

(19) HU

MAGYAR
NÉPKÖZTÁRSASÁG



ORSZÁGOS
TALÁLMÁNYI
HIVATAL

SZABADALMI LEÍRÁS

(21) (78/84)

(22) A bejelentés napja: 84. 01. 12.

(41) (42) Közzététel napja: 86. 05. 28.

(45) A leírás megjelent: 89. 01. 20.

(11) (13)

191 105 B

Nemzetközi
osztályjelzet:
(51) Int. Cl. 4:
G 01 N 33/49



(72) (73) Kovács Ádám, technikus, Pilisborosjenő

(54)

ELJÁRÁS MALIGNUS PROLIFERÁCIÓ KIMUTATÁSÁRA

(57) KIVONAT

A találmány tárgya eljárás malignus proliferáció – rákos megbetegedések, beleértve a leukémiát is – kimutatására.

Az eljárás során beszárított vérszérum- vagy testnedv-pereparátumot, illetve célszerűen fiziológias körülmények között beszárított sejtagglomerátum- vagy szövetpreparátumot optikai vizsgálatnak vetünk alá, és a terminál effektus legalább részleges hiányából állapítjuk meg a kóros állapotot.

A találmány tárgya diagnosztikai eljárás, mely lehetővé teszi vérszérumból, testnedvekből, sejtagglomerátumokból és szövetekből malignus proliferáció – rákos megbetegedések, beleértve a leukémiát is – kimutatását.

Ismeretes, hogy a különféle rosszindulatú daganatos betegségek sikeres kezelésének alapvető feltétele annak igen korai stádiumban történő felismerése. Az utóbbi időben kiterjedt kutatások történtek ilyen módszerek kidolgozására. Ezen eljárások általában valamely, a vérben található speciális fehérje – például enzim – koncentrációját, illetve annak koncentráció-változását mérik. Ezek alkalmazási területe azonban korlátozott, a mérések bonyolultak, költségesek és általában hosszú ideig tartanak. Az irodalomban ez ideig nem található olyan eljárás, amellyel általában véve a daganatos betegségek diagnosztizálhatók lennének. A találmány célkitűzése ezért olyan eljárás kidolgozása, mely egyszerű és gyors módszert biztosít tumoros megbetegedések kimutatására, lehetőleg azok minél korábbi stádiumában.

A találmány tárgya az a felismerés, hogy beszárított vérszérumban, illetve célszerűen fiziológiás körülmények között beszárított sejtagglomerátum-, testnedv-, és szövet-preparátumokban optikai módszerrel jellegzetes fehérjefonalak figyelhetők meg. Ezen fonalakra az ún. „terminál effektus” jellemző, melyek végpontjai a mikroszkópi képen minden esetben elérik, illetve a lehető legrövidebb úton megközelítik egy másik fonal valamelyik pontját, amennyiben a minta egészséges szervezetből származik. Abban az esetben, ha a mintát tumoros szervezetből vettük, a „terminál effektus” nem volt jellemző, azaz az egészséges állapotra jellemző fonalrendszer meg sem jelent, vagy csak részben találkoztak a fonalak.

A terminál effektus jellegzetességét és kialakulását az alábbiakban vérszérum esetében ismertettjük. Természetes azonban, hogy amennyiben egyéb testnedvekből, sejtagglomerátumokból vagy szövetekből készítettünk preparátumot, a kép hasonló lesz.

A találmányt a csatolt rajzok részletesen ismertetik.

Az 1. ábra beszárított vérszérum elektronmikroszkóppal készített képe.

A 2. ábra egészséges emberi vérszérum-preparátumának pásztázó elektronmikroszkópos felvétele.

A 3. ábra tumoros beteg beszárított vérszérum-preparátumának pásztázó elektronmikroszkópos képe.

A 4. ábra egészséges ember vérszérum-preparátumának fonalszerkezeti képe.

Az 5. ábra tumoros beteg vérszérum-preparátumának fonalszerkezeti képe.

A 6. ábra egészséges ember vérszérum-képéből kiemelt terminál-effektust mutatja.

A 7. ábra egészséges ember Ascytes folyadék-preparátumának képe.

