опытной сыворотки по сравнению с контролем.

На тест зарегистрирована заявка на изобретение в Украине.

В настоящей публикации представлены предварительные данные клинических испытаний Онкотест-2.

ОБЪЕКТ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Материалом для Онкотест-2 служит сыворотка крови пациента в количестве 0,6 на одно исследование. Для проведения теста используются 4 реактива – N 1, 2, 3 и S для разведения сыворотки.

Последовательно, с интервалом в 10 мин в пробирки для реакции вводится по 0,02 1,2 и 3-го реактива и они помещаются под источник дневного света на 1 час.

Постановка всей реакции занимает не более 1,5 часов. Результат реакции определяется с помощью спектрофотометра.

У онкологических больных оптическая плотность сыворотки с реактивами по сравнению с контролем под влиянием света увеличивается (рис.1).

Оптическая плотность сыворотки крови здоровых людей под влиянием реактивов и облучения почти не изменяется, поэтому кривая результирующей оптической плотности сыворотки здоровых людей отличается от таковой у онкологических больных. (Рис 2.)

Для числового выражения результата теста необходимо измерить результирующую оптическую плотность сыворотки на длине волны 364 и 400-410 нм, а затем от второго результата (наибольшего показателя в интервале 400-410 нм) отнять первый. Если полученное значение будет меньше 0, т.е. со знаком минус, то тест отрицательный, а если со знаком +, то тест положительный (высокий риск наличия злокачественной опухоли). При нулевом значении — тест необходимо повторить в течение месяца.

Расчет результата теста можно представить в виде формулы:

Д рез. = Д 400нм — Д 364нм

Тест отрицательный 0 > Д рез. > 0 Тест положительный

Д рез. – результирующая оптическая плотность

Д400 нм — оптическая плотность исследуемой сыворотки на 400нм

Д364 нм — оптическая плотность исследуемой сыворотки на 364 нм

Метод Окотест-2 начал использоваться в клинической практике с марта 2000 года. Всего изучены результаты обследования 748 человек. Пациенты, которые прошли обследование по данному методу, могут быть объединены в 3 группы:

1. Больные, поступившие на обследование и лечение в онкологические учреждения (391чел.).
1. Здоровые люди в возрасте 17-30 лет, с доказанным отсутствием онкологического заболевания при клиническом обследовании (68 чел.).
2. Пациенты, обратившиеся на обследование без предварительного выяснения имеющихся у них заболеваний, с последующим (после проведения ОНКТЕСТ-2) уточнением состояния их здоровья (289 чел.).

РЕЗУЛЬТАТЫ

1.Онкологические больные.

В группу обследованных по методу Онкотест-2 вошли пациенты, лечившиеся в онкологических больницах города Киева и Киевской области, с различной локализацией и стадией злокачественной опухоли.

Реакция Онкотест-2 проводилась до начала лечения, как правило, на второй день после госпитализации в отделение. Сопоставление результата теста и клинического диагноза осуществлялось после всестороннего обследования и лечения больного с обязательным морфологическим исследованием удаленной опухоли.

Результат Онкотест-2 расценивался как истинно положительный (ИП) — при наличии онкологического заболевания и истинно отрицательный (ИО) — при его отсутствии. К ошибочным результатам теста относились ложно положительные (ЛП) — тест положителен, а рака нет), или ложно отрицательные (ЛО) — тест отрицателен, а онкологическое заболевание присутствует) результаты.

Данные обследования онкологических больных с помощью Онкотеста представлены в таблице 1. Диагностическая чувствительность (ДЧ) колебалась от 80,0 до 100% и составила в среднем 92,8%.

ЛО результаты отмечены у 26 (6,65%) пациентов, у 2-х из них наблюдалась механическая желтуха, с интенсивным, ярко-желтым окрашиванием сыворотки крови, которая, по-видимому, и послужила причиной ЛО результата реакции.

В последующих наблюдениях у всех больных с высоким содержанием билирубина в сыворотке крови тест был отрицательным.

У остальных онкологических больных с ЛО результатом реакции причину ошибки теста установить не удалось. Обращает на себя внимание, что 18 из 24 таких больных (75,0%) имели 3 – 4 стадии рака.

ЛП результаты теста отмечены у 27 обследуемых (6,9%). В основном это больные с доброкачественными опухолями молочной железы, матки и кожи, подлежащие хирургическому лечению.

2. Обследование здоровых пациентов.

В группу здоровых пациентов, или доноров вошли добровольцы в возрасте 17 – 30 лет, 42 женщины и 26 мужчин. Перед проведением ОНКТЕСТ-2 все доноры прошли тщательное клинико-инструментальное обследование и признаны здоровыми. Результаты обследования представлены в Таблице 2.

