

ČESKOSLOVENSKÁ
SOCIALISTICKÁ
REPUBLIKA
(19)



ÚŘAD PRO VYNÁLEZY
A OBJEVY

POPIS VYNÁLEZU

K AUTORSKÉMU OSVĚDČENÍ

(61)
(23) Výstavní priorita
(22) Přihlášeno 18.10.78
(21) (PV 6768-78)

(40) Zveřejněno 31.10.79
(45) Vydáno 30.09.83

199478
(11) (B1)

(51) Int. Cl.³
G 01 N 23/04

(75)

Autor vynálezu

Poláček Přemysl prof. MUDr. DrSc., Brno

(54)

ZPŮSOB DIAGNOSTICKÉHO ZJIŠŤOVÁNÍ MÍRY BIOLOGICKÉ AKTIVITY NÁDORU

Vynález se týká způsobu diagnostického zjišťování míry biologické aktivity nádoru pomocí metody mrazového leptání (freeze etching).

Míra biologické aktivity nádoru má značný význam pro určení správné diagnózy a následné určení léčebného postupu. Dosud byla míra proliferační aktivity sledována z nádorového materiálu několika složitými a náročnými postupy, přičemž se pracuje s omezenou přesností. Jeden ze způsobů je založen na schopnosti inkorporace prekurzorů DNA do jádra proliferující buňky. Lze ji aplikovat na tkáňových kulturách buněk, případně i na bioptickém materiálu. Postup vyžaduje isotopové vybavení pracoviště, přitom historadiografické odečtení nelze rutinně provádět. Předpokladem je, že všechny nádorové buňky jsou aktivizované, část v G_0 fázi cyklu není zachycena. Další metoda je založena na tak zvaném sociálním chování buněk v populaci. Lze ji použít pouze na měření na tkáňových kulturách, ne však z biopsií. Vykultivované nádorové populace buněk se filmují časosběrným filmem a sleduje se jejich chování při vzájemném kontaktu. Míra ztráty kontaktní inhibice ukazuje na proliferační a invazivní schopnost nádoru. Tato metoda zatím nepřekročila stupeň základního výzkumu a nebyla dosud použita na lidském nebo zvířecím bioptickém materiálu, ale pouze v systému zdravých a nádorovým virem transformovaných buněk. Na schopnosti vázat na jaderné struktury bázecká barviva

je založena metoda vycházející z poznání, že nádorové buňky obsahují větší množství chromatinu a ten bývá u nádorů kondenzovanější. Úměrně ke zvětšení množství chromatinu se zvýší i bazofilie jádra. Lze sledovat i u histogramů nádorové buněčné populace, avšak není prokázáno dostatečně, že bazofilie jader je opravdu výrazem nádorové proliferací aktivity. Metoda je dále zatížena chybou vznikající při preparaci buněk z nádoru, protože i mrtvé buňky mají kondenzovanější chromatin a tím i zvýšenou bazofilii jader. Nejběžnější orientační test z bioptického materiálu, který je dosud používán, je založen na sledování mitotického indexu, to je množství mitóz v daném zorném poli světelného mikroskopu. Je však subjektivní, neboť nepostihuje fáze buňky mezi mitózami. Je silně ovlivněn jakýmkoliv cytostatikem, která dostává pacient. Zachycuje jen zlomek života buňky, mitózu.

Výše uvedené nedostatky podstatně snižuje způsob diagnostického zjišťování míry biologické aktivity nádoru podle vynálezu. Jeho podstata spočívá v tom, že se porovnává počet aktivních buněk vyjádřený počtem jaderných pórů na jednotku plochy v normální tkáni a v tkáni s předpokládaným nádorovým bujením, přičemž zvýšený počet aktivních buněk v tkáni, zpravidla s počtem jaderných pórů vyšším než 10 jaderných pórů na 1 čtvereční mikrometr je ukazatelem nádorového bujení. Výše procenta aktivních buněk ve zkoumané tkáni určuje prognózu nádorového bujení. Hustota jaderných pórů se zjišťuje metodou mrazového leptání s následným vyhodnocením v elektronovém mikroskopu a určuje se na zhotovených elektrogramech.

Počet aktivních buněk v poměru k počtu buněk málo aktivních vyjadřuje kvantitativně biologickou aktivitu nádorového bujení. Dává tedy možnost číselného vyjádření buněk aktivizovaných proti normálním jako zpřesňující doplněk k histologickému vyšetření pomocí světelného mikroskopu, zvláště v těch případech, kdy je nutno stanovit aktivitu proliferace nádorového bujení. Metoda podle vynálezu určuje míru aktivity, ale sama o sobě nemůže určit typ nádorového bujení, neboť jednotlivé druhy buněk lze jen těžko určit metodou mrazového leptání, pokud tyto buňky nevykazují v cytoplazmě zvláštní útvary, například tonofibrily v buňkách epidermis, protože jádra a jejich blány se jeví u všech buněk stejné, vyjma dané frakvence pórů. Typ nádorového bujení je proto nutno nadále zjišťovat histologickým šetřením ve světelném mikroskopu. Způsob podle vynálezu podává přesnější, kvantitativně vyjádřitelný obraz o rychlosti proliferace a je proto použitelný i k prognostickým účelům.