A 8. ábra tumoros szervezetből származó Ascytes folyadék preparátumának felvétele.

Amennyiben vénásan levett natív vért állni hagyunk, és ülepedés után a szérumot üveglemezre cseppentjük, kíméletes beszárítás után jellegzetes képet kapunk. Az 1. ábra szerinti megrepesztett pre-

parátumban érdekes képződményeket, fonalakat észlelhetünk.

Megállapítottuk, hogy az egészséges, illetve tumoros szervezetből vett vérszérum beszárítási képe alapvetően különbözik. A 2. ábra egészséges ember, a 3. ábra pedig rosszindulatú daganatban szenvedő beteg beszárított vérszérum-preparátumát mutatja, pásztázó elektronmikroszkópos felvételen. Az ábrákon látható repedések mindig a fonalak mentén jönnek létre; amennyiben a preparátum felső rétegét eltávolítjuk, a 4. és 5. ábra szerinti fonalszerkezetet kapjuk. A 4. ábrán jól látható, hogy a fonalak egymással szoros kapcsolatban vannak, azaz a terminál-effektus, melyet a 6. ábra részletesen is szemléltet, létrejött. Az 5. ábra szerint terminál effektus nincs, a fonalak ki sem alakultak, ez egyértelműen a malignus folyamatok jelenlétére utal.

Hasonló képekhez juthatunk, ha nem beszárított vérszérum-preparátumot, hanem egészséges, illetve tumoros szervezetből származó Ascytes-folyadék preparátumát vizsgáljuk, melyet a 7., illetve 8. ábra szemléltet. E képeken jól látható, hogy az egészséges sejtek esetén azok között a fonalak révén kapcsolat jön létre, melynek mentén kialakulnak a jellemző repedések (7. ábra). A 8. ábra egyértelműen mutatja, hogy a terminál-effektus hiányzik, azaz a szervezetben malignus folyamat játszódik le.

Fenti tapasztalataink alapján dolgoztuk ki a találmány szerinti eljárást (MTA módszer), melynek lényege, hogy beszárított vérszérum vagy testnedv-preparátumot, illetve célszerűen fiziológiás körülmények között beszárított sejtagglomerátum- vagy szövet-preparátumot optikai vizsgálatnak vetünk alá, és a terminál-effektus legalább részleges hiányából állapítjuk meg a kóros állapotot.

A preparátumokat általában önmagában ismert módszerekkel előállíthatjuk. Célszerű azonban a preparátumokat kontrollált körülmények között készíteni, mert így az eljárás standardizálható és a különböző minták egyszerűbben összehasonlíthatók.

Vérminták vizsgálata esetén célszerűen úgy járunk el, hogy natív vért veszünk, a vérszérumot célszerűen üleptéssel, illetve centrifugálással állítjuk elő, majd nedvesítő-, illetve nem-nedvesítő hordozóra cseppentjük. Jó preparátumot kapunk, ha célszerűen 1–20 µl cseppet viszünk fel, illetve körülbelül hasonló mennyiséget tárgylemezen elfolyatunk.

A folyadék szárítását általában kontrollált hőmérsékleten, célszerűen 20–50 °C-on végezzük, állandó páratartalom és nyomás biztosítása mellett. A beszárítás történhet vákuum alkalmazásával, célszerű azonban atmoszférikus nyomáson dolgozni. Végezhetjük a szárítást a kritikus pontra történő hűtéssel, melynek során a mintában levő víz mikrokristályos formában válik ki, és a repedések szintén a fonalak mentén jönnek létre.

A preparátumok értékelése a terminál-effektus alapján történik. Egészségesnek akkor tekinthető a szervezet, ha a terminál-effektus a minta teljes egészében megtalálható. Amennyiben a terminál-effektus csak részben is hiányzik, az kóros jelenségre utal.

Az értékelés legegyszerűbb módon vizuális úton történik, lehetséges azonban speciális berendezések,

illetve módszerek alkalmazása is, melyek megkönnyítik az azonosítást. Néhány ilyen módszer az Urban-csek-algoritmus, Faurier-transzformációs algoritmus módszer, zárt gráfok módszere, fekete/fehér/fehér, illetőleg fordított átmenetek számlálása, illetve ezek közül bármelyek kombinációja.