Из 68 обследованных истинно-отрицательный результат теста был отмечен у 65 человек (95,6%). У 3-х пациентов (все женщины) тест показал ЛП результат. Выяснение причин ЛП реакций у этих людей позволило установить: двое принимали менее чем за 12 часов до теста лекарственные препараты (снотворное и поливитамины). Повторный тест без приема лекарств показал отрицательный результат. У третьей пациентки бабушка и тетка по линии матери болели раком молочной железы. При обследовании молочных желез (УЗИ, маммография) опухолей не обнаружено, определяются признаки диффузной мастопатии. Пациентка взята на диспансерный учет.

3. СКРИНИНГ ОНКОЛОГИЧЕСКИХ ЗАБОЛЕВАНИЙ С ИСПОЛЬЗОВАНИЕМ Онкотест-2

В данную группу включены пациенты, которые самостоятельно обращались на обследование по методу ОНКТЕСТ-2. Информация о состоянии здоровья этих людей до обследования отсутствовала. После получения результата ОНКТЕСТ-2 у пациентов выясняли причину, по которой они решили пройти тест, проводили клинический осмотр, а также направляли на дополнительные методы диагностики (УЗИ, эндоскопию, рентгенологические, биохимические и прочие исследования) с целью выяснения имеющихся заболеваний.

Всего, в течение 6 месяцев обследовано 370 человек. Уточненные данные о состоянии здоровья после ОНКОТЕСТ-2 получены у 289. Среди них было 215 женщин и 74 мужчины. Средний возраст обследованных составил 47 лет.

Почти у 40% пациентов имели место несколько различных заболеваний, однако, для упрощения оценки их влияния на результат теста, учитывалось только то заболевание, которое беспокоило пациента больше всего в период тестирования.

Пациентам объясняли, что тест не является методом окончательной диагностики рака, а служит первым этапом отбора (скрининга) людей с высоким риском развития онкологического заболевания, за которым, в случае положительной реакции, должно последовать тщательное клинико-инструментальное обследование и динамическое наблюдение.

В данной группе пациентов, дополнительное обследование проводили всем, независимо от результата ОНКОТЕСТ-2.

За сутки до проведения ОНКОТЕСТ-2 пациентам предлагали не принимать никаких лекарственных препаратов, антибиотиков и алкоголь. Исключение составляли больные, которые не могли не принимать регулярно препараты, в связи с имеющимися у них заболеваниями (сахарный диабет, выраженная сердечно-сосудистая недостаточность, гипертоническая болезнь, состояние после тиреоидэктомии и пр.). У таких пациентов окончательный результат теста учитывался в динамике, т.е., если даже первоначальный результат ОНКОТЕСТ-2 был положительным, проводилось второе и третье тестирование. Рост показателя по сравнению с исходным уровнем свидетельствовал о высоком риске наличия злокачественной опухоли.

Пациентам с отрицательной реакцией ОНКОТЕСТ-2 рекомендовали повторное профилактическое обследование каждые 6 месяцев. Онкологическим больным, после радикальных операций в первый год рекомендовали обследование через каждые 3 месяца, во второй – 3 раза в год, и на третий – 1 раз в шесть месяцев.

Предварительные результаты скрининга онкозаболеваний с использованием ОНКОТЕСТ-2 представлены в Таблице 3.

Только 12 человек после обследования были учтены как практически здоровые люди. У всех результат реакции оказался истинно отрицательным (ИО).

Мы специально выделили в Таблице 3 результат 4-х беременных женщин. У 3-х из них (все в первой половине беременности 10, 12 и 15 недель) тест показал отрицательный результат. У одной женщины, с беременностью сроком 27 недель, тест оказался положительным, как при первичном, так и при повторном исследовании спустя 3 дня. При

тщательно проведенном обследовании признаков онкологического заболевания обнаружено не было. За женщиной установлено динамическое наблюдение.

Наиболее многочисленную группу обследуемых составили пациенты с различными воспалительными заболеваниями (94). Среди них: хронические воспалительные процессы ЖКТ (29), печени, поджелудочной железы и желчных путей (25), половых органов (19), мочевыводящей системы (7), легких (5) и пр. (6). ИО результат теста получен у 83 (91,2%) пациентов данной группы. У 8 человек с положительным ОНКОТЕСТ-2 при дальнейшем обследовании, рака обнаружено не было (у 3-х хронический гепато-холецистит, 1 – анацидный гастрит, 1 – хронический бронхит курильщика, 2 – аднексит, 1 – хронический простатит). У 6 из этих 8 пациентов кровные родственники болели онкологическими заболеваниями.

4 пациента, из представленных в Таблице 3, были направлены на ОНКОТЕСТ-2 из медицинских учреждений с подозрением на злокачественное новообразование. У 1-й больной был заподозрен лимфогрануломатоз (болезнь Ходжкина), имелось цитологическое подтверждение злокачественного процесса (пункция шейного лимфоузла). ОНКОТЕСТ-2- дважды отрицательный. При гистологическом исследовании удаленного лимфоузла – реактивный лимфаденит.