Praktické provedení způsobu je názorně uvedeno v následujících příkladech.

Příklad 1

Byly použity biopsie z operovaných melanomů a srovnávány s biopsiemi normální kůže člověka, neboť nelze najít vhodný adekvátní kontrolní objekt (viz hypotézy o vzniku melanomů). Bioptický materiál byl hned po operačním odběru přenesen do 30% glycerinu a 2 hodiny ponechán při pokojové teplotě,

poté zmrazen v mrazicí aparatuře, přenesen do tekutého dusíku a zpracován v aparatuře pro mrazové leptání. Repliky byly fotografovány v elektronovém mikroskopu a frekvence pórů vypočítávána na snímcích při zvětšení 36.000 krát. Při porovnání buněk normální pokožky s melanomy bylo zjištěno, že při zachycení 18 jader epitelových buněk pokožky byla průměrná hustota pórů 8,4 na jeden čtvereční mikrometr. Z počtu sledovaných jader pouze 11 % vykazovalo větší frekvenci než 10, viz graf 1 a obr. 1. Aktivizované buňky jsou zřejmě rostoucími buňkami pokožky. U biopsie melanomu bylo sledováno 30 jader buněk, přičemž byla zjištěna průměrná hustota pórů 11,5, avšak 77 % jader vykazovalo větší frekvenci než 10 pórů na čtvereční mikrometr, viz graf 1 a obr. 2. Na grafu 1 a obr. 1 a 2 je názorně zobrazen výsledek porovnávání podle tohoto příkladu.

Příklad 2

Stejným postupem jako v příkladu 1 byl sledován melanom po úspěšném léčení a bylo zjištěno pouze 8,3 pórů na jeden čtvereční mikrometr a jen 9 % buněk aktivizovaných.

Příklad 3

Postupem podle příkladu 1 byl sledován nodulární exophytický melanom progredující s četnými metastázemi, který vedl ke smrti pacienta během několika dní. Tento melanom měl v průměru 19,3 pórů na jeden čtvereční mikrometr a 99 % buněk bylo aktivizovaných.

Příklad 4

Byly porovnávány biopsie děložních sliznic ve fázi proliferační i sekreční s karcinomem sliznice děložní. Odběr vzorků a měření bylo prováděno jako v příkladě 1. Biopsie normální sliznice ukázala frekvenci pórů u 41 jader v průměru 7,3 a jen 10 % buněk překročilo počet pórů 10, viz graf 2 a obr. 3. Aktivita 10 % buněk souvisí s obnovováním sliznice. U rakoviny sliznice děložní, sledované na 59 jádrech byla průměrná frekvence pórů 10,5, avšak 56 % buněk bylo aktivizováno, to je málo více jak 10 pórů na jeden čtvereční mikrometr, viz znázornění na grafu 2 a obr. 4.

Obdobné výsledky byly zjištěny v řadě dalších případů.

Předmět vynálezu

1. Způsob diagnostického zjišťování míry biologické aktivity nádoru, vyznačený tím, že se porovnává počet aktivních buněk vyjádřený počtem jaderných pórů na jednotku plochy v normální tkáni a v tkáni s předpokládaným nádorovým bujením, přičemž zvýšený počet aktivních buněk v tkáni, zpravidla

s počtem jaderných pórů vyšším než 10 jaderných pórů na 1 čtvereční mikrometr je ukazovatelem nádorového bujení.

2. Způsob podle bodu 1, vyznačený tím, že hustota jaderných pórů se zjišťuje metodou mrazového leptání s následným vyhodnocením v elektronovém mikroskopu.
3. Způsob podle bodu 1 a 2, vyznačený tím, že hustota jaderných pórů se určuje na zhotovených elektronogramech.