A találmány szerinti diagnosztikai módszert 1000-nél több főből álló csoport vizsgálatán ellenőriztük, és az igen jó találati aránnyal hatékonyak bizonyultak a legkülönbözőbb típusú tumoros esetek meghatározására. Nagy előnye, hogy igen gyors, és így igen alkalmas szűrővizsgálatok lefolytatására, terápia nyomonkövetésére, illetve tumorelles vegyületek kutatásánál, az anyagok hatékonyságának in vitro gyors ellenőrzésére.

A találmány szerinti eljárással 1164 főből álló csoportot vizsgáltunk. Ennek során a vérszérum beszáradási kép mintázatát hasonlítottuk össze klinikai szövettani diagnózissal. Az eredmények értékelésénél az eseteket három csoportba osztottuk (I. táblázat).

I. táblázat

Csoportok	Teljes létszám	MTA +	MTA	MTA teljes létsz.
szövettanilag igazolt rákos betegek	383	358	25	94 %
egészséges kontroll csoport (25 év alattiak)	242	12	230	95 %
vegyes csoport (klinikailag még nincs diagnosztizált rák, de nem kizárt ennek lehetősége)	539	163	376	70 %

II. táblázat

Rosszindulatú daganatos betegségek	Esetek száma
Leukémia	74
Malignus lymphomák	93
Fej és nyak rák	9
Tüdő rák	17
Emlő rák	41
Emésztőrendszer daganatai	48
Női nemi szervek daganatai	12
Férfi nemi szervek daganatai	56
Agydaganat	7
Vizelet-elválasztó rendszer daganatai	20
Bőr rák	6

Az első csoportba azok a betegek kerültek, akiknek a szövettani vizsgálat alapján rosszindulatú daganatuk van. Az MTA vizsgálat a 383 esetből 358 esetben jelezte a malignitást (94 %). A II. táblázat mutatja a különböző rosszindulatú daganatos betegségek számszerű megoszlását:

A második, ún. kontroll csoportba egészséges, fiatal 25 év alatti emberek kerültek. A beszáradt vérsavó cseppek mintázata alapján a csoport 242 pácienséből 230-at találtunk mi is egészségesnek (95 %). A harmadik, ún. vegyes csoportba különböző életkorú emberek kerültek (25 és 85 év között), akiknek más, nem rákos betegségeik voltak (májgyulladás, tüdőgyulladás, magas vérnyomás, cukorbetegség, jóindulatú daganatos betegek stb.). Az 539 esetből az MTA vizsgálat 376 esetet mondott negatívnak (70 %). Ennél a csoportnál a klinikai diagnózis még nem mutatott ki rosszindulatú daganatos betegséget; de nem kizárt annak lehetősége. Az első két csoportnál kapott eredmények alapján úgy véljük, hogy az MTA módszer nagyon korai stádiumban jelzi a malignus folyamatot, akkor, amikor még nincsenek komolyabb tünetek, és más klinikai módszerekkel még nem, illetve csak bizonyos esetekben detektálható a rosszindulatú daganat. A csoport tagjai közül, a beszáradási kép alapján pozitívnak mondott esetek közül 7 esetben az utólag elvégzett klinikai vizsgálatok igazolták a rosszindulatú daganatot, míg a többiek további megfigyelés alatt állnak.

Szabadalmi igénypontok

1. Eljárás malignus proliferáció -- rákos megbetegedések, beleértve a leukémiát is -- kimutatására, *azzal jellemezve, hogy beszárított vérszérum- vagy testnedv-preparátumot, illetve célszerűen fiziológiás körülmények között beszárított sejtagglomerátum- vagy szövet-preparátumot optikai vizsgálatnak vetünk alá, és a terminál effektus legalább részleges hiányából állapítjuk meg a kóros állapotot.* (Elsőbbsége: 1984. március 21.)

2. Az 1. igénypont szerinti eljárás, *azzal jellemezve, hogy beszárított vérszérumot használunk.* (Elsőbbsége: 1984. január 12.)

