

PŘIHLÁŠKA VYNÁLEZU

zveřejněná podle § 31 zákona č. 527/1990 Sb.

(21) Číslo dokumentu:

2000 - 949

(13) Druh dokumentu: **A3**

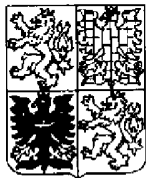
(19)
ČESKÁ
REPUBLIKA

(22) Přihlášeno: 15.03.2000

(40) Datum zveřejnění přihlášky vynálezu: 17.10.2001
(Věstník č. 10/2001)

(51) Int. Cl. ⁷:

G 01 N 33/49
G 01 N 33/52
G 01 N 33/574



ÚŘAD
PRŮMYSLOVÉHO
VLASTNICTVÍ

(71) Přihlašovatel:

FALTUS Igor I., Praha, CZ;
LIVENCOV Vladimír V., Kiev, UA;

(72) Původce:

Faltus Igor I., Praha, CZ;
Livencov Vladimír V., Kiev, UA;

(74) Zástupce:

Guttman Michal JUDr. Ing., Nad Štolou 12, Praha 7,
17000;

(54) Název přihlášky vynálezu:

**Způsob spektroskopické diagnostiky
rakovinových onemocnění v biologickém
materiálu**

(57) Anotace:

Způsob spočívá v tom, že se kapka vzorku krve před a po zpracování 20 až 30 μ l 5 % až 20 % vodného roztoku chloridu kovu alkalických zemin po dobu 5 až 10 min. při teplotě 10 až 30 °C ve formě nátěru podrobí snímání infračerveného spektra v intervalu 1600 až 1700 cm^{-1} , načež se pro vzorek stanoví poměr integrovaných ploch absorpčních maxim po zpracování a před zpracováním činidlem, zejména po převedení spekter na druhé odmocniny, přičemž při velikosti poměru těchto ploch vyšším než 1,2 je ve vzorku přítomno rakovinové onemocnění a při velikosti tohoto poměru 0,4 až 1,2, zejména 0,44 až 1,2, je rakovinové onemocnění nepřítomno.

CZ 2000 - 949 A3

Způsob spektroskopické diagnostiky rakovinových onemocnění v biologickém materiálu

Oblast techniky

Vynález se týká způsobu zjišťování vlastností biologického materiálu, využitelných v oblasti medicíny, a sice v onkologii.

Dosavadní stav techniky

Je znám způsob diagnostiky zhoubných nádorů plic podle ukrajinského patentu č. 2001 z 30.11.1993, který spočívá v tom, že na nátěr krve nemocného rakovinou plic, odebrané z loketní žíly, se odděleně nanese dvě kapky 25% roztoku komplexonu, a pak po 10 minutách do jedné ze dvou kapek každého nátěru se vpraví kapka séra z krve vyšetřovaného pacienta a do druhé kapky se vpraví sérum dárce skupiny A, potom po 10 minutách se do všech kapek přidá jedna kapka 0,25% činidla vývojky KBK a při vyvolávání v jasném světle za 3 až 4 hodiny se v kapce séra vyšetřovaného pacienta, pokud jde o nemocného rakovinou plic, objeví skvrna černohnědé barvy v centru s rozmazanými okraji nátěru, a v kapce, do které bylo vpraveno sérum krve dárce skupiny A, se objeví skvrna černé barvy s rozmazanými okraji a drobně zrnité granule přesného obrysu; prosvítání barvy centra skvrny v druhé kapce také diagnostikuje zhoubný nádor.

Tento způsob má řadu nedostatků: používá se velké množství činidel: (trilon B, sérum, dusičnan stříbrný), používá se striktně standardizované sérum krve určité skupiny, doba provedení vyšetření je dlouhá (3 až 4 hodiny), není přítomno objektivní zhodnocení výkonu, protože intenzita reakce se hodnotí zrakem. Je nutné také počítat s tvarem a strukturou kapky.

Dále je známo použití rezonanční Ramanovy spektroskopie pro zjištění rakovinových onemocnění podle patentu USA č. 4,832,483 z 23.5.1989. Způsob zjištění rakovinových onemocnění u pacientů spočívá v obdržení vzorků plazmy krve

vyšetřovaného pacienta a měření intenzity spektra Ramanova rozptýlení v daném vzorku plazmy krve v intervalu 1000 až 1600 cm^{-1} . Dále ve srovnání intenzit obdržených z vyšetřovaného vzorku a plazmy krve zdravého člověka a to za stejných podmínek a ve stejném intervalu frekvencí.

Nedostatky tohoto způsobu jsou: nízká informativnost odebrané krve, (odebírání se jenom žilní krev), nutnost obdržení vzorku krve od pacienta cestou odběru venózní krve a její odstředění; dále traumatická, slabá ochrana proti infekci, nutnost použití konzervačního prostředku, nepřítomnost specifické kontroly čistoty chemické reakce. Nepočítá se s druhotnou strukturou bílkoviny, která prodělává změnu při rakovinových onemocněních. Není možné používat tento způsob pro hromadné vyšetření pro složitost odběru krve.

Úkol, před kterým stojí tento vynález, je zjednodušit proces diagnózy a zvýšit přesnost a informativnost hodnocení výsledků vyšetření.