У 2-х пациентов был заподозрен рак предстательной железы (получены высокие цифры PSA). Онкотест-2 – отрицательный. Дважды выполнена пункционная биопсия – явления хронического простатита и гиперплазия предстательной железы.

У 1-й больной при КТ поставлен диагноз опухоли мозга. Результат Онкотест-2 отрицательный. При дообследовании – серологические пробы на токсоплазмоз положительны, из анамнеза — в доме живет кошка, окончательный диагноз – токсоплазмоз.

Трое обследованных данной группы имели острые воспалительные заболевания (абцесс передней брюшной стенки – 1, острая пневмония – 1, вирусная инфекция верхних дыхательных путей – 1). Во всех случаях имела место высокая температура – 38 С и выше, сдвиг формулы крови влево, повышение СОЭ – более 20 мм рт. ст. В одном наблюдении (острая пневмония) тест был отрицательным, в двух других – ЛП.

Нами специально выделена группа больных с аутоиммунными заболеваниями (6 человек – 2-ое с аллергическими реакциями, 2-ое с аутоиммунным тиреоидитом, 1 – склеродермия, 1 – бронхиальная астма), так как, несмотря на небольшое количество наблюдений у этих больных преобладали ЛП результаты ОНКОТЕСТ-2. Отрицательный тест был получен у 2-х больных — при аутоиммунном тиреоидите и бронхиальной астме.

У 35 обследованных с помощью ОНКОТЕСТ-2 преобладали заболевания, связанные с нарушением эндокринной системы: сахарный диабет различной степени тяжести – 5 человек, нарушение менструального цикла – 8, тиреоидиты – 3, мастопатии — 17, кисты яичников – 2.

У 29 из 35 пациентов данной группы (82,9%) ОНКОТЕСТ-2 был отрицательный.

В группу с ЛП результатом попали 2 человека с сахарным диабетом (оба на инсулине), 2 больных с мастопатией (у обеих пациенток кровные родственники по женской линии болели онкологическими заболеваниями), 1 больная с нарушением менструального цикла и 1 больная с тиреоидитом.

Вторую по частоте группу пациентов, представленных в таблице 3 составили больные с доброкачественными опухолями – 58 человек.

Почти все они обратились на обследование с подозрением на онкологическое заболевание. ИО результат реакции получен у 51 (87,9%) больного. У 7 – тест оказался ЛП.

Локализация обнаруженных доброкачественных опухолей, и результат ОНКОТЕСТ-2 представлены в Таблице 3А.

Наибольшее число ЛП реакций ОНКОТЕСТ-2 получено при узловом зобе – 3 из 7. Нельзя исключить, что если бы данные 3-е больных не были своевременно прооперированы, у них со временем не развилась бы злокачественная опухоль щитовидной железы.

У 25 больных, обследованных с помощью теста, установлен диагноз онкологического заболевания (Таблица 3Б). 20 больных этой группы (80,0%) обнаружены с помощью ОНКОТЕСТ-2. 17 из них (85,0%) имели 1 или 2 стадии заболевания.

Приводим несколько примеров:

Больная Б.А.В., 1943 года рождения, обратилась на обследование с профилактической целью. ОНКОТЕСТ-2 – положительный. При осмотре в левой молочной железе, в наружно-латеральном квадранте, определяется опухолевое образование до 0,5 см в диаметре. УЗИ, маммография – опухоль молочной железы, пункционная биопсия – железистый рак. Клинический диагноз – рак левой молочной железы, стадия 1.

Больной К.В.П., 1937 г.р., проходил ежегодное профилактическое обследование с 1998 г. по методу «ОНКОТЕСТ». Очередное обследование в апреле 2000 г. по методу ОНКОТЕСТ-2. Результат – положителен. При клиническом осмотре и инструментальном

обследовании (флюорографии легких, УЗИ органов брюшной полости, осмотре per rectum предстательной железы и прямой кишки) опухолевых образований (за исключением гиперплазии предстательной железы 2 степени) обнаружено не было. Повторный тест в мае 2000 г. снова положительный. Проведено дополнительное обследование (гастроскопия и фиброколоноскопия). При фиброколоноскопии на 18 см обнаружен полип 1,5 см на ножке. Выполнено электроиссечение полипа. Гистологическое заключение – железистый полип с малигнизацией.