3. Az 1. igénypont szerinti eljárás, *azzal jellemezve, hogy Ascytes-folyadékot használunk.* (Elsőbbsége: 1984. március 21.)

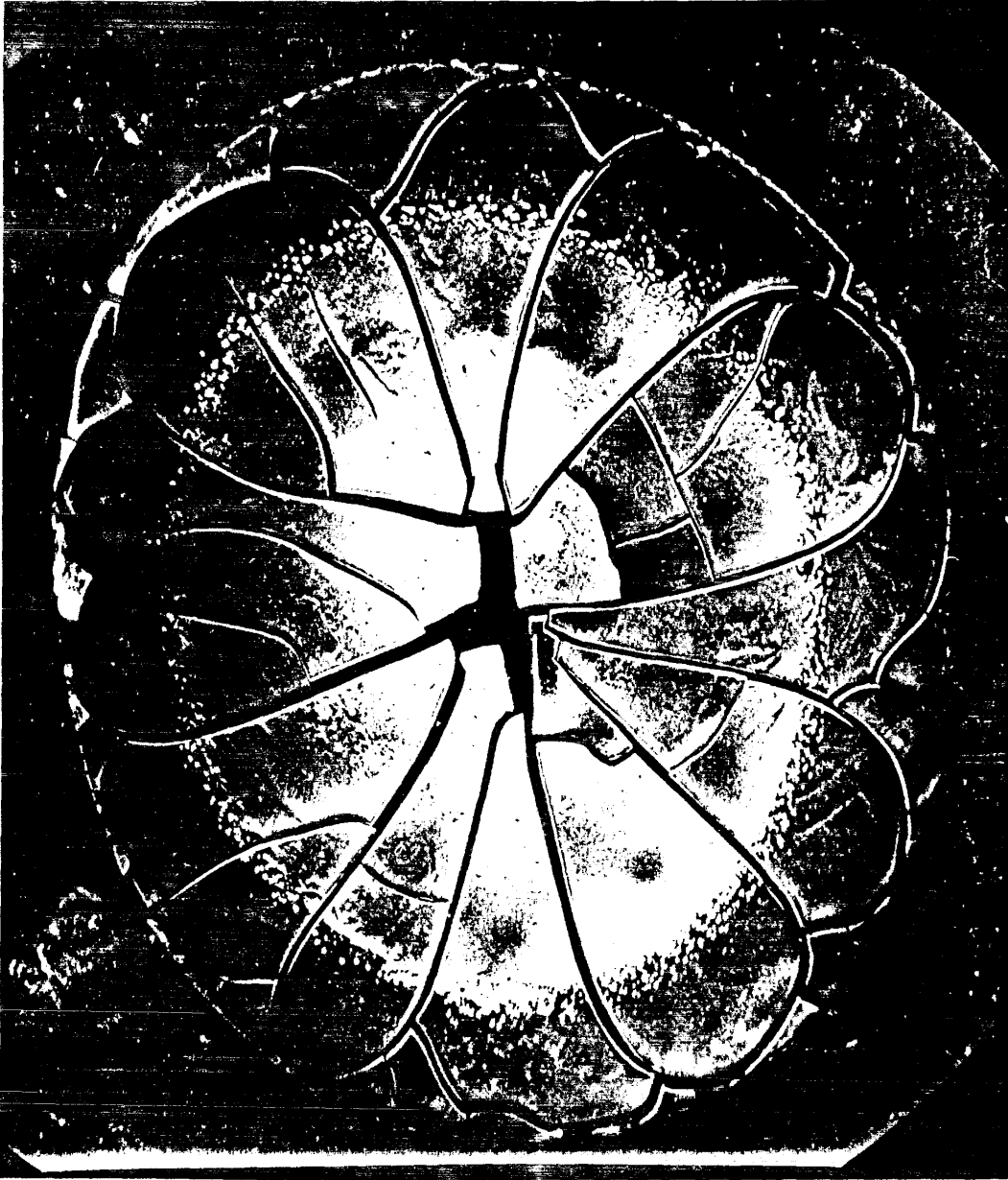
131 105

Nemzetközi osztályozás: G 01 N 33/49



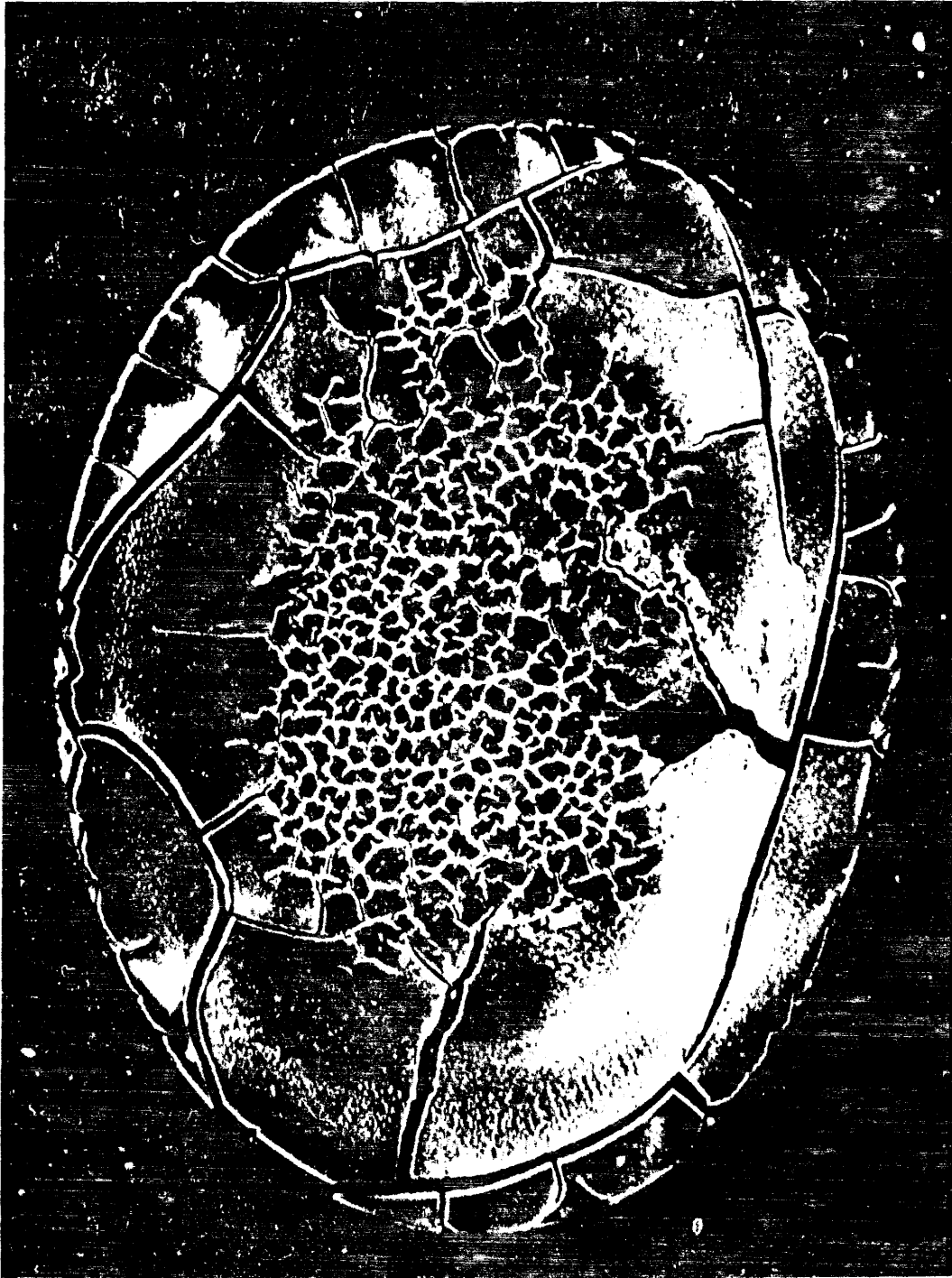
191 105

Nemzetközi osztályozás: G 01 N 33/49



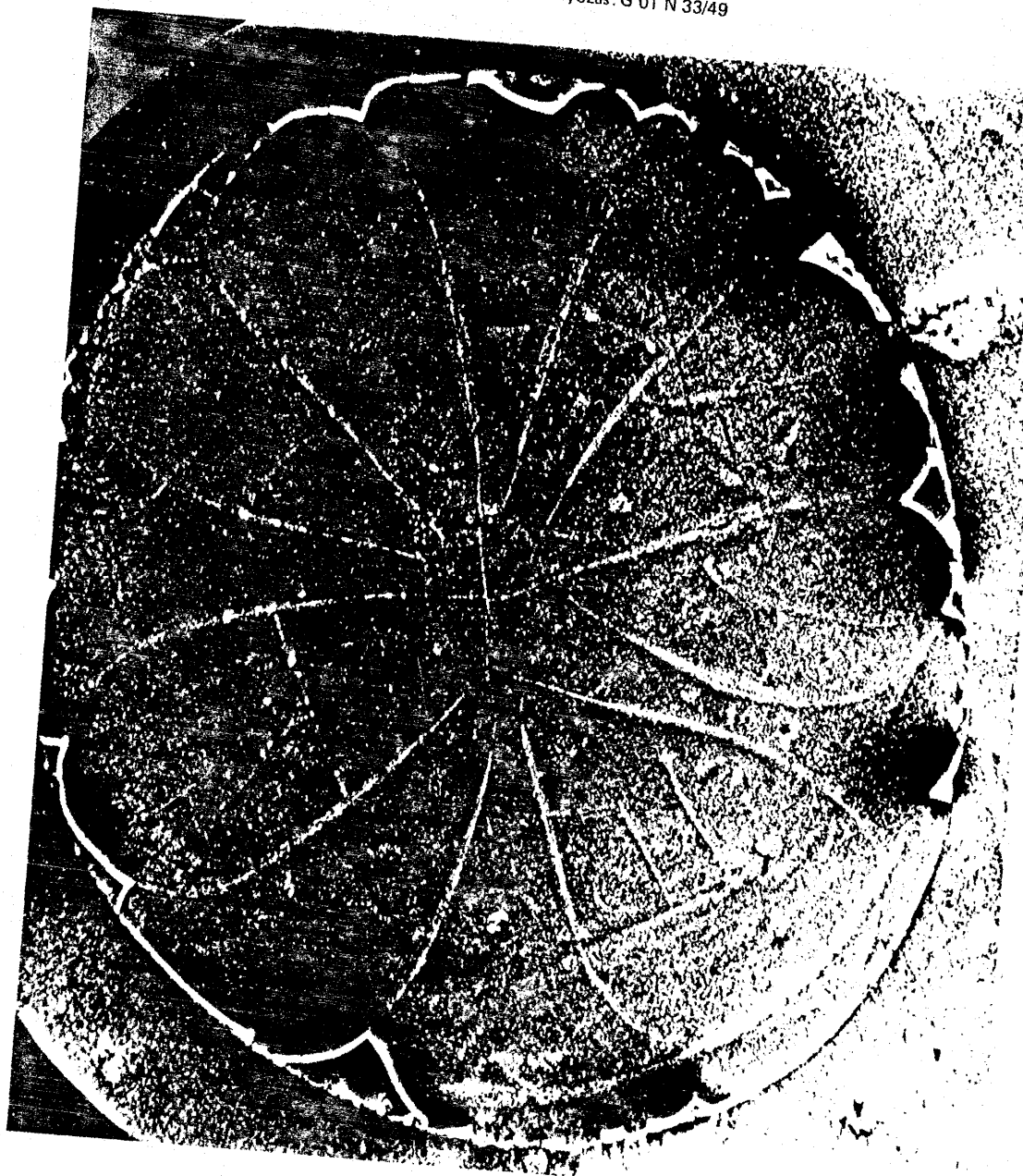
191 105

Nemzetközi osztályozás: G 01 N 33/49



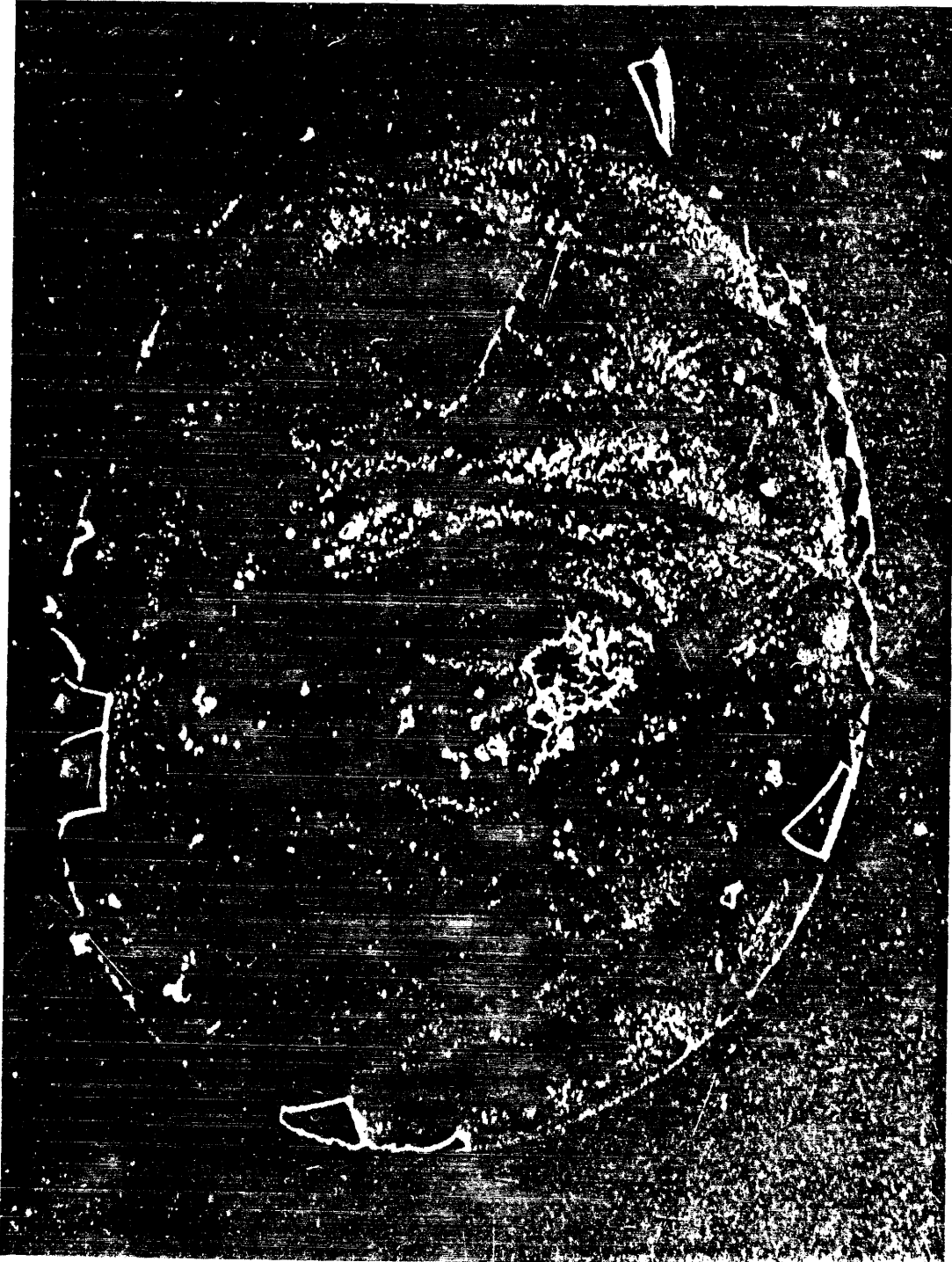
191 105

Nemzetközi osztályozás: G 01 N 33/49



131 105

Nemzetközi osztályozás: G 01 N 33/49



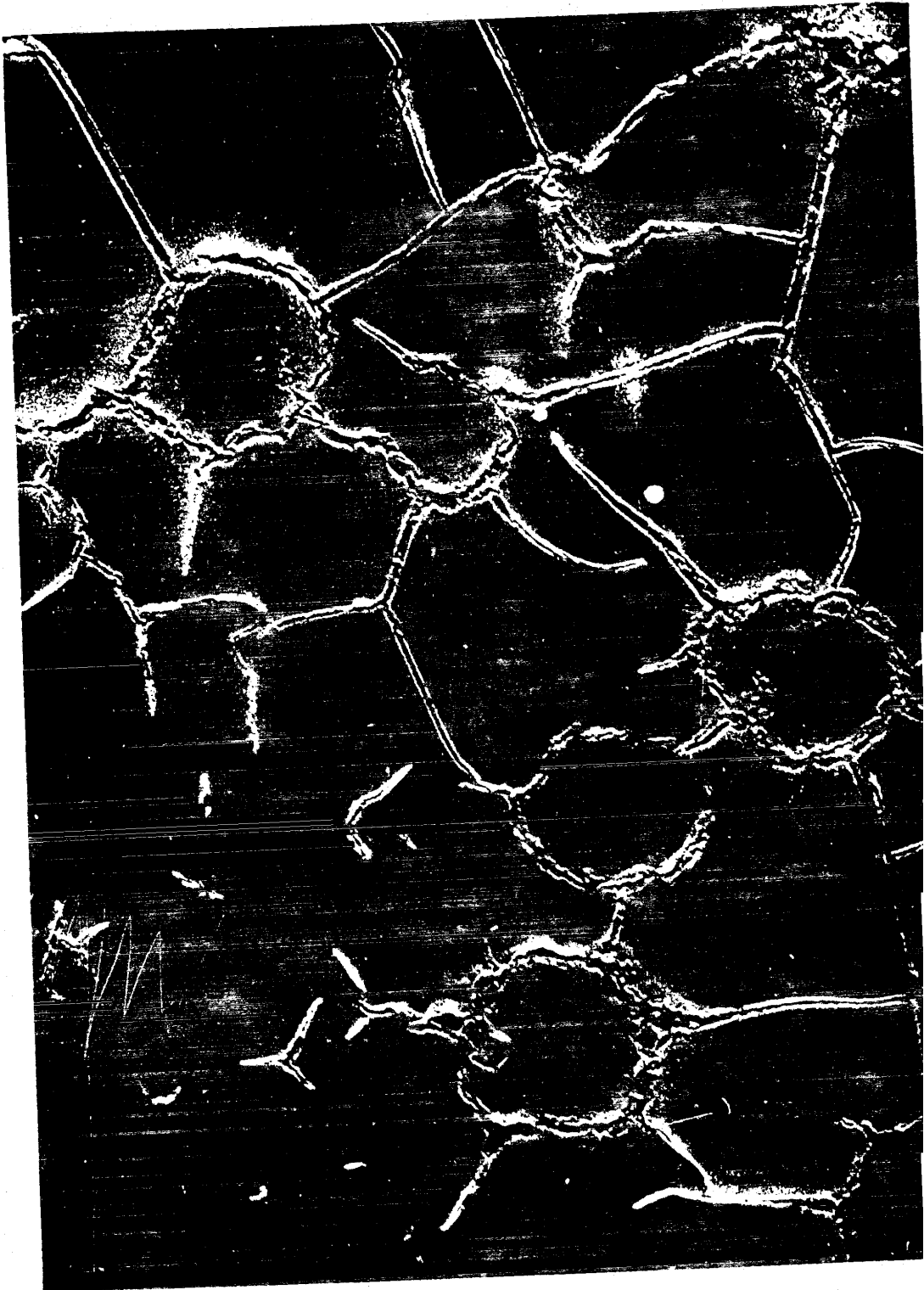
191 105

Nemzetközi osztályozás: G 01 N 33/49



91 105

Nemzetközi osztályozás: G 01 N 33/49



191 105

Nemzetközi osztályozás: G 01 N 33/49



Kiadja az Országos Találmányi Hivatal
A kiadásért felel: Himer Zoltán osztályvezető
Megjelent: a Műszaki Könyvkiadó gondozásában

COPYLUX Nyomdaipari és Sokszorosító Kiszövetkezet