buňky normální

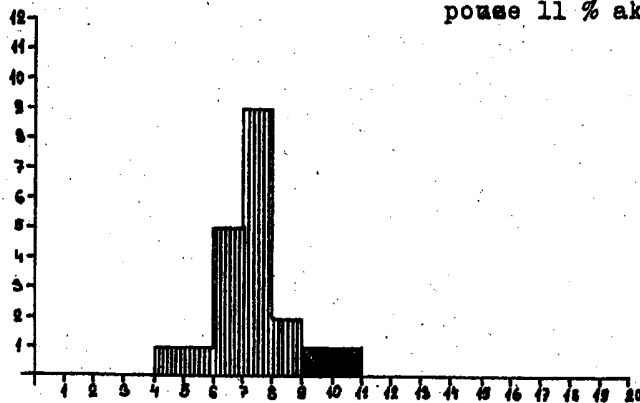


buňky se zvýšenou aktivitou

počet
případů

POKOŽKA ČLOVĚKA

pouze 11 % aktivních buněk



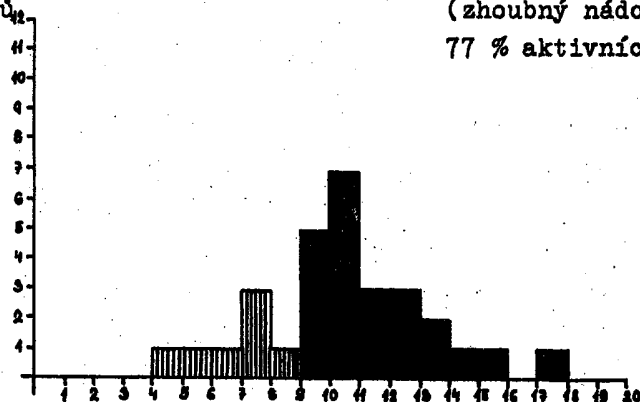
počet pórů na 1 $\mu\text{m}^2 = 8,4$

počet
případů

MELANOM ČLOVĚKA

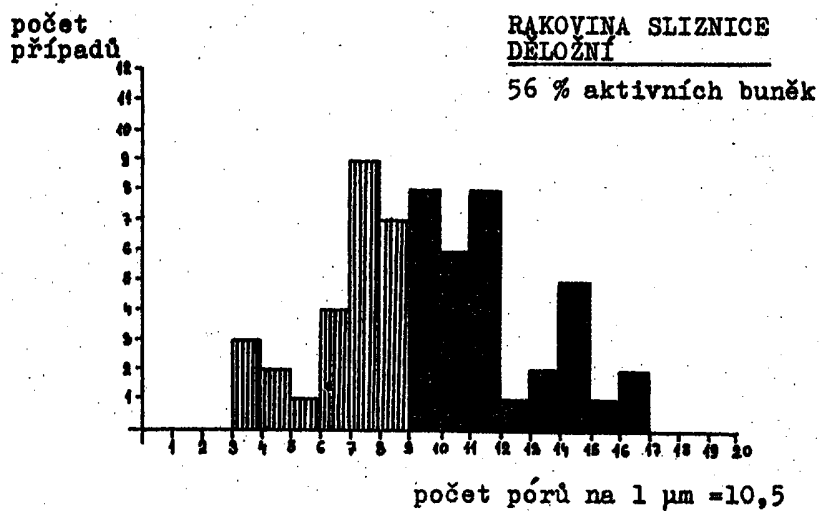
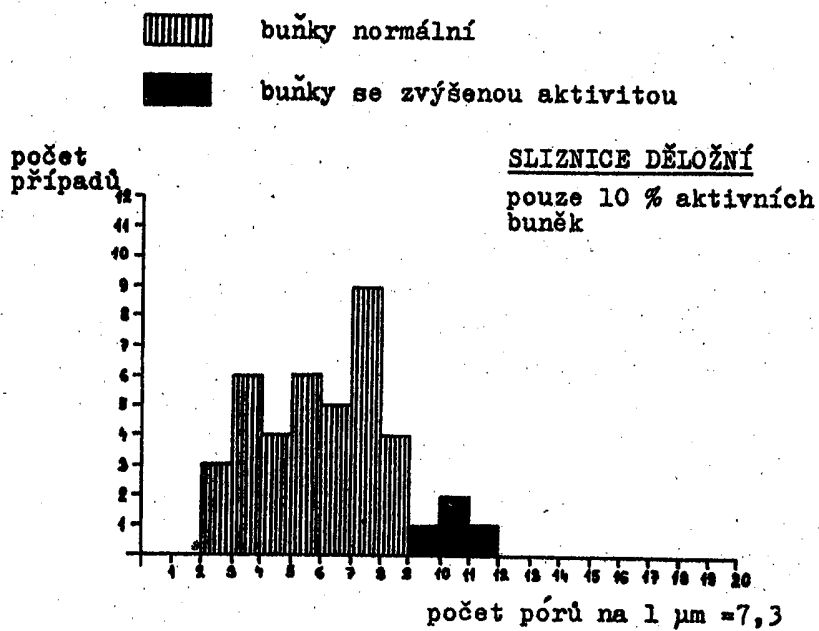
(zhoubný nádor kůže)