Podstata vynálezu

Docílí se toho následujícím způsobem. Na jednu kapku odebraného vzorku krve se působí po dobu 5 až 10 min při teplotě 10 až 30 $^{\circ}\text{C}$ 20 až 30 μl činidla, tvořeného 5% až 20% vodným roztokem chloridu kovu alkalických zemin. Ze vzorků před a po vpravení činidla se připraví nátěry, například na podložním sklíčku, a po vyschnutí se podrobí snímání infračerveného spektra v intervalu 1600 až 1700 cm^{-1} . Pro každou dvojici spekter (tj. pro každý vzorek před a po vpravení činidla) se stanoví poměr integrovaných ploch absorpčních maxim. Tento poměr je možno stanovit přímo ze získaných infračervených spekter nebo zejména po převedení naměřených hodnot absorpce na druhé odmocniny (získání „druhých odmocnin spekter“). Stanovení uvedených ploch a jejich poměru je možno výhodně provádět pomocí automatizovaného spektroskopu (například Specord). Při velikosti poměru integrovaných ploch absorpčních maxim po a před použitím činidla od 1,2 do ∞ se diagnostikuje rakovinové onemocnění. Při velikosti poměru od 0,4 do 12, zejména od 0,44 do 1,2, je test na rakovinové onemocnění negativní.

Přehled obrázků na výkresech

Obr. 1 zobrazuje infračervené spektrum vzorku krve pacienta podle příkladu 1; obr. 1A představuje infračervené spektrum vzorku téhož pacienta, zpracovaného činidlem. Obr. 1B, resp. 1C představují druhé odmocniny těchto spekter.

Obr. 2 zobrazuje infračervené spektrum vzorku krve pacienta podle příkladu 2; obr. 2A představuje infračervené spektrum vzorku téhož pacienta, zpracovaného činidlem. Obr. 2B, resp. 2C představují druhé odmocniny těchto spekter.

Obr. 3 zobrazuje infračervené spektrum vzorku krve pacienta podle příkladu 3; obr. 3A představuje infračervené spektrum vzorku téhož pacienta, zpracovaného činidlem. Obr. 3B, resp. 3C představují druhé odmocniny těchto spekter.

Obr. 4 zobrazuje infračervené spektrum vzorku krve pacienta podle příkladu 4; obr. 4A představuje infračervené spektrum vzorku téhož pacienta, zpracovaného činidlem. Obr. 4B, resp. 4C představují druhé odmocniny těchto spekter.

Tato spektra a jejich odmocniny byly pořízeny pomocí přístroje Specord.

Příklady provedení vynálezu

Příklad 1

Provádělo se vyšetření krve pacienta S. Nátěr krve se nanese na podložní sklíčko, byl vysušen a snímán v infračerveném spektru v intervalu 1600 až 1700 cm^{-1} (obr. 1). Dále se tentýž vzorek zpracoval po dobu 10 min při teplotě místnosti s $25\ \mu\text{l}$ 10% vodného roztoku chloridu hořečnatého, byl vysušen a snímán v infračerveném spektru ve stejném intervalu (obr. 1A). Byly získány druhé odmocniny těchto spekter ve stejném intervalu pro vypočítání integrovaných ploch absorpčních maxim (obr. 1B a 1C). Na obrázku 1B je zobrazen fragment druhé odmocniny infračerveného spektra

nátěru krve před zpracováním činidlem. Plocha S1 v intervalu 1672 až 1655 cm^{-1} se rovná 2,35 cm^2 . Na obrázku 1C je zobrazena část druhé odmocniny infračerveného spektra nátěru krve po zpracování činidlem. Plocha S2 v intervalu 1668 cm^{-1} až 1656 cm^{-1} se rovná 1,88 cm^2 . Poměr ploch S2/S1 se rovná 0,80, což svědčí o nepřítomnosti rakovinového onemocnění u pacienta. Dodatečné vyšetření pacienta S potvrdilo závěry výsledku spektroskopického vyšetření.

Příklad 2

Stejným postupem jako v příkladu 1 se provádělo vyšetření krve pacienta K. a naměřené hodnoty jsou znázorněny na obr. 2, 2A, 2B a 2C. Na obr. 2B je zobrazen fragment druhé odmocniny infračerveného spektra nátěru krve v intervalu 1668 až 1656 cm^{-1} před zpracováním činidlem. Plocha S1 se rovná 0,52 cm^2 . Na obr. 2C je zobrazena část infračerveného spektra druhé odmocniny po zpracování činidlem. Plocha S2, která leží v intervalu 1664 až 1656 cm^{-1} , se rovná 1,60 cm^2 . Poměr ploch S2/S1 se rovná 3,07, což svědčí o přítomnosti rakovinového onemocnění u pacienta. Po provedení klinického rentgenového, endoskopického a histologického vyšetření byla stanovena diagnóza: rakovina prsní žlázy, nález za 4 měsíce, metastázy v lymfatických uzlinách, metastázy za pobřišnici, prorůstající do tenkého střeva. Toto potvrdily výsledky spektroskopického vyšetření.

Příklad 3

Stejným postupem jako v příkladu 1 se provádělo vyšetření krve pacienta L. a naměřené hodnoty jsou znázorněny na obr. 3, 3A, 3B a 3C. Na obr. 3B je zobrazen fragment druhé odmocniny infračerveného spektra nátěru krve v intervalu 1668 až 1656 cm^{-1} před zpracováním činidlem. Plocha S1 se rovná 0,69 cm^2 . Na obr. 3C je zobrazena část infračerveného spektra druhé odmocniny po zpracování činidlem. Plocha S2, která leží v intervalu 1664 až 1656 cm^{-1} , se rovná 1,37 cm^2 . Poměr S2/S1 se rovná 1,98, což svědčí o přítomnosti rakovinového onemocnění u pacienta. Výsledky klinického rentgenového vyšetření stanovily diagnózu: rakovina levé prsní žlázy, lymfoadenit v podpaží. Patologická histologie N5517-23 od 14.04.97. Nízko

diferencovaný infiltrační adenokarcinom (metastázy do lymfatických uzlin). Toto potvrdily výsledky spektroskopického vyšetření.

Příklad 4

Stejným postupem jako v příkladu 1 se provádělo vyšetření krve pacienta O. a naměřené hodnoty jsou znázorněny na obr. 4, 4A, 4B a 4C. Na obr. 4B je zobrazen fragment druhé odmocniny infračerveného spektra nátěru krve v intervalu 1668 až 1600 cm^{-1} před zpracováním činidlem. Plocha S1 se rovná 0,65 cm^2 . Na obr. 4C je zobrazena část infračerveného spektra druhé odmocniny po zpracování činidlem. Plocha S2, která leží v intervalu 1668 až 1665 cm^{-1} , se rovná 0,54 cm^2 . Poměr ploch S2/S1 se rovná 0,83, což svědčí o nepřítomnosti rakovinového onemocnění u pacienta. Během ročního pozorování nebylo objeveno rakovinové onemocnění. Toto potvrdily výsledky spektroskopického vyšetření.

Dále byly stejným postupem provedeny pokusy s různými koncentracemi vodného roztoku chloridu vápenatého v rozmezí od 5 do 20 %. Použité množství roztoku se pohybovalo od 20 do 30 μl . Byly získány analogické výsledky.

Pokusnou cestou bylo tedy zjištěno, že po zpracování vzorku nátěru krve rakovinou nemocných pacientů 20 až 30 μl 5 až 20% vodného roztoku chloridu kovu alkalických zemin bylo zaznamenáno podstatné zvětšení (2 až 4krát) plochy vrcholu druhé odmocniny v intervalu 1600 až 1700 cm^{-1} , kdežto u zdravých lidí bylo zaznamenáno nepatrné zvětšení plochy vrcholu druhé odmocniny v intervalu 1600 až 1700 cm^{-1} (1,2 až 0,4krát).

Výsledky vyšetření jsou uvedeny v tabulce.

Tabulka

Zdraví pacienti				Nemocní pacienti			
č.	plocha S1 před zprac. čínidlem cm ²	plocha S2 po zprac. čínidlem cm ²	poměr ploch S2/S1	č.	plocha S1 před zprac. čínidlem cm ²	plocha S2 po zprac. čínidlem cm ²	poměr ploch S2/S1
1	1,06	1,07	1,01	1	0,22	2,33	10,6
2	0,88	0,54	0,61	2	0,22	0,47	2,14
3	1,11	1,07	0,96	3	0,54	0,91	1,69
4	0,80	0,56	0,70	4	0,29	0,55	1,24
5	0,59	0,50	0,85	5	0,30	0,86	2,87
6	1,21	1,28	1,06	6	0,67	0,83	1,24
7	0,81	0,59	0,73	7	0,15	0,30	2,00
8	0,65	0,40	0,62	8	0,62	0,96	1,55
9	1,40	0,87	0,62	9	0,83	1,29	1,55
10	0,82	0,95	1,16	10	0,82	1,22	1,49
11	1,21	0,97	0,76	11	0,53	0,89	1,70
12	0,90	0,80	0,89	12	0,80	0,14	5,70
13	0,42	0,36	0,86	13	0,54	0,68	1,26
14	1,08	1,01	0,94	14	0,19	0,57	3,00
15	0,87	0,74	0,85	15	0,82	1,06	1,29
16	1,23	1,06	0,86	16	0,05	0,10	2,07
17	1,02	0,85	0,83	17	0,73	0,90	1,24
18	0,60	0,66	1,10	18	0,20	0,34	1,67
19	0,44	0,25	0,57	19	0,19	0,29	1,57
20	0,34	0,25	0,74	20	0,15	0,23	1,52
21	0,90	0,76	0,85	21	0,71	1,12	1,57
22	0,87	0,99	1,14	22	0,55	0,81	1,48
23	0,76	0,74	0,97	23	0,18	0,22	1,24
24	0,87	0,66	0,76	24	0,67	1,11	1,66
25	0,95	0,85	0,89	25	0,15	0,34	2,34
26	0,90	0,73	0,81	26	0,85	1,06	1,25
27	0,94	1,00	1,06	27	0,25	0,37	1,37

28	0,89	0,86	0,96	28	0,17	0,29	1,70
29	1,01	0,84	0,83	29	0,17	1,36	2,13
30	1,18	0,80	0,68	30	0,24	0,34	1,40

Věřohodnost výsledku se ověří tímto způsobem:

Vypočte se aritmetický průměr podle vzorce

$$S = 1/n \otimes (S1 + S2 + \dots + Sn) = 1/n \otimes \sum_{i=1}^n (Si)$$

S - integrovaná plocha absorpčního maxima druhé odmocniny

N1 - počet vyšetřených dárců

N2 - počet vyšetřených nemocných rakovinou

Reprodukce provedené série měření se charakterizuje standardní odchylkou některých měření dle vzorce:

$$S = \sqrt{\frac{\sum_{i=1}^n (Xi - \bar{X})^2}{(n-1)}}$$

Velikost standardní odchylky pro:

donory S1 = 0,16

nemocné rakovinou S2 = 1,82

Standardní odchylka průměrné hodnoty:

$$S_{1,2} = S1 / \sqrt{n} = \sqrt{\frac{\sum_{i=1}^n (Si - S)^2}{[n(n-1)]}}$$

Standardní odchylka průměrných hodnot pro :

donory S1 = 0,029

nemocné rakovinou S2 = 0,333

Pro zhodnocení významu odlišností mezi průměrnými hodnotami S1 a S2, když jsou známy standardní odchylky jednotlivých měření, se vypočte vážený průměr standardní odchylky:

$$S = \frac{\sqrt{(N1-1) \otimes S1^2 + (N2-1) \otimes S2^2}}{(N1-1) + (N2-1)}$$

Studentovo kritérium (t) se vypočte dle vzorce:

$$t = \frac{|X1 - X2|}{S} \cdot \frac{\sqrt{N1 \otimes N2}}{N1 + N2} \quad t = 3,88$$

t - tabulkové se rovná 1,96

Jelikož výpočetní t je větší než tabulkové t, je rozdíl mezi dvěma průměry veličin S1 a S2 statisticky významný, protože leží za hranicemi, které se dají vysvětlit náhodnými chybami pokusu. Provedené výpočty dovolují tvrdit, že přesnost předloženého způsobu činí 97,5 %. Způsob se používá pro diagnostikování rakovinových onemocnění u člověka podle vyšetření celkové krve. Předložený způsob umožňuje zjistit prvotní změny v krvi pacienta při onemocnění rakovinou, a to před klinickým projevením, a včasné zahájit léčbu.

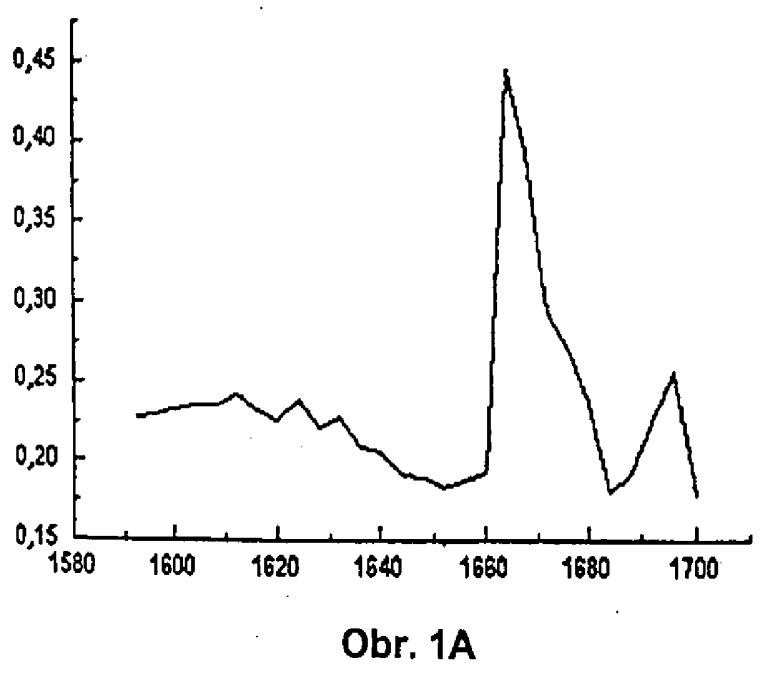
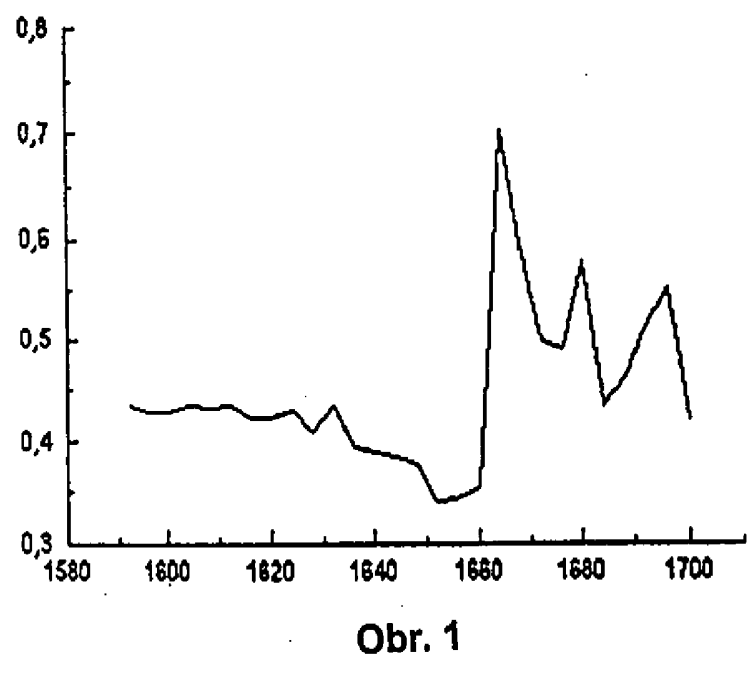
Průmyslová využitelnost

Jednoduchost provedení, dostupnost materiálu a činidel umožňuje provádět masové vyšetření obyvatelstva za účelem včasné diagnostiky rakovinových onemocnění. Použití tohoto způsobu je určující pro případy, kdy není možné provést biopsii z nádorů, které se nacházejí na těžko dostupných místech. Objektivnost hodnocení výsledku vyšetření je vysoká, přesnost způsobu je 97,5 %.

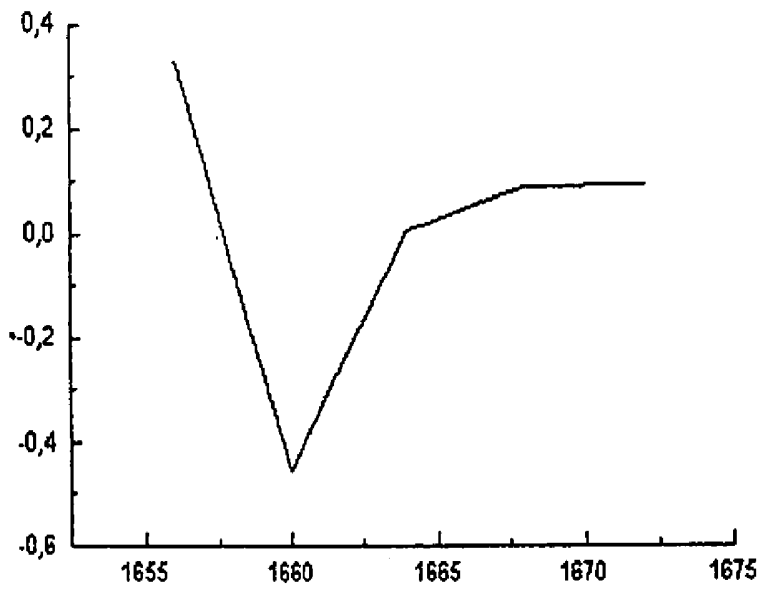
PATENTOVÉ NÁROKY

Způsob spektroskopické diagnostiky rakovinových onemocnění v biologickém materiálu, vyznačující se tím, že se kapka vzorku krve před a po zpracování 20 až 30 μl 5% až 20% vodného roztoku chloridu kovu alkalických zemin po dobu 5 až 10 min při teplotě 10 až 30 $^{\circ}\text{C}$ ve formě nátěru podrobí snímání infračerveného spektra v intervalu 1600 až 1700 cm^{-1} , načež se pro vzorek stanoví poměr integrovaných ploch absorpčních maxim po zpracování a před zpracováním činidlem, zejména po převedení spekter na druhé odmocniny, přičemž při velikosti poměru těchto ploch vyšším než 1,2 je ve vzorku přítomno rakovinové onemocnění a při velikosti tohoto poměru 0,4 až 1,2, zejména 0,44 až 1,2, je rakovinové onemocnění nepřítomno.

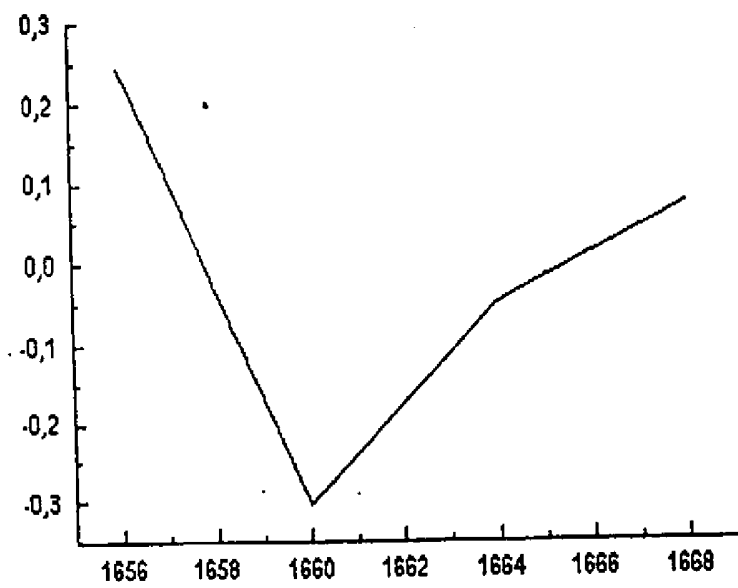
1/8



2/8

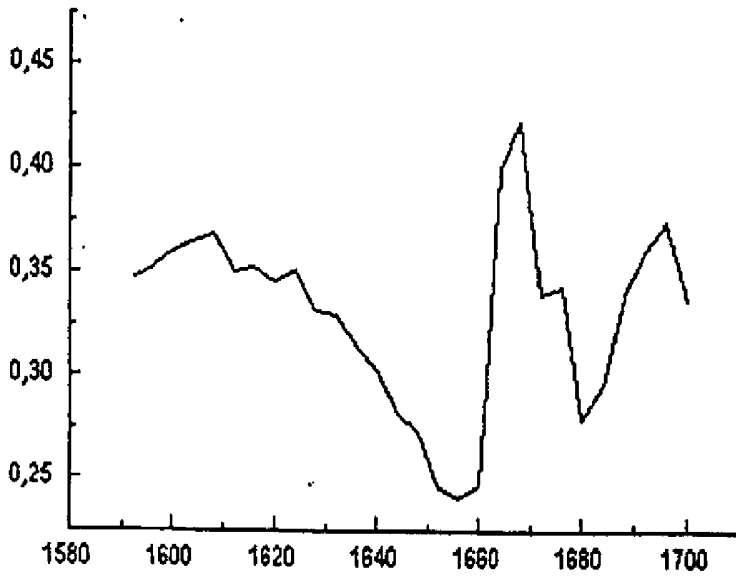


Obr. 1B

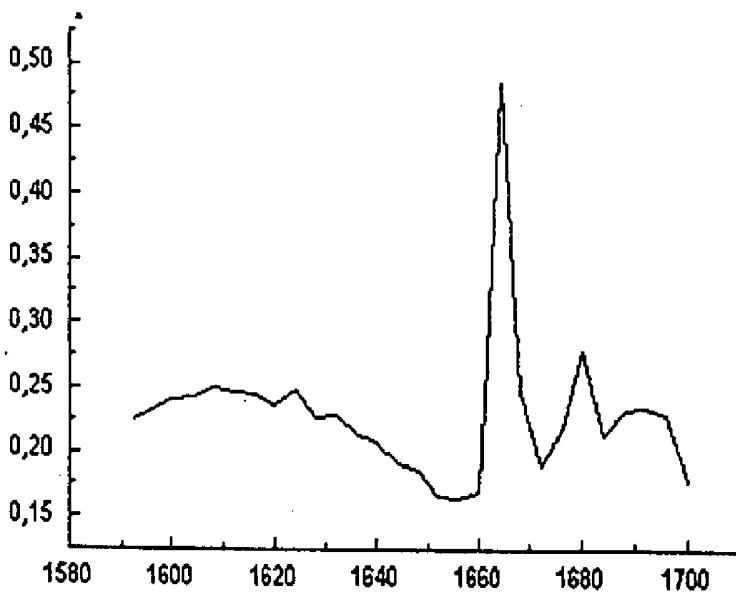


Obr. 1C

3/8

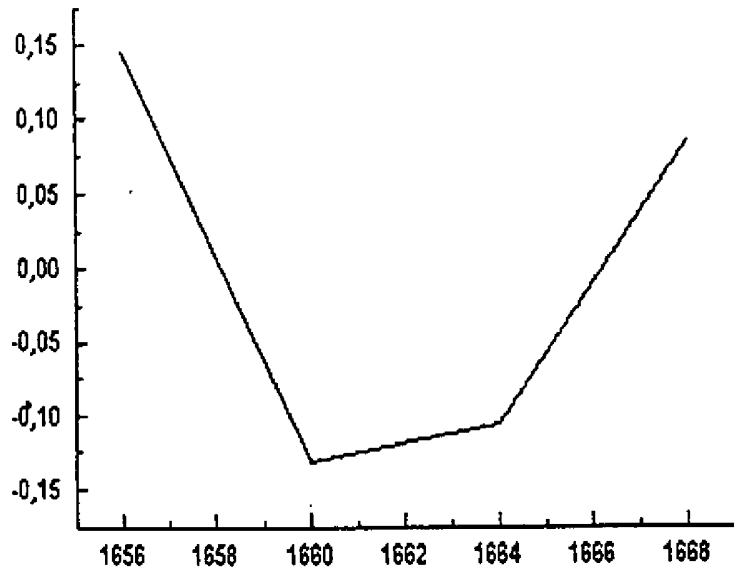


Obr. 2

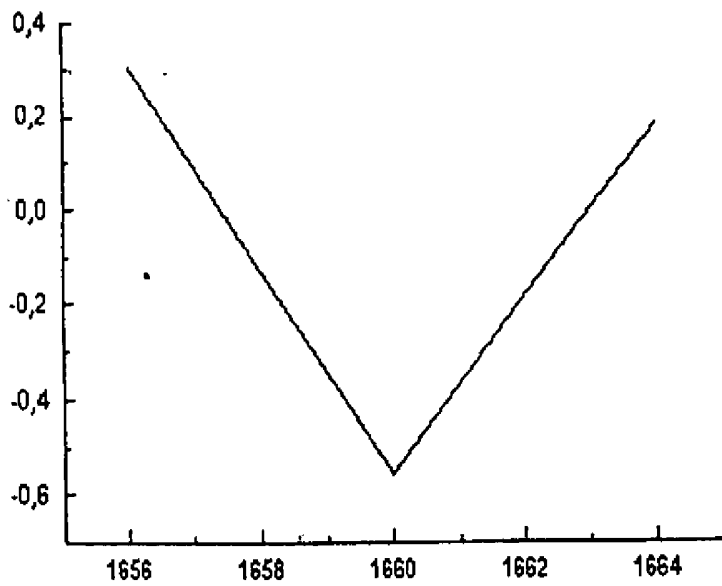


Obr. 2A

4/8



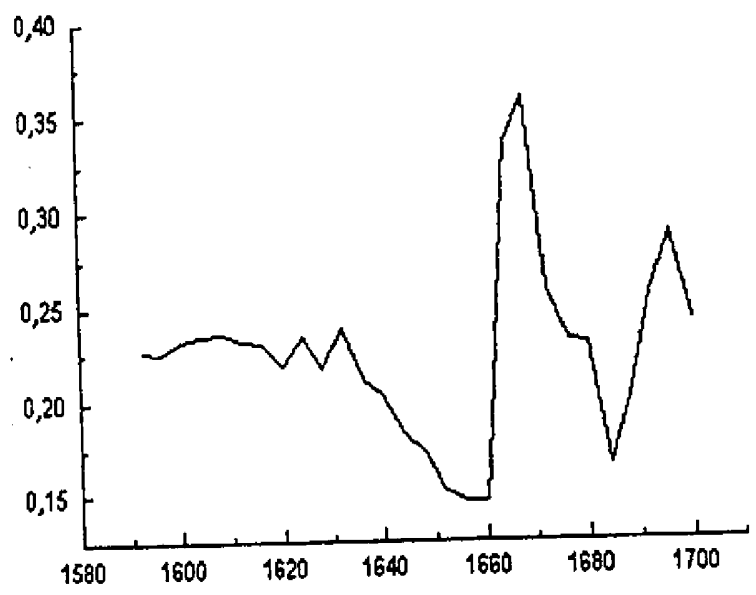
Obr. 2B



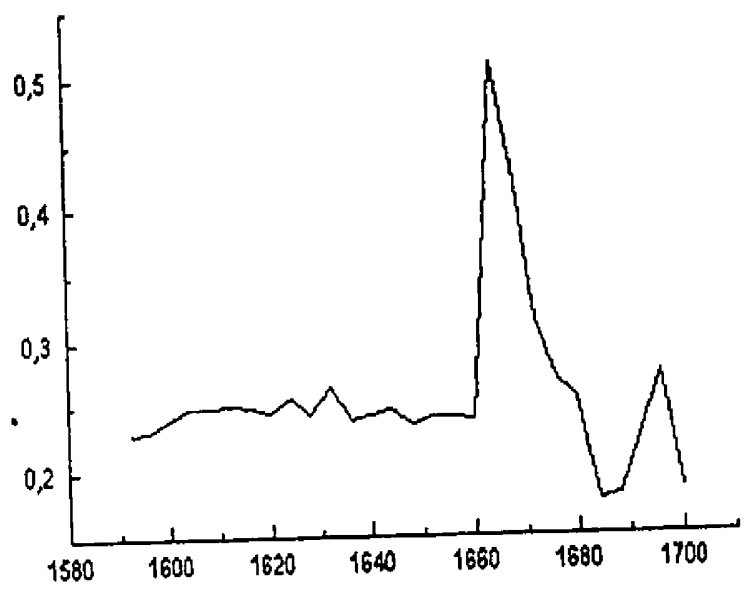
Obr. 2C

PV 2000 - 949

5/8

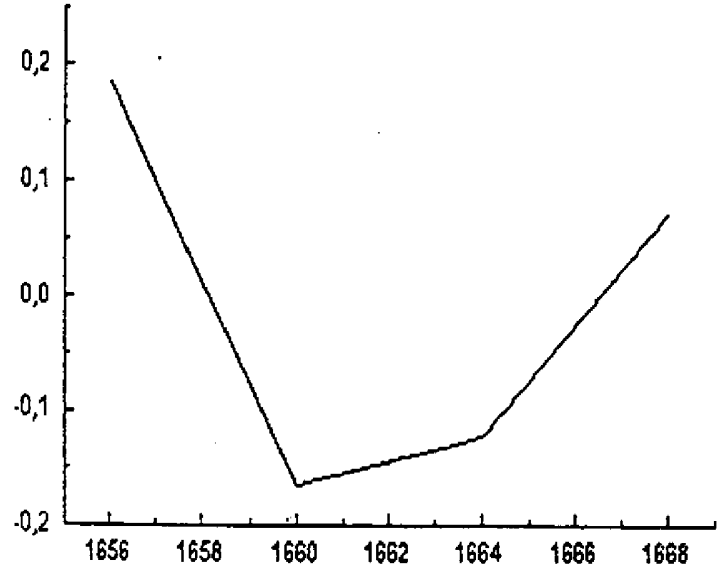


Obr. 3

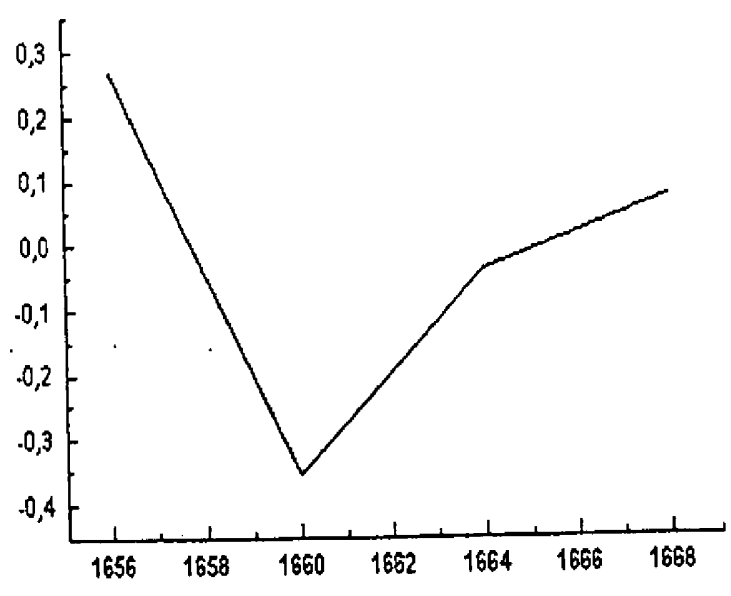


Obr. 3A

6/8

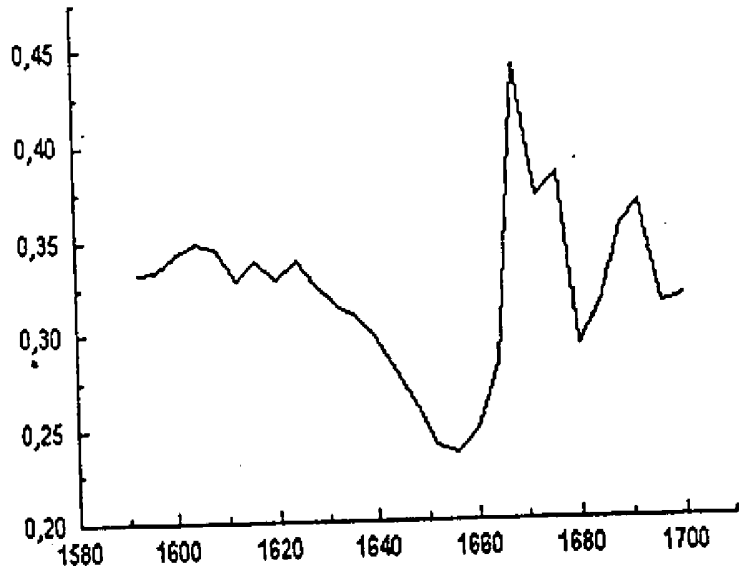


Obr. 3B

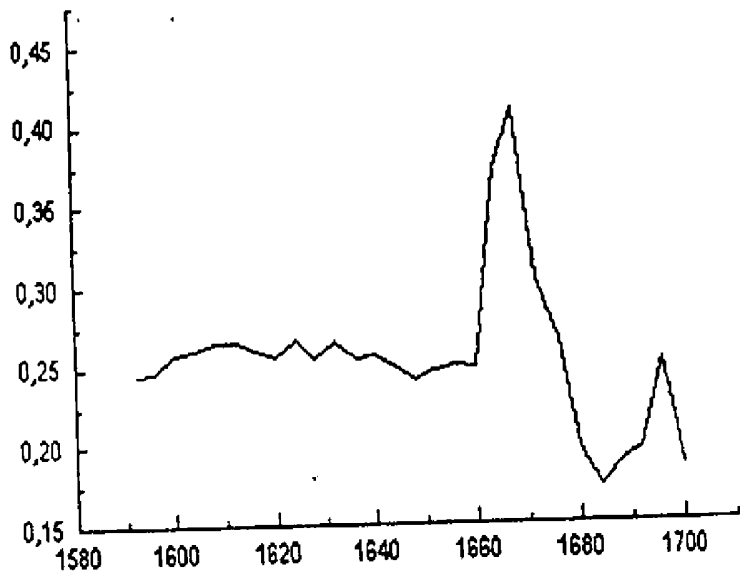


Obr. 3C

7/8

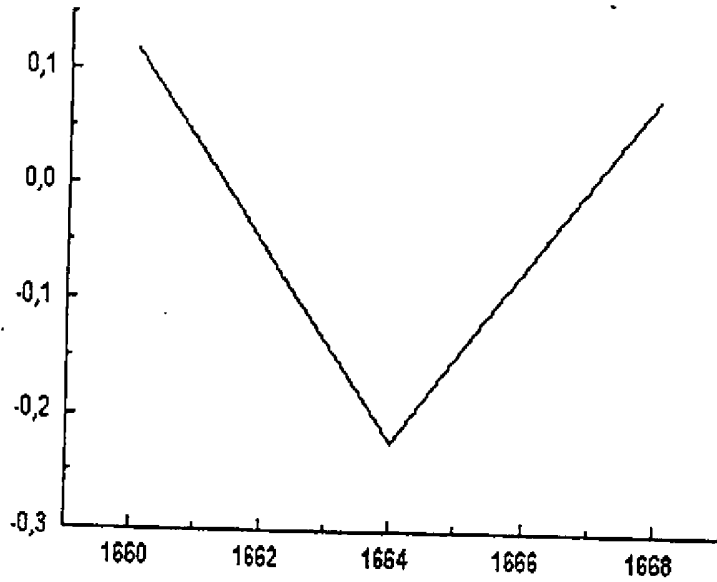


Obr. 4

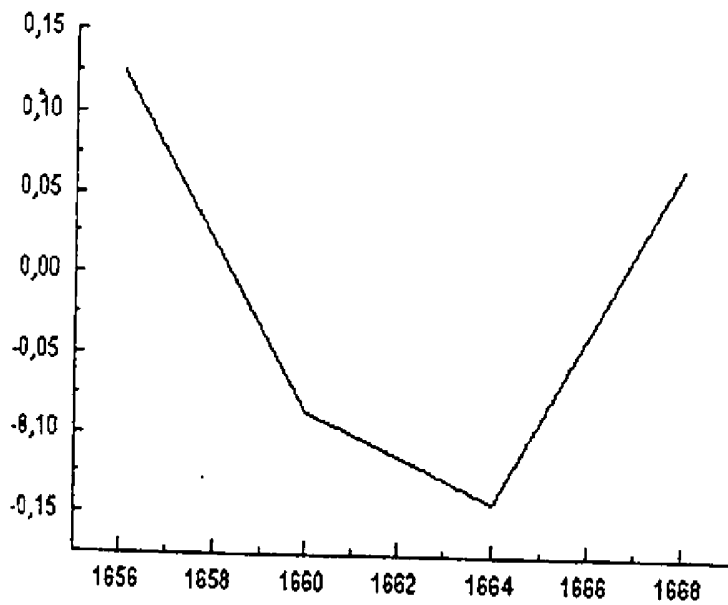


Obr. 4A

8/8



Obr. 4B



Obr. 4C