Больная Б.М.Б., 1939 г.р., в марте 2000 г. обратилась на профилактическое обследование с помощью ОНКОТЕСТ-2. Результат – положительный. Проведено клинично-инструментальное обследование желудочно-кишечного тракта, органов пищеварения, половых органов – опухолевых образований не обнаружено. Рекомендован контрольный тест через 1 месяц. Больная не явилась. В августе 2000 г. отметила кровотечение из мочевого пузыря. При цистоскопии обнаружена экзофитная опухоль мочевого пузыря размером 5 см. Гистологически – переходно-клеточный, стадия 2.

15 из 20 больных с ИП результатом ОНКОТЕСТ-2 в момент обследования не имели никаких характерных признаков злокачественной опухоли. Остальные были направлены врачами с подозрением на онкологическое заболевание.

Из пяти пациентов с ЛЮ тестом у 3-х (рак молочной железы, желудка и яичников) была обнаружена опухоль с отдаленными метастазами.

В группу пациентов с рецидивами и метастазами злокачественных опухолей вошли больные, обследованные по методу ОНКОТЕСТ-2 в различные сроки после хирургического или комбинированного лечения.

ИП результат теста получен у 11 человек (84,6%). У 2-х больных с ЛЮ результатом имела место механическая желтуха.

В последнюю группу таблицы 3 «Прочие» включены пациенты, у которых доминировали сердечно – сосудистые заболевания (12), заболевания позвоночника (остеохондроз – 7), язвенная болезнь желудка — 2 человека, заболевания центральной нервной системы (эпилепсия – 1), синдром Жильбера – 1.

Тест показал ЛП результат у 2-х больных с гипертонической болезнью 2Б стадии и ишемической болезнью сердца. В обоих случаях больные длительное время принимали лекарственные препараты. Наблюдение за этими больными продолжается.

Выводы:

1. По предварительным результатам скрининга злокачественных новообразований с использованием ОНКОТЕСТ-2, ДЧ метода составила – 81,6%, ДС — 87,6%.
2. ДС ОНКОТЕСТ-2 снижается при беременности, острых воспалительных заболеваниях, аутоиммунных заболеваниях и узловом зобе. ДЧ теста может снижаться при обследовании онкологических больных с поздними стадиями заболевания.
3. Пациенты с положительным ОНКОТЕСТ-2 должны пройти тщательное клинико–инструментальное обследование. Если опухоль не будет обнаружена, такой пациент должен наблюдаться в течение последующих 6 месяцев, в продолжение которых ОНКОТЕСТ-2 повторяется не менее 3-х раз, а инструментальное и прочие виды обследования охватывают все органы и системы.
4. Предварительные данные обследования больных после хирургического и комплексного лечения рака свидетельствуют о возможности использования ОНКОТЕСТ-2 и для мониторинга онкологических больных.
5. В случае если ОНКОТЕСТ-2 положителен у пациента с наследственной предрасположенностью к злокачественным новообразованиям, но при углубленном обследовании опухоль не обнаруживается, к динамическому наблюдению за таким больным целесообразно прибавить прием иммуностимуляторов или иммуномодуляторов, под контролем исследования иммунологического статуса организма.

Литература:

1. Владимиров В.А., Суслов Е.И. Онкотест – универсальный метод скрининга злокачественных опухолей. В Сб. «Материалы X съезда онкологов Украины». 2001, с. 65-66.

2. Короткоручко В.П. Осадочная реакция на рак при диагностике опухолевой болезни. Киев. Наукова думка. 1967, 77стр.

3. Суслов Е.И., Галахин К.А., Владимиров В.А. Скрининг злокачественных новообразований с использованием нового метода маркерной диагностики «ОНКОТЕСТА». Врачебное дело, 1997, №1, с. 99-102.

4. Bessho F: Effects of mass screening on age specific incidence of neuroblastoma. Int. J. Cancer 67(4): 520-522, 1996.

5. Black WC : Assessing the benefits of treating premalignant lesions. Accomplishments in cancer research: 200-208, 1995.

6. Cancer screening and diagnosis. The medical clinics of North America. V.80, # 1: 255 p.p., 1996.

7. Friedman DR, Dubin N: Case-control evaluation of breast cancer screening efficacy. Am. J. Epidemiol. 133(10):974-984, 1991.
8. Hakama M, Miller AB, Day NE Eds.: Screening for cancer of the uterine cervix. Lyon, IARS Scientific Publications, № 76, 1986.
9. Pamies RJ, Crawford DR : Tumor Markers. An Update. The medical clinics of North America. 80 (1): 185-199, 1996.
10. Sidransky D. Early molecular detection of cancer: Accomplishments in cancer research: 115-120, 1995.
11. Suslov EI, Galakhin KA, Vladimirov VA, Novik AM : USA patent #5,795,785; 1998.
12. Weiss NS, Lazovich D: Case-control studies of screening efficacy: the use of persons newly diagnosed with cancer who later sustain an unfavorable outcome.
Am. J. Epidemiol. 143 (4): 319-322, 1996.