77 % aktivních buněk

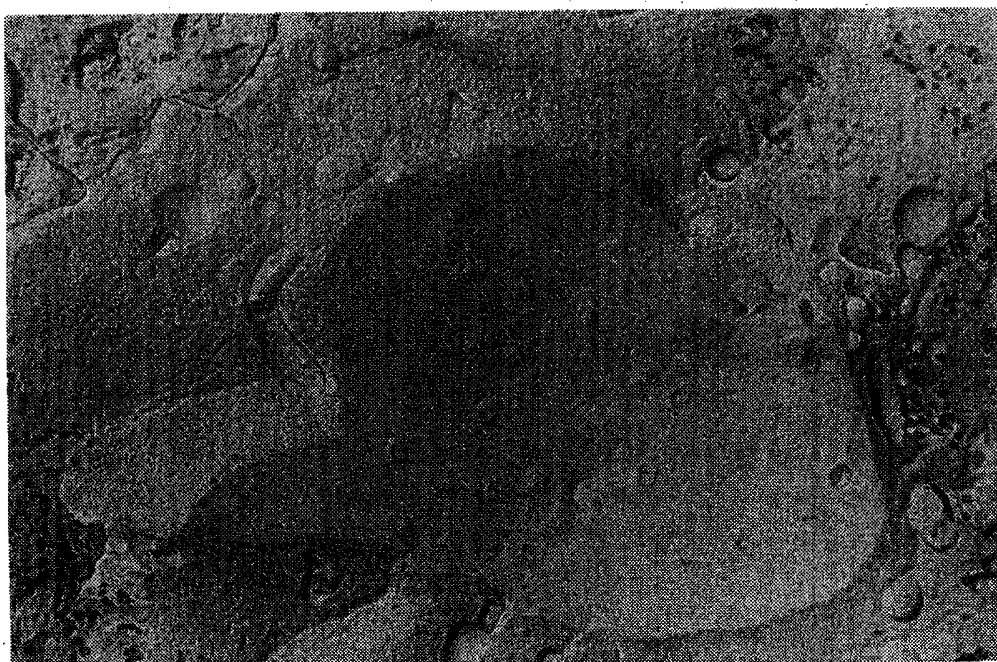


počet pórů na 1 $\mu\text{m}^2 = 11,5$

Graf 1

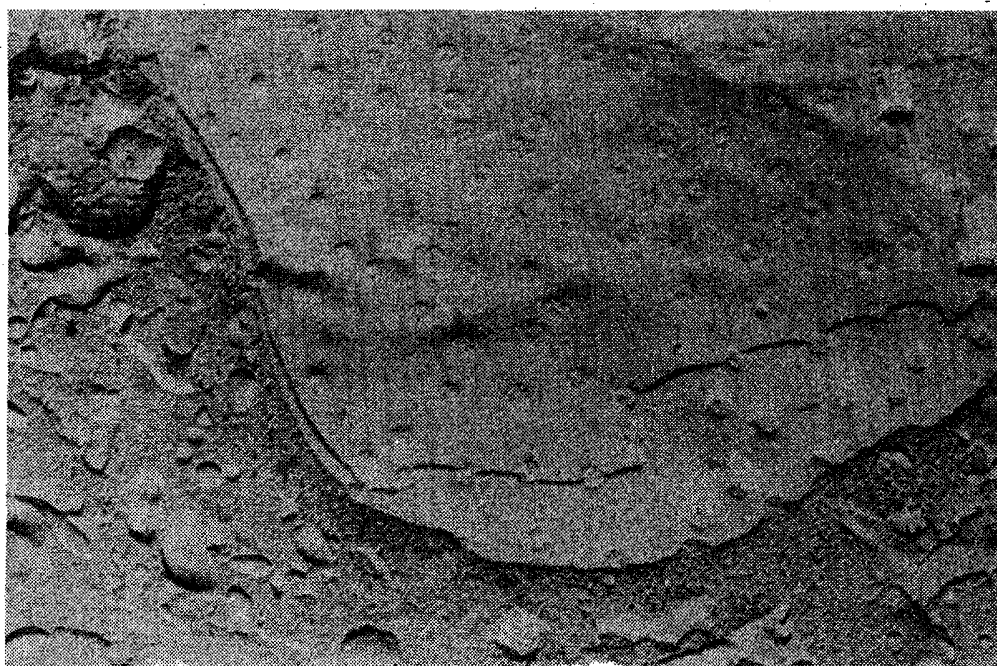


Graf 2



Obr. 1

Epiteliální buňka pokožky člověka, 7,9 pórů
na 1 čtvereční mikrometr. Zvětšení 39.000 x



Obr. 2

Buňka maligního melanomu člověka. 16,4 pórů
na 1 čtvereční mikrometr. Zvětšení 39.000 x



Obr. 3

Normální buňka sliznice děložní člověka. 8,4 pórů
na 1 čtvereční mikrometr. Zvětšení 39.000 x



Obr. 4

Rakovina buňky sliznice děložní člověka. 18,0 pórů
na 1 čtvereční mikrometr. Zvětšení 39.